

**Tryptophanstoffwechsel von *Malassezia furfur*:
Isolierung des ersten Metaboliten Malassezin**

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

vorgelegt von WiebkeThoma
aus Nettetetal

Giessen 2003

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

Gutachter: PD Dr. med. Peter Mayer
Gutachterin: Prof. Dr. med.-vet. Roswitha Füssle

Tag der Disputation: 24.11.2003

Folgende Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Artikel:

- 1) Mayser, P., Wille, G., Imkamp, A., Thoma, W., Arnold, N., Monsees, T.: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. *Mycoses* 41: 265-271, 1998
- 2) Wille, G., Mayser, P., Thoma, W., Monsees, T., Baumgart, A., Schmitz, H.J., Schrenk, D., Polborn, K., Steglich, W.: Malassezin – A Novel Agonist of the Arylhydrocarbon Receptor from the Yeast *Malassezia furfur*. *J. Bioorg. Med. Chem.* 9(4): 955-60, 2001

Abstracts (Poster bzw. Vorträge):

- 1) Thoma, W., Trinkaus, M., Mayser, P.: Identifikation eines Tyrosinase-Inhibitors im Stoffwechsel von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 43:264, 2000 (Poster)
- 2) Thoma, W., Trinkaus, M., Mayser, P.: Tyrosinaseinhibition durch Stoffwechselprodukte von *M. furfur*. *H+G* 75: 473, 2000 (Poster)
- 3) Thoma, W., Dahms, K., Krämer, H.-J., Steglich, W., Irlinger, B., Mayser, P.: Tyrosinaseinhibition durch KO27- einen Stoffwechselmetaboliten von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 44: 238-239, 2001 (Vortrag)
- 4) Thoma, W., Krämer, H.-J., Irlinger, B., Baumgart, A., Schmitz, H.-J., Mayser, P.: Isolation neuer Arylhydrocarbonrezeptoragonisten aus Tryptophanmetaboliten von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 45: 249, 2002

Posterpreise:

- 1) 9/2000 (129. Tagung der Vereinigung Südwestdeutscher Dermatologen) „Tyrosinase-Inhibition durch Stoffwechselmetabolite von *Malassezia furfur*“ (bestes wissenschaftliches Poster)
- 2) 5/2001 (41. Tagung der deutschen dermatologischen Gesellschaft): Isolation und Synthese von Malassezin - einem neuen Agonisten des Arylhydrocarbonrezeptors. (3. Preis)
- 3) 9/2002 (MYK 2002): Isolation neuer Arylhydrocarbonrezeptoragonisten aus Tryptophanmetaboliten von *Malassezia furfur* (Hans-Rieth-Posterpreis) Inhaltsverzeichnis

Liste verwendeter Abkürzungen:

AHR	Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, NL
DC	Dünnschichtchromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>M.</i>	<i>Malassezia</i>
PV	Pityriasis versicolor
Pva	Pityriasis versicolor alba
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
TEA	Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure (10:5:3, verwendet als Laufmittel bei DC)
Trp	Tryptophan
TRT	Trennung-Reaktion-Trennung (zweidimensionales DC-Verfahren)

1	EINLEITUNG	7
1.1	DIE HAUT UND IHRE SYMBIONTISCHE FLORA	8
1.2	DIE GATTUNG <i>MALASSEZIA</i>	9
1.2.1	<i>MALASSEZIA</i> -SPEZIES ALS LIPOPHILE HEFEN	9
1.2.2	EPIDEMIOLOGIE	9
1.2.3	SPEZIES	10
1.2.4	KULTUR	10
1.2.5	MORPHOLOGIE	11
1.3	DIE ERKRANKUNG PITYRIASIS VERSICOLOR	11
1.3.1	KRANKHEITSBILD	11
1.3.2	DIAGNOSTIK	14
1.3.3	EPIDEMIOLOGIE DER PITYRIASIS VERSICOLOR	16
1.4	PATHOGENESE DER PITYRIASIS VERSICOLOR	17
1.4.1	HYPERPIGMENTIERUNG	18
1.4.2	DEPIGMENTIERUNG	19
1.4.3	PIGMENTBILDUNG DURCH <i>MALASSEZIA</i> -HEFEN	20
2	PROBLEMSTELLUNG	21
3	METHODIK UND MATERIAL	22
3.1	ANZUCHT UND KULTUR DER <i>MALASSEZIA</i> –HEFEN	22
3.2	GEWINNUNG DES ROHEXTRAKTS	23
3.3	PROGRAMM ZUR AUFTRENNUNG DES ROHEXTRAKTES	24
3.4	SÄULENCHROMATOGRAPHIE	26
3.5	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE VERSUCHE	27
3.5.1	PH-ABHÄNGIGKEIT DER SUBSTANZEN	27
3.5.2	VERGLEICH MIT STANDARDS	28
3.5.3	UNTERSUCHUNG AUF INDOLE (EHRlich's REAGENZ)	29
3.5.4	ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT – TRT-VERSUCHE	30
3.6	PRÄPARATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	31
3.7	HPLC	32
3.7.1	ANALYTISCHE HPLC	32
3.7.2	PRÄPARATIVE HPLC	33
3.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG	34
3.9	TYROSINASEREAKTION	35
3.9.1	SYNTHESE DES NEUEN ISOLATS (LMU MÜNCHEN)	38
3.9.2	ÜBERPRÜFUNG DER SYNTHESE AUF IDENTITÄT MIT DEM NATURSTOFF	39
3.10	UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT DES NEUEN ISOLATS	40
3.10.1	UNTERSUCHUNG AUF INHIBITION DER TYROSINASE	40
3.10.2	UNTERSUCHUNG AUF AGONISMUS AM ARYL-KOHLLENWASSERSTOFF-REZEPTOR	40

4	ERGEBNISSE	42
4.1	INDUKTION VON PIGMENTEN UND FLUOROCHROMEN IN KULTUREN VON <i>M. FURFUR</i>	42
4.2	SÄULENCHROMATOGRAPHIE	43
4.3	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	48
4.4	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE VERSUCHE	50
4.4.1	PH-ABHÄNGIGKEIT DER SUBSTANZEN	50
4.4.2	VERGLEICH MIT STANDARDS	51
4.4.3	UNTERSUCHUNG AUF INDOLE (EHRlich'S REAGENZ)	52
4.4.4	ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT – TRT-VERSUCHE	52
4.5	TYROSINASEINHIBITION	53
4.5.1	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE DER HEMMFRAKTIONEN	57
4.6	HPLC	62
4.6.1	ANALYTISCHE HPLC	62
4.6.2	PRÄPARATIVE HPLC	62
4.7	TYROSINASEREAKTION	63
4.8	STRUKTURAUFKLÄRUNG	64
4.8.1	ÜBERPRÜFUNG DER MÜNCHNER SYNTHESE AUF IDENTITÄT MIT DEM NATURSTOFF	66
4.8.2	ÜBERPRÜFUNG VON MALASSEZIN AUF HEMMUNG DER TYROSINASE	66
4.9	MALASSEZIN UND SEINE EIGENSCHAFT ALS AGONIST DES ARYL-KOHLLENWASSERSTOFF-REZEPTORS	68
5	DISKUSSION	70
5.1	TRYPTOPHANMETABOLITE ALS MÖGLICHE URSACHE VON HYPER- UND DEPIGMENTIERUNGEN	70
5.2	MALASSEZIN ALS AGONIST DES ARYL-KOHLLENWASSERSTOFF-REZEPTORS	77
5.3	EINBINDUNG DES INDOLSTOFFWECHSELWEGES IN DIE PATHOGENESE DER PITYRIASIS VERSICOLOR	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	LITERATURVERZEICHNIS	83
8	TABELLENANHANG	95

1 Einleitung

Die Pityriasis versicolor gilt als eine der häufigsten superfiziellen Mykosen weltweit (Götz 1962, Hay 1992). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Hyperpigmentierungen eines breiten Farbspektrums mit rötlichen, gelben, bräunlichen bis schwarzen Makulae der Haut (Ruete 1933, Alijabre et al 2001, Gupta et al 2002). Die hyperpigmentierten Areale zeigen leichte Schuppung, fluoreszieren im UV-Licht und können in lang anhaltende Hypo- und Depigmentierungen übergehen.

Obwohl die Erkrankung schon 1802 von Willan beschrieben und ihr erregerbedingter Charakter bereits 1846 durch Eichstedt erkannt wurde, wirft sie heute noch viele Fragen auf. Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit Art und Vorkommen ihres Erregers, seinen Stoffwechselbedürfnissen und nicht zuletzt seiner taxonomischen Einordnung. Bei dem Erreger handelt es sich um eine Hefe der Gattung *Malassezia*. Hefen dieser Gattung gehören zur physiologischen Hautflora und können bei bis zu 100% der Bevölkerung nachgewiesen werden (Robert 1969, Noble 1978). Dennoch tritt die Pityriasis versicolor in unseren Breitengraden nur bei 0,5-1 % der Bevölkerung auf, in den Tropen findet sie sich bei bis zu 50% der Bevölkerung. Einzelne Faktoren wie beispielsweise klimatische Einflüsse auf das Auftreten der Erkrankung sind bekannt (Gupta 2002). Ungeklärt ist, warum ein Keim der residenten Hautflora bei einem Teil der Menschen die Pityriasis versicolor hervorruft, andere aber – trotz Besiedlung - vor der klinischen Ausprägung vollständig geschützt bleiben. Fragen wirft insbesondere auch die Pathogenese der charakteristischen vielfarbigen Hyperpigmentierungen der Pityriasis versicolor auf, auch die Entstehung der Depigmentierungen der sogenannten Pityriasis versicolor alba sind letztendlich nicht geklärt. Diese Arbeit befasst sich mit dem Pigmentstoffwechsel von *Malassezia*-Hefen und möchte einen Beitrag zur Pathogenese der Hyper- und Depigmentierungen der Pityriasis versicolor liefern.

1.2 Die Gattung *Malassezia*

1.2.1 *Malassezia*-Spezies als lipophile Hefen

Malassezia-Spezies sind seit über 100 Jahren als ubiquitär verbreitete Keime der Hautflora von Warmblütern bekannt (Marples 1965, Sloof 1971, Noble 1981, Guého 1996). Sie gehören zu den Hefen. Diese stellen fruchtkörperlose, als Einzeller lebende Pilze dar, die sich durch Sprossung vermehren.

Malassezia-Spezies sind mit Ausnahme von *M. pachydermatis* von einer Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren abhängig und gehören damit zu den wenigen obligat lipiddependenten Mikroorganismen. (Kwon Chung 1992, Ingham 1993)

Die Teleomorphe der *Malassezia*-Hefen ist nicht bekannt und somit ist eine endgültige taxonomische Einordnung derzeit noch nicht möglich. Aufgrund bestimmter Charakteristika wie lamellenartiger Zellwandstruktur, Färbeverhalten, d.h. positive Diazoniumblaureaktion (Sloof 1970, Hagler und Ahearn 1981) und Harnstoffspaltung (Simmons und Ahearn 1987) können sie jedoch den Basidiomyceten innerhalb der Familie der Kryptokokken zugeordnet werden (Yarrow und Ahearn 1984). Genetische Studien bestätigten diese taxonomische Einordnung (Guého, Kurtzman und Peterson 1989; Guillot und Guého 1995).

1.2.2 Epidemiologie

Entsprechend ihrer Lipiddependenz folgt das Verteilungsmuster der *Malassezia*-Hefen der Dichte der Talgdrüsen mit besonders dichter Besiedlung der seborrhoischen Areale wie vorderer und hinterer Schweißrinne an Brust und Rücken. Ebenfalls dicht besiedelt sind behaarter Kopf, Stirn und Nasolabialrinne, während die Extremitäten mit Ausnahme der Ellenbeugen beinahe keine *Malassezia*-Hefen aufweisen (Roberts 1969, Faergemann, Aly und Maibach 1983).

Die Besiedlungsdichte der Haut durch *Malassezia*-Hefen variiert mit dem Alter und wird durch das sich verändernde Lipidangebot der Haut erklärt: Neugeborene und Kinder bis zum Eintritt der Pubertät weisen keine bzw. nur geringe Besiedlung auf. Ein sprunghafter Anstieg der Keimzahl erfolgt im Alter von 15 (Jungen) bzw. 12 Jahren (Mädchen) mit der postpubertären Vergrößerung und funktionellen Reife der Talgdrüsen (Faergemann und Fredriksson 1980; Calman et al. 1970). Die höchsten Keimzahlen finden sich in der zweiten und dritten Lebensdekade, der Zeitspanne maximaler Talgdrüsenaktivität (Cotterill et al.

1972). Mit abnehmender Talgproduktion im Alter sind die Keimzahlen rückläufig (Bergebrant und Faergemann 1988).

Weitere Erklärungsansätze der unterschiedlichen Besiedelungsdichte zwischen Kindern und Erwachsenen sind Variationen in der Zusammensetzung der Hautlipide sowie das Vorliegen eines unterschiedlichen Aminosäuremusters bei Kindern und Erwachsenen (El-Hefnawi, El-Gothamy und Refai 1971; Gloor, Kionke und Friedrich 1975; Gloor, Kumpel und Friedrich 1951).

1.2.3 Spezies

Mittlerweile werden sieben verschiedene Spezies der Gattung *Malassezia* differenziert. Sie unterscheiden sich in morphologischen, biochemischen und molekularbiologischen Kriterien. Eine eindeutige Beziehung zwischen den einzelnen Spezies und verschiedenen Krankheitsbildern konnte bisher nicht hergestellt werden (Guého et al. 1996). Eine Übersicht über die bekannten *Malassezia*-Spezies und ihre jeweiligen Beschreiber gibt Tabelle 1:

<i>Malassezia</i> -Spezies	Entdecker	Referenzstamm- Nummer
<i>M. furfur</i>	Baillon 1889	CBS 1878
<i>M. pachydermatis</i>	Dodge 1935	CBS 1879
<i>M. sympodialis</i>	Simmons/Guého 1990	CBS 7222
<i>M. globosa</i>	Guého/Midgley/Guillot 1996	CBS 7966
<i>M. slooffiae</i>	Guého/Midgley/Guillot 1996	CBS 7956
<i>M. restricta</i>	Guého/Midgley/Guillot 1996	CBS 7877
<i>M. obtusa</i>	Guého/Midgley/Guillot 1996	CBS 7976

Tab. 1: Bekannte *Malassezia*-Spezies und ihre Erstbeschreiber

1.2.4 Kultur

Die Lipiddependenz der meisten *Malassezia*-Spezies blieb lange unerkannt. Daher gelang die Kultur von *Malassezia*-Hefen erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Als obligat lipophile Hefen benötigen *Malassezia*-Spezies einen Lipidzusatz aus mittellangen bis langkettigen Fettsäuren zum Nährmedium (Shifrine und Marr 1963, Wilde und Stewart 1968, Nazarro Porro et al. 1976). Eine Ausnahme bildet *M. pachydermatis*, eine Spezies, die nicht wie alle übrigen zur normalen Keimflora des Menschen gehört, sondern im Tierreich anzutreffen ist. Sie ist ohne Lipidzusatz kultivierbar, unter Lipidzusatz findet sich jedoch beschleunigtes Wachstum

(Guého 1996). Für die Kultur wird entweder Basalmedium (z. B. Sabouraud-Dextrose-Agar) mit einer Lipidquelle überschichtet oder es finden spezielle lipidhaltige Nährböden wie Dixon- (van Abbé 1964) oder Leeming-Notman-Agar (Leeming 1987) Verwendung. Andere lipidhaltige Nährmedien wurden beschrieben (Korting 1991, Guého 1996).

Malassezia-Spezies zeigen cremefarben-gelbliche Kulturen von fruchtig-hefigem Geruch (Van Abbé 1964, Labows 1975). Es findet sich keine Luftmyzelbildung, die Oberflächenstruktur der Kolonien wird teilweise als charakteristisch für die einzelnen Spezies angegeben (Van Abbé 1964, Sloof 1971, Guého 1996).

1.2.5 Morphologie

Morphologisch zeigt sich bei *Malassezia*-Hefen von Spezies zu Spezies eine beachtliche Variation der Zellform: es finden sich runde (2,5-5µm im Durchmesser), ovale oder zylindrische (Ø1,5-3µm, Länge2,5-8µm) Sproßzellen (Guého 1996). *Malassezia*- Hefen weisen eine besonders dicke Zellwand auf (0,12µm), die sich durch einen deutlich höheren Lipidanteil (15%) von anderen Hefen wie beispielsweise der *Saccharomyces* spp. mit 1-2% Lipidanteil unterscheidet (Thompsen 1970). Der hohe Lipidanteil im Zusammenspiel mit dem lamellenartigen Aufbau der Zellwand (Barfatani, Munn und Schjeide 1964; Swift und Dunbar 1965; Keddie 1966; Breathnach, Gross und Martin 1976; Guillot, Guého und Pévost 1995, Mittag 1995) ist vermutlich für die hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen sowie für die hohe mechanische Stabilität und osmotische Resistenz der Zellen verantwortlich (Brotherton 1967).

1.3 Die Erkrankung Pityriasis versicolor

1.3.1 Krankheitsbild

Die Pityriasis versicolor stellt eine der durch *Malassezia*-Hefen verursachten Erkrankungen dar. Sie gilt als eine der häufigsten superfiziellen Mykosen der Haut (Götz 1962, Hay 1992) und ist die weltweit häufigste Dermatose, die mit Pigmentverschiebungen der Haut einhergeht (Sunenshine et al 1998). Die Erstbeschreibung der Erkrankung findet sich bei Willan im Jahr 1802, ihr erregerbedingter Charakter wurde bereits 1846 von Eichstedt erkannt.

Klinisch werden zwei Varianten der Pityriasis versicolor unterschieden, die hyperpigmentierte Form sowie die Pityriasis versicolor alba, die mit De- bzw. Hypopigmentierungen einhergeht (Balus 1982, Hay 1992).

Die hyperpigmentierte Pityriasis versicolor (Abb.2) manifestiert sich durch rundliche, teils konfluierende makulöse Hyperpigmentierungen der Haut. Diese Veränderungen finden sich besonders in den seborrhoischen Arealen von Brust, Rücken und Gesicht. Der Beinamen „versicolor“ beschreibt das charakteristische breite Farbspektrum der Hyperpigmentierungen der Erkrankung. In der Literatur finden sich Angaben zu gelben, rötlich-erythematösen und bräunlichen bis hin zu schwarzen Hautläsionen (Ruete 1928, Gupta et al 2002, Sunenshine 2001). Durch Farbwechsel einzelner Flecken finden sich bei den Betroffenen gleichzeitig Läsionen von verschiedener Farbe. Die Hyperpigmentierungen sind von einer kleieförmigen (pityriasiformen) Schuppung bedeckt. Charakteristisch ist das sogenannte „Hobelspanphänomen“, das die leichte Abstreifbarkeit der Schuppung von den Herden beschreibt (Besnier und Balzer 1882). Im Licht der Wood-Lampe (langwelliges UV-Licht der Wellenlänge 366 nm) zeigen die Hyperpigmentierungen eine gelb-grünliche Fluoreszenz (Abb. 3). Diese ist schon bei sehr kleinen klinisch noch nicht sichtbaren Herden vorhanden und wird daher zur Bestimmung der Ausdehnung der Erkrankung genutzt (Gupta 2002).

Lang anhaltende Depigmentierungen nach Abheilung der hyperpigmentierten Form der Pityriasis versicolor sind seit langem bekannt (Gudden 1853, Naylor 1866) und werden als Pityriasis versicolor alba bezeichnet. Bei den Erkrankten finden sich bevorzugt in den seborrhoischen Arealen scharf begrenzte, gleichmäßig hypopigmentierte Makulae unterschiedlichen Durchmessers. Die Herde treten besonders auf schwarzer und gebräunter Haut deutlich hervor (Abb. 4). Die pityriasiforme Schuppung kann in den depigmentierten Herden vollständig fehlen (Throne 1928, Lockshin 1973).

In den überwiegenden Fällen entwickeln sich die Depigmentierungen spontan im Anschluss an das hyperpigmentierte Stadium der Pityriasis versicolor, insbesondere aber unter Einfluss von UV-Licht (Lutz 1892, Adamson 1949, Lockshin 1972, Moynham 1976, El-Gothamy 1975, Gupta et al 2002). Allerdings folgt nicht jeder (hyperpigmentierten) Pityriasis versicolor zwangsläufig ein Stadium mit Depigmentierungen, auch Abheilungen ohne Depigmentierungen werden beobachtet (El-Gothamy 1975). Das gleichzeitige Vorkommen von Hyper- und Depigmentierungen ist möglich (Ruete 1933, Throne 1928, Sunenshine 1998).

Die Pityriasis versicolor alba kann allerdings auch ohne hyperpigmentiertes Vorstadium auftreten. Beschreibungen von Hypo- und Depigmentierungen als eigenständige Variante der



Abb. 2: Hyperpigmentierungen der Pityriasis versicolor

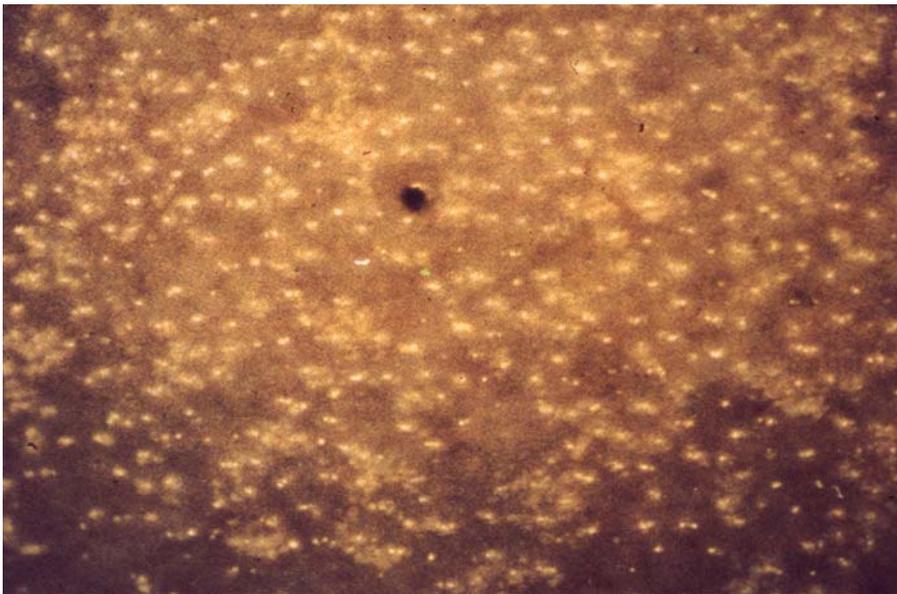


Abb. 3: Fluoreszenz der Hautveränderungen im UV-Licht

Erkrankung besonders auf schwarzer Haut finden sich bei Pardo-Castello (1932), Jelliffe (1954) und Marples (1965). Auch wenn Kinder wesentlich seltener als Erwachsene von der Pityriasis versicolor betroffen sind, herrscht bei ihnen mit 72% die hypo- bzw. depigmentierte Form der Pityriasis versicolor vor (Bouassida et al 1998).

Von den Betroffenen wird die Erkrankung hauptsächlich als kosmetische Beeinträchtigung empfunden (Chetty, Kamalam und Thambiah 1979). Bei stärker entzündlich verlaufenden Formen wird gelegentlich über Juckreiz und Brennen beim Schwitzen berichtet (Götz 1962, Borelli 1991, Hay 1992). Beeinträchtigend sind insbesondere die hohe Rezidivhäufigkeit der Erkrankung sowie die lang anhaltenden Depigmentierungen, die durch Konfluenz beträchtliche Ausmaße annehmen können.

1.3.2 Diagnostik

Die Diagnose der (hyperpigmentierten) Pityriasis versicolor erfolgt überwiegend klinisch anhand der typischen Läsionen mit kleieförmiger Schuppung, Hobelspanphänomen und der charakteristischen Fluoreszenz im Wood-Licht (s. 1.3.1).

Entscheidend für die Diagnose ist der Pilznachweis im Nativpräparat aus betroffenen Hautarealen. Im Unterschied zum Nativpräparat von normaler Haut, in dem die *Malassezia*-Hefen als Teil der residenten Hautflora in Form von Sproßzellen zu finden sind, sind im Nativpräparat von betroffener Haut neben Sproßzellen auch Hyphen zu erkennen. Für die Erkrankung charakteristisch ist ein Bild mit breiten, kurzen segmentierten Hyphen und traubenartigen Sporenhäufchen aus 10-30 Einzelsporen, auch bezeichnet als „spaghetti and meat-balls“ (Abb. 5). Hyphenbildung auf gesunder Haut wird ebenfalls beschrieben, ist insgesamt jedoch deutlich seltener als unter der Erkrankung; Hyphen im Nativpräparat geben daher bei entsprechender Klinik den entscheidenden Hinweis. Die Anlage einer Pilzkultur ist nicht aussagekräftig, da *Malassezia*-Hefen zur residenten Hautflora gehören und somit auch von gesunder Haut isoliert werden können (in Kultur keine Ausbildung des Hyphenstadiums).



Abb. 4: Pityriasis versicolor alba: depigmentierte Areale auf dunkler Haut

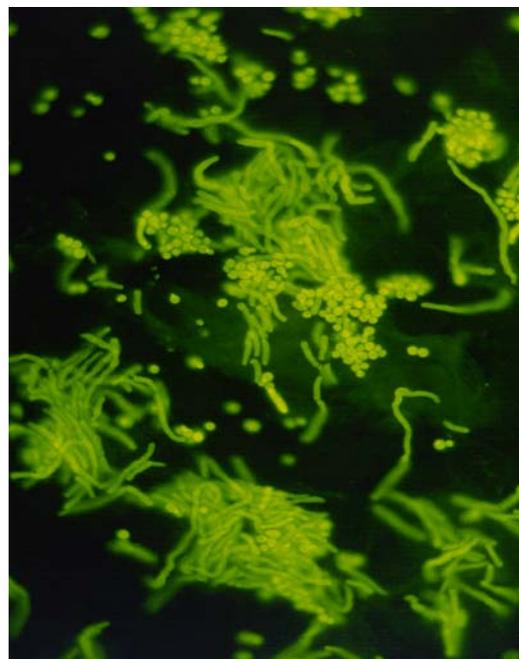


Abb. 5: Diagnostik der Pityriasis versicolor: im Nativpräparat finden sich Sproßzellen und Hyphen

1.3.3 Epidemiologie der Pityriasis versicolor

Aus epidemiologischen Daten wurden verschiedene Prädispositionsfaktoren für das Auftreten der Erkrankung abgeleitet. Von besonderer Relevanz sind hier Makro- und Mikroklima sowie das Erkrankungsalter. Vermutet werden erbliche Einflüsse, die Rolle eines veränderten Immunsystems wird diskutiert.

Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt im Jugendlichen- und jungen Erwachsenenalter (Burke 1961, McAleer 1980) und geht konform mit der höchsten Besiedlungsdichte durch *Malassezia*-Hefen, die sich in diesem Lebensabschnitt findet (Cotterill et al. 1972). Von Bedeutung ist hier die Veränderung der Hautlipide in der Pubertät (Roberts 1969, s. auch 1.2.2).

Die geographische Verteilung der Erkrankung zeigt den starken klimatischen Einfluß auf das Auftreten der Erkrankung. Im tropischen und subtropischen Raum erreicht die Pityriasis versicolor Prävalenzen von bis zu 50% innerhalb des dermatologischen Patientenguts (Marples 1950), in gemäßigten Breiten ist die Erkrankung deutlich seltener (0,5-2% der dermatologischen Patienten). Zudem findet sich in den gemäßigten Breiten eine starke jahreszeitliche Abhängigkeit mit Erkrankungsgipfeln im Frühjahr und Sommer (Balus 1982). Anlagebedingte Hyperhidrose (Razack 1977) sowie das Tragen von okkludierender Kleidung (Ruete 1933, Gupta 2002) mit resultierendem feuchtwarmen Mikroklima und erhöhter CO₂-Spannung der Haut stellen weitere Prädispositionsfaktoren dar. Berufs- und Freizeitverhalten (Sportler) sind ebenfalls über Beeinflussung des Mikroklimas von Bedeutung (El Hefnawi et al. 1971, Stefanovic 1976, Mc Daniel 1977, Götz 1980, Conklin 1990). Von der Erkrankung Betroffene weisen zumeist keine weiteren Erkrankungen auf. Dennoch wird die Pityriasis versicolor häufiger bei Patienten mit Hyperthyreose und Tuberkulose (Ruete 1933) gefunden; beiden Erkrankungen gemeinsam ist die erhöhte Schweißneigung mit Beeinflussung des Mikroklimas.

Begünstigende Lokalfaktoren stellen somit hohe Durchfeuchtung (Schwitzen, hohe Temperaturen, Okklusion), mit der Durchfeuchtung verbundene Veränderungen des Hautmilieus sowie ein besonderes Lipidangebot der Haut (Pubertät, junges Erwachsenenalter) dar. Vergleichende Untersuchungen zum Fettsäure- und Aminosäuremuster in erkrankten und gesunden Hautarealen bestätigen eine veränderte Zusammensetzung von Gesamtlipiden und Aminosäurefraktionen, erlauben jedoch nur unsichere Aussagen über ein verändertes Hautmilieu als eigentliche Ursache der Erkrankung (Burke 1962).

Geschlechtspräferenz besteht bei der Pityriasis versicolor nicht (Gupta et al 2002). Positive Familienanamnesen in mehr als 17% der Fälle bei Fehlen von Infektionen bei Ehepartnern Erkrankter weisen auf erbliche Einflüsse hin (Burke 1961, Faergemann 1995, Sunenshine 1998, Gupta et al 2002). Aufgrund des familiären Verteilungsmusters wird ein multifaktorieller erblicher Einfluß angenommen (Hafez et al 1985).

Die Rolle eines veränderten Immunsystems wird kontrovers diskutiert. Gehäuftes Auftreten der Pityriasis versicolor (Burke 1962) mit atypischen und besonders schweren Verläufen (Burkhart et al 1981, Daneshvar et al 1987, Elmets 1994) unter medikamentöser Immunsuppression und HIV-Infektion wird beschrieben. Aly et al (1996) hingegen heben die Sonderstellung der Pityriasis versicolor hervor, da sie im Gegensatz zu anderen Pilzinfektionen nicht gehäuft bei HIV-Infektionen auftritt.

1.4 Pathogenese der Pityriasis versicolor

Die Pathogenese der Pityriasis versicolor ist bis heute nicht vollständig geklärt. Da sich bei der Erkrankung häufiger als auf gesunder Haut die Myzelform der Hefen findet, gehen viele Autoren davon aus, daß der Übergang der *Malassezia*-Hefen vom harmlosen Kommensalen zum Erreger der Pityriasis versicolor in der Ausbildung eines Hyphenstadiums besteht (Faergemann 1979; McGinley 1970). So liegt die Häufigkeit von Hyphen bei Pityriasis versicolor-Patienten in Läsionen bei 100%, in nicht-läsionaler Haut am Kopf bei 50% und am Stamm bei 42% (Mc Ginley 1970).

Einzelne Faktoren, die für diesen Phasenwechsel verantwortlich sein könnten, wurden aus den unter 1.3.3. genannten Prädispositionsfaktoren abgeleitet. In experimenteller Umsetzung dieser Faktoren in Kulturbedingungen zeigte sich, daß nur unter hoher Feuchtigkeit, hohen Temperaturen sowie hoher CO₂-Spannung ein Hyphenstadium in Kultur erzielt werden kann. Dabei ist das Hyphenstadium in Kultur nur schwierig und inkonstant zu induzieren (Dorn 1977, Nazzaro 1977, Saadatzaheh 2001). Da zudem Hyphen auch in 6-7% auf der Haut Gesunder beobachtet werden (Roberts 1969, McGinley 1970), ist über die Hyphen-Phase und ihre tatsächliche Bedeutung für das Krankheitsbild nur sehr wenig bekannt (Ashbee 2002).

Welcher der sieben Spezies der Gattung *Malassezia* der Erreger der Pityriasis versicolor angehört, ist strittig. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei dem Erreger um die Spezies *M. furfur* handelt (Guého et al 1989). Aufgrund der Studien der letzten fünf Jahre wird dies aber in Frage gestellt (Gupta et al 2002). Zur Zeit werden als mögliche Erreger *M.*

globosa (Crespo et al 2000, Nakabayashi et al 2000) und *M. sympodialis* (Gupta et al 2001) diskutiert, da diese Spezies am häufigsten in Läsionen der Pityriasis versicolor nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig werden diese beiden Spezies aber auch von gesunder Haut am häufigsten isoliert. So konnte in einer Untersuchung von Nakabayashi et al (2000) *M. globosa* von Läsionen der Pityriasis versicolor in 55% der Fälle isoliert werden, von gesunder Haut hingegen in 51% der Fälle, ein deutlicher Unterschied ist somit nicht erkennbar. In weiteren Untersuchungen schwankt der Nachweis von *M. globosa* in läsionaler Haut zwischen 25 und 97% (Crespo et al 1999, Crespo et al 2000, Gupta et al 2001). Bei allen Untersuchungen handelt es sich allerdings um quantitative Studien, die letztendlich nicht die erforderlichen qualitativen Daten liefern können, welche und ob überhaupt eine Spezies der *Malassezia*-Hefen bei der Pityriasis versicolor vorherrscht (Ashbee and Evans 2002).

1.4.1 Hyperpigmentierung

Die Genese der Hyperpigmentierungen bei der Pityriasis versicolor ist unklar. Lange Zeit wurden die Hyperpigmentierungen der Haut als entzündliche Reaktion der Haut auf die *Malassezia*-Hefen im Stratum corneum verstanden (Dotz 1985, Kwon-Chung 1992, Hay 1992, Galadari 1998). Dieser Interpretation widersprechen histologische Untersuchungen, die entweder kein oder nur ein sehr gering ausgeprägtes entzündliches Infiltrat der oberen Dermis zeigen (Ruete 1933; El-Hefnawi et al. 1972; Charles et al. 1973; Ackermann 1997). Selbst eine nur gering ausgebildete Entzündungsreaktion kann jedoch nicht das breite Farbspektrum der gelben, roten bis zu braun-schwarzen Hautläsionen der Pityriasis versicolor erklären.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die bräunlichen Hyperpigmentierungen war die Beobachtung abnorm vergrößerter Melanosomen in den Melanozyten und Keratinozyten der erkrankten Hautareale (Allen 1972, Charles 1973). Neuere Untersuchungen widerlegen allerdings diese Beobachtungen und geben gleiche Größe und Zahl von Melanozyten und Melanosomen in hyperpigmentierter und normal pigmentierter Haut an (Galadari et al. 1992; Konrad et al. 1973). Beschreibungen bräunlicher Hyperpigmentierungen der Pityriasis versicolor in Läsionen der Vitiligo (Dotz 1985) sprechen ebenfalls gegen die Beteiligung melanozytärer Strukturen, da in den Läsionen der Vitiligo aufgrund autoimmunologischer Vorgänge keine Melanozyten mehr vorhanden sind.

Andere Ansätze wie Hyperpigmentierung der Herde durch Verdickung des Stratum corneum oder durch die große Anzahl von Pilzelementen in den betroffenen Arealen (Galadari 1998) wurden diskutiert, konnten aber nicht belegt werden.

Bei allen genannten Ansätzen fehlt zudem eine Erklärung für die charakteristische Fluoreszenz der Hautveränderungen im UV-Licht, die regelhaft bei der Erkrankung zu finden ist.

1.4.2 Depigmentierung

Zur Pathogenese der im Rahmen der Pityriasis versicolor alba auftretenden Depigmentierungen existieren zwei kontrovers diskutierte Modelle.

Lange Zeit wurden die Depigmentierungen der Pityriasis versicolor alba als Pseudoleukoderm aufgefasst; dabei ging man von einer rein physikalischen Filterwirkung des UV-Lichts durch Schuppen- und Pilzauflagerungen in den Herden der Pityriasis versicolor aus (Lutz 1892, Kistiakowsky 1927, Wertheim 1928, Lewis 1936). Dafür sprachen Beobachtungen von Depigmentierungen in vormalig hyperpigmentierten Arealen nach UV-Bestrahlung (Wertheim und Kistiakovsky). Insbesondere das vollständige Fehlen eines Erythems in den befallenen Hautarealen bei deutlicher Umgebungsreaktion der Haut bei UV-Bestrahlung wurde als Hauptargument für das Vorliegen eines (physikalischen) Lichtfilters angesehen.

Heutzutage wird vom Vorliegen eines echten Leukoderms bei der Pityriasis versicolor alba durch biologisch-chemische Interaktion zwischen Erreger und Pigmentierungsprozeß der Haut ausgegangen.

Dafür sprechen insbesondere drei Gründe:

- Klinische Beobachtungen von Depigmentierungen in nicht belichteter Haut wie der Genitoanalregion (Artom 1930, Blumenthal 1971, Nia 1979) und Depigmentierungen schwarzer Haut (Sulzberger und Satenstein in Lewis 1935, Goldsmith 1936, Jeliffe 1954).
- Die deutlich zeitlich verzögerte Repigmentierung der Herde trotz nicht mehr vorhandener Schuppung und negativem Erregernachweis.
- Die histologisch und elektronenmikroskopisch sichtbare melanozytäre Schädigung mit eingeschränkter Melanogenese.

Insbesondere die degenerativen Veränderungen der Melanozyten mit mitochondrialer und zytoplasmatischer Vakuolisierung sowie Verkleinerung und verringerte Anzahl von Melanosomen (Galadari 1982, Brethnach 1975) lassen eine Störung der Melanogenese vermuten.

Der komplexe Weg der Melanogenese bietet zahlreiche Angriffsstellen für Interaktionen des Erregers bzw. seiner Metabolite. Die Untersuchungen bei der Pityriasis versicolor alba fokussieren sich hier auf die Beeinflussung der Tyrosinase, die als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym innerhalb der Melanogenese eine Schlüsselposition einnimmt:

Jung et al zeigten eine Hemmung dieses Enzyms durch ein Extrakt aus Schuppen der Pityriasis versicolor (1976). Die Hemmwirkung wurde später auf Dicarbonsäuren zurückgeführt, die aus Kulturen von *Malassezia*-Hefen isoliert werden können (Nazarro-Porro 1978), ohne dass diese allerdings tatsächlich im Schuppenextrakt nachgewiesen wurden (Bojanowsky 1979). Insbesondere die Azelainsäure ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7\text{-COOH}$), eine der isolierten Dicarbonsäuren, hemmt in vitro das Schlüsselenzym der Melanogenese (Tyrosinase) und stört so einen der ersten Schritte der Melaninbildung.

Folgeuntersuchungen zeigten jedoch, dass Azelainsäure in ihrer angenommenen in-vivo-Konzentration die Melanogenese gesunder Melanozyten weder in vitro noch in vivo beeinflussen konnte (Breathnach 1984, Robins 1987). Zudem handelt es sich bei der Azelainsäure um eine intrazelluläre Substanz, eine spontane Freisetzung der Azelainsäure aus den Hefezellen wurde nicht beobachtet; ihre extrazelluläre Wirksamkeit ist somit zumindest fraglich. Azelainsäure kann regelmäßig aus Kulturen von *Malassezia*-Hefen isoliert werden. Da die Hefen zur residenten Flora der Haut gehören, müssten dann aber durch Azelainsäure hervorgerufene Depigmentierungen bei jedem Menschen in den besiedelten Arealen auftreten. Weitere Metabolite, die die Melanogenese beeinflussen könnten, wurden bisher nicht isoliert.

1.4.3 Pigmentbildung durch *Malassezia*-Hefen

Ein besonderer Stoffwechselweg von *M. furfur* in Stickstoffmangelsituationen wurde 1998 durch Mayser et al. beschrieben. Dabei zeigt *M. furfur* auf einem Minimalmedium aus einer Lipidquelle, Agar und Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle die Bildung eines braunen Pigments. Das gebildete Pigment fluoresziert im UV-Licht gelblich-grün. Es diffundiert in das zunächst durchscheinend klare Basalmedium, so dass die Kulturplatte innerhalb von zwei Wochen eine homogene Braunfärbung annimmt (Abb. 10 im Ergebnisteil). Bei chromatographischer Trennung zeigt das Pigment im sichtbaren Licht eine Vielzahl verschiedenfarbiger Banden mit Fluoreszenz im UV-Licht (Abb. 11 und 12 im Ergebnisteil). Die Bildung von Pigmenten und Fluorochromen scheint dabei spezifisch für Stämme der Spezies *Malassezia furfur* zu sein.

2 Problemstellung

Die Gabe von Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle induziert in *Malassezia furfur* die Bildung von Pigmenten und Fluorochromen. *Malassezia*-Hefen gelten als Erreger der Pityriasis versicolor. Menschen, die von dieser Erkrankung betroffen sind, zeigen hyperpigmentierte Hautläsionen eines breiten Farbspektrums, die im Woodlicht (UV-Quelle) fluoreszieren. Die Hyperpigmentierungen können im Laufe der Erkrankung in depigmentierte Areale übergehen, in denen die Melaninsynthese lang anhaltend eingeschränkt ist (Pityriasis versicolor alba).

Für die bei der Erkrankung auftretenden Pigmentierungen und Depigmentierungen gibt es bisher keine schlüssigen Erklärungen (s. 1.4). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung folgender Fragen:

- 1) Haben die Bildung von Pigmenten und Fluorochromen in Kultur und die Hyperpigmentierungen der Erkrankung etwas miteinander zu tun?
- 2) Lassen sich Bestandteile des gebildeten Pigments aufreinigen?
- 3) Welche Aussagen über Struktur und chemische Eigenschaften einzelner Pigmentbestandteile sind möglich?
- 4) Finden sich im gebildeten Pigment Substanzen, die die bei der Pityriasis versicolor alba auftretenden Depigmentierungen erklären können?

3 Methodik und Material

3.1 Anzucht und Kultur der *Malassezia* –Hefen

Die Dauerkultur und die Pigmentinduktion der Spezies *Malassezia furfur* (CBS 1878 T) erfolgte auf zwei verschiedenen Nährböden.

Dauerkultur

Zur Dauerkultur von *M. furfur* wurde modifizierter (m)Dixon-Agar (Guého 1996, Guillot 1997) eingesetzt. Dieser wies folgende Zusammensetzung auf:

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

Zur Verhinderung bakterieller Kontamination des Nährmediums erfolgte der Zusatz von 0,04% Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Steinheim, FRG) sowie 0,005% Chloramphenicol (Merck, Darmstadt, FRG). Chloramphenicol fand in Form einer Stammlösung Verwendung (6,25 mg auf 1 ml Aqua dest., Sterilfiltration und Lagerung bei –20°C). Beide Antibiotika wurden aufgrund ihrer Temperaturempfindlichkeit dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C zugesetzt.

Pigmentinduktion

Die Pigmentbildung des CBS 1878 erfolgte auf p-(Pigment)Agar. Dieser Agar beinhaltet als alleinige Stickstoffquelle die Aminosäure Tryptophan und stellt ein optimiertes Medium für die Pigmentbildung dar. Das Medium selbst ist von durchscheinender Transparenz und zeigt keine spontane Braunverfärbung. Es setzt sich wie folgt zusammen:

30 ml Tween 80 ultra	(Sigma, St. Louis, USA)
20 g Agar reinst	(Merck)
0,5 g Cycloheximid	(Sigma, Aldrich, Steinheim, FRG)
0,05 g Chloramphenicol	(Merck, Darmstadt, FRG)
3 g Tryptophan	(Sigma)

Der Zusatz von Cycloheximid und Chloramphenicol ist für die Pigmentbildung nicht notwendig, erlaubt jedoch eine Verminderung des Kontaminationsrisikos. Diese beiden Substanzen und die Aminosäure Tryptophan wurden wegen ihrer Temperaturempfindlichkeit erst nach Sterilisation und Abkühlen des Mediums zugesetzt.

Pro Kulturplatte wurden sowohl für die Dauerkultur als auch für die Pigmentinduktion jeweils 10 µl des flüssigen Agars unter einer Laminar-air-flow-Arbeitsbank in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen. Nach Erkalten und Verfestigung des Agars wurde die wäßrige Pilzsuspension aus Sproßzellen von *M. furfur* in 0,9% steriler Kochsalzlösung mittels steriler Tupfer gleichmäßig auf das Medium aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 32°C im Brutschrank (Heraeus, Hanau, FRG). Für die Dauerkultur wurden die Kulturen in wöchentlichen Abständen auf frische Nährböden verimpft.

3.2 Gewinnung des Rohextrakts

Zur Gewinnung des Pigments wurden jeweils etwa 20 Kulturplatten p-Agar mit *M. furfur* (CBS 1878 T) beimpft. Nach 14-tägiger Inkubation bei 32°C wurde der Inhalt der Platten (pigmentierter Agar und Pilzzellen) mittels Pürierstab (Quelle, Fürth, FRG) homogenisiert und über 24 h in Ethylacetat (Merck) ausgezogen. Die Trennung fester Bestandteile vom in der Ethylacetatphase gelösten Pigment erfolgte durch Filtration über Glaswolle. Das filtrierte Extrakt wurde mit einem gleichen Volumen Aqua dest. versetzt und gut durchmischt. Die dabei entstehenden drei Phasen (Wasserphase, schaumige Phase mit Tween und Agarresten, Ethylacetatphase mit Pigment) wurden im Scheidetrichter voneinander getrennt. Die pigmenthaltige Ethylacetatphase wurde im Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kehlheim) getrocknet und anschließend in 96%igem Ethanol (Merck) aufgenommen. Die lichtgeschützte Lagerung erfolgte in Autosamplern bei -20°C bis zur weiteren Aufreinigung der Pigmente.

3.3 Programm zur Auftrennung des Rohextraktes

In ersten dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurde die Komplexität der Zusammensetzung des Rohextraktes deutlich. Um aus der Vielzahl der Substanzen insbesondere solche mit biologisch- pharmakologischer Aktivität herauszufiltern, erfolgte nach allgemeinen Untersuchungen zur Art der gebildeten Pigmente (3.5) und zur generellen Auftrennbarkeit die Aufreinigung von Einzelsubstanzen assay-gebunden. Das Hauptaugenmerk war dabei auf Inhibitoren der Tyrosinase gerichtet, die eine mögliche Erklärung für die Depigmentierungen bei der Erkrankung sein könnten. Daher wurde das in Abbildung 6 dargestellte Programm zur Isolierung von Einzelsubstanzen erarbeitet.

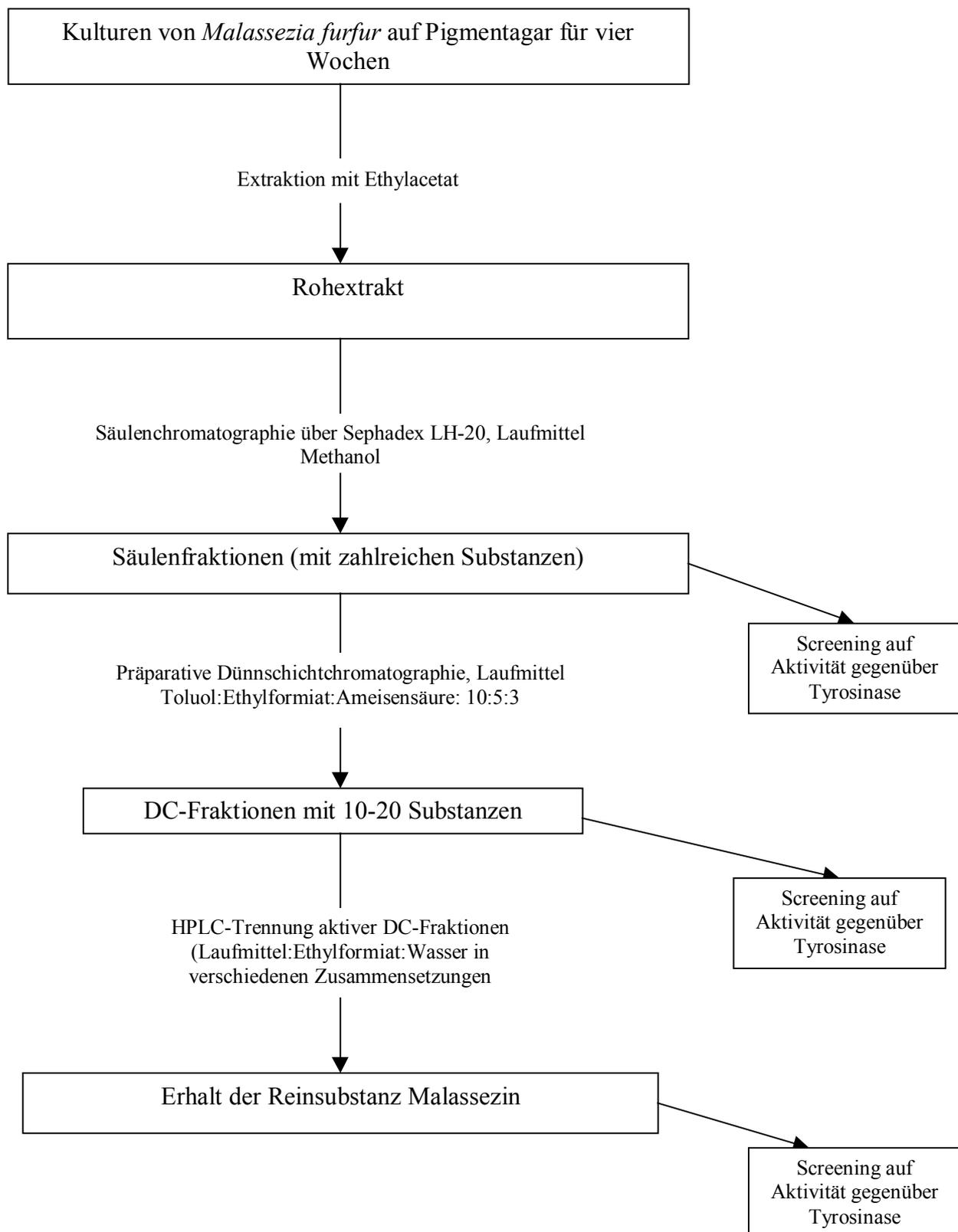


Abb. 6: Programm zur Aufreinigung der Substanzen

Ausschlaggebend für die jeweils nächste Aufreinigungsstufe war somit die Enzymhemmung im Tyrosinase-Assay. Die genaue Beschreibung dieses Assays findet sich unter 3.9.

3.4 Säulenchromatographie

Der erste Schritt der Auftrennung des Rohextrakts erfolgte durch Säulenchromatographie. Diesem Verfahren liegt das Prinzip der Gelpermeations- oder Ausschlußchromatographie zugrunde. Moleküle unterschiedlicher Größe werden in einer flüssigen (mobilen) Phase durch eine feste (stationäre) Phase geführt. Infolge eines Siebeffekts erfolgt dabei eine Verteilung der Moleküle nach ihrer Größe. Verantwortlich für den Siebeffekt ist die stationäre Phase, die aus einem Gel besteht, das Poren bestimmter Größe aufweist:

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

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, FRG). Aufgrund der Lipophilie der extrahierten Pigmente wurde für die stationäre Phase das lipophile Sephadex LH-20 (Sigma) eingesetzt. Sephadex LH-20 besteht aus dem stark vernetzten hochpolymeren Kohlenhydrat Dextran, das durch Hydroxyprolierung lipophile Eigenschaften aufweist und somit in organischen Solventien quellbar ist.

Die Säulenfüllung erfolgte mittels Einschlammtechnik nach 5-stündiger Quellung des Gels in Methanol, welches auch als mobile Phase eingesetzt wurde. Pro Säule wurden jeweils 2 ml Rohextrakt getrennt. Die Trennung erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 256 nm. Eine Beschleunigung der Säulentrennung wurde über einen Druckaufbau per Gummiball erzielt, so daß ein Fluß von etwa 19 ml/min erreicht werden konnte (Laufzeit der Säule ca. 130 min, Elutionsvolumen etwa 2500 ml). Das Rohextrakt wurde in bis zu 20 Fraktionen über die Säule getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Glasgefäßen aufgefangen, mittels Rotationsverdampfer getrocknet und in Ethanol gelöst in 5 ml-Probenröhrchen (Autosamplerröhrchen mit Teflon-Dichtung, Neolab, Heidelberg, FRG) überführt.

Die Säulen wurden nach jeder Trennung mit jeweils ca. 2000 ml Methanol gespült, um eventuell noch auf der Säule verbliebene Substanzen zu entfernen. Dennoch war eine regelmäßige Regeneration des Sephadex-Gels notwendig, um verminderte Trenneigenschaften des Gels zu reduzieren. Dazu wurde das Sephadex LH-20 mit 0,2 N NaOH über 12 h unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Natronlauge wurde dann über eine Nutsche abgesaugt und das Sephadex-Gel mit Aqua dest. bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes gewaschen.

3.5 Dünnschichtchromatographische Versuche

Die weitere Auftrennung der über Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen erfolgte über die Dünnschichtchromatographie.

Dazu wurden jeweils 10 µl der Säulenfraktionen (in 96%igem Ethanol gelöst) mittels Linomat IV (Camag, Muttenz, Switzerland) und einer 100 µl Hamilton Spritze (Linomat-Syringe, Camag) punktförmig auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, 20x20, Merck) aufgetragen.

Folgende Einstellung des Linomaten wurde für die analytische Dünnschichtchromatographie gewählt:

Plattenbreite	200 mm
Bandenbreite	5 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	8 sec/µl
Startposition	20 mm
Abstand zwischen Banden	3,5 mm
Volumen	10 µl
Druck Hauptventil	>100 bar
Druck Reduzierventil	4-5 bar

Tabelle 2: Einstellung des Linomaten für die analytische DC

Die Dünnschichtplatten wurden nach der Methode von Gill und Steglich (1987) mit einem Laufmittel der Zusammensetzung Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 entwickelt. Die jeweilige Entwicklungszeit der Platten betrug ca. 35 min.

Nach Entwicklung und Trocknen der Platten wurde die Zusammensetzung der einzelnen Säulenfraktionen beurteilt. Die R_f -Werte der Banden wurden sowohl im sichtbaren als auch im UV-Licht berechnet. Anhand der R_f -Werte und dem jeweiligen Bandenmuster war eine Überprüfung der (nicht immer gegebenen) Konstanz der säulenchromatographischen Trennung möglich.

3.5.1 pH-Abhängigkeit der Substanzen

Für eine erste Charakterisierung der Substanzen wurde die pH-Abhängigkeit der Banden überprüft, indem die gesamte Dünnschichtplatte sowohl NH_3 - (Ammoniaklösung etwa 33% reinst., Merck) als auch HCl-Dämpfen (Salzsäure rauchend, 37%, Merck) ausgesetzt wurde.

3.5.2 Vergleich mit Standards

Das Kulturmedium zur Pigmentinduktion (p-Agar) bestand nur aus einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan. Einzelne Banden konnten damit Tryptophanabkömmlinge darstellen könnten. Es erfolgte ein Vergleich der Banden mit Tryptophanderivaten unter Beachtung der beiden grundsätzlich möglichen Tryptophanstoffwechselwege:

1) Ommochrom Weg (Abb. 7): Ommochrome entstehen durch Öffnung des Pyrrolrings im Indolmolekül (Benzopyrrol)

Es handelt sich bei ihnen um eine Reihe natürlich vorkommender Verbindungen, die sich besonders als gelbe und rote Phenoxazinfarbstoffe als Pigmente bei Insekten finden (Butenandt 1956, Linzen 1974). Ebenso kommen sie bei höheren Pilzen vor (Schlunegger 1976).

2) Entstehung von Indolderivaten unter Erhaltung des Indolringsystems des Tryptophans.

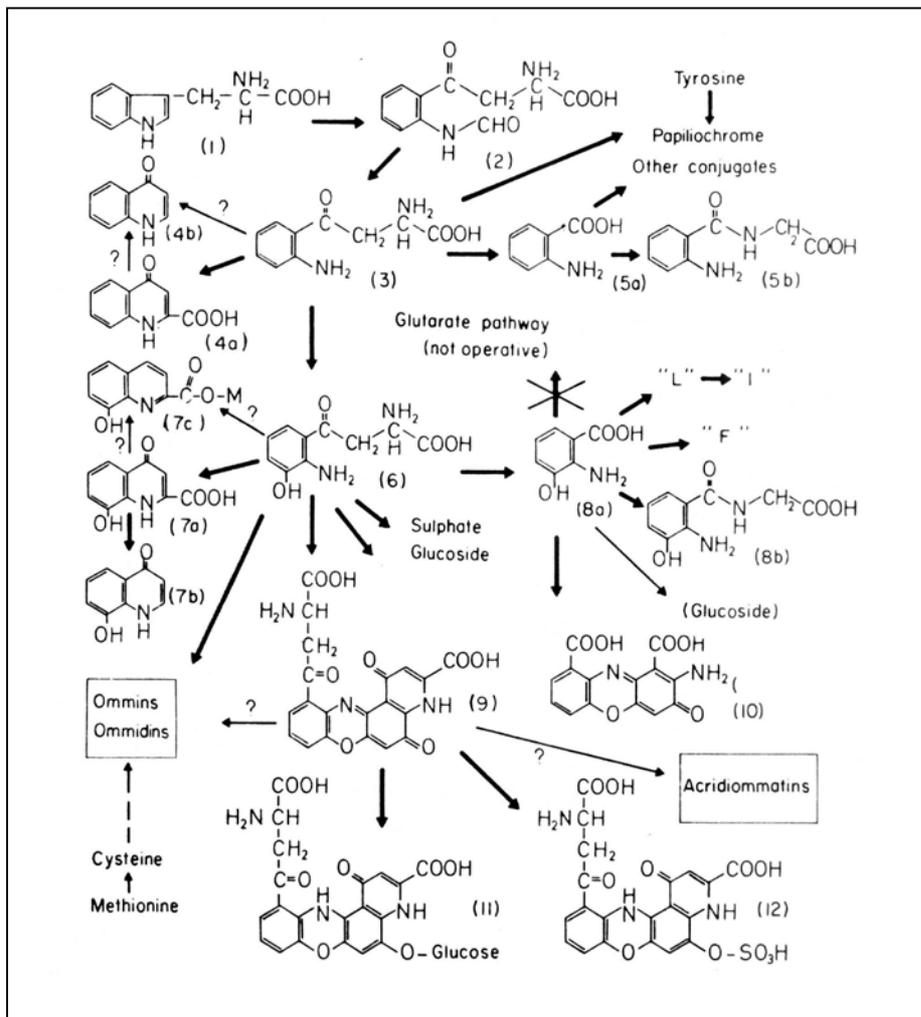


Abb. 7: Synthese von Ommochromen und Phenoxazinen (nach Linzen 1974)

1) Tryptophan; 2) Formyl-Kynurenin; 3) Kynurenin; 4a) Kynureninsäure; 4b) Kynurenin; 5a) Anthranilsäure; 5b) Anthraglycin; 6) 3-OH-Kynurenin; 7a) Xanthurensäure; 7b) 4,8-Dihydroxyquinolin; 7c) 8-OH-Quinalidinsäure-Methylester; 8a) 3-OH-Anthranilsäure; 8b) 3-OH-Anthraglycin; 9) Xanthommatin; 10) Cinnabarinsäure; 11) Rhodommatin; 12) Ommatin

Folgende Vergleichsstandards (1,0 mg/10 ml Ethanol 96%) für die beiden Stoffwechselwege fanden Verwendung:

Ommochromstoffwechselweg:	Vergleich mit Indolderivaten:
Xanthinsäure	2-OH Indol
Anthranilsäure	4-OH Indol
3-OH-Anthranilsäure	5-OH Indol
Kynurenin	3-Methyl-Indol
3-OH-Kynurenin	Indol-3-Aldehyd
Kynurensäure	Indol-3-Acetat-Säure
Xanthurensäure	Indoxylacetat
Phenoxazin	Indol
	Isatin
Vergleich mit weiteren Substanzen:	
Cycloheximid	Nährboden ¹
Tryptophan	

¹ für die Herstellung dieses Standards wurde eine Platte p-Agar mit Ethylacetat extrahiert, das Filtrat (Glaswolle) mittels Rotationsverdampfer eingengt und in Ethanol aufgenommen.

Tabelle 3: Verwendete Standards

Für den Vergleich wurden jeweils 10-20 µl der Standards sowie das säulenchromatographisch in acht Fraktionen unterteilte Rohextrakt per Linomat auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach Entwickeln der Platte in TAA und Trocknung wurden die R_F-Werte der Standards sowohl im sichtbaren Licht als auch bei 254 nm berechnet und mit denen der acht unter gleichen Bedingungen entwickelten Säulenfraktionen verglichen.

3.5.3 Untersuchung auf Indole (Ehrlich's Reagenz)

Indole und andere aromatische Amine können mit Ehrlich's Reagenz im Spray- Verfahren direkt auf der Dünnschichtplatte dargestellt werden. Bei dem stark sauren pH der aufgesprühten Lösung erscheinen Indolderivate sofort als zart rosa Banden. Verdunstet die überschüssige HCl, werden nach längerer Inkubation auch andere aromatische Amine in gelblich/ rötlichen Farbtönen sichtbar.

Für diese Untersuchungen wurde eine Lösung aus p-Dimethylaminobenzaldehyd 2,0 g (Merck) in 100 ml 6N HCl (hergestellt aus rauchender 37% HCl, Merck) mit einem Laborsprayer (Camag, Berlin, FRG) auf die entwickelten Dünnschichtplatten aufgesprüht.

3.5.4 Überprüfung der Stabilität – TRT-Versuche

Zur Klärung der Stabilität der dargestellten Pigmente wurde die TRT- Technik angewendet.

Bei dieser Technik handelt es sich um ein zweidimensionales chromatographisches Verfahren (Hesse 1972), das die Überprüfung äußerer physikalischer oder chemischer Einflüsse auf die chromatographisch dargestellten Substanzen erlaubt. Die Abkürzung TRT steht für Trennung – Reaktion – Trennung:

Das Probengemisch wird punktförmig in die linke untere Ecke des Platte aufgetragen. Nach der ersten chromatographischen Trennung (T) wird die Platte einer gezielten Reaktion (R) unterworfen, um dann nochmals, um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht, mit dem gleichen Laufmittel getrennt (T) zu werden. Befinden sich nach der zweiten Trennung alle Substanzen des Gemischs auf der Diagonalen des Chromatogramms, so haben sich die Einzelkomponenten während der Reaktion (R) nicht verändert. Wesentliche Abweichungen einzelner Substanzen von der Diagonalen gehen auf Stoffveränderungen nach der ersten Trennung zurück.

Für die TRT-Versuche wurden jeweils 1 µl Rohextrakt bzw. 5 µl der Einzelfractionen punktförmig mit dem Linomaten auf Kieselgelplatten der Größe 20x20 cm aufgetragen. Nach der ersten Trennung (Dunkelentwicklung, Laufmittel TEA, Laufmittelfront bei 16 cm) wurden die Platten folgenden physikalischen Einflüssen ausgesetzt:

- Bestrahlung mit 300 mJcm⁻² UV-B
- Bestrahlung mit 2000 mJcm⁻² UV-B
- Erhitzen auf 80°C für 20 min.

Als UV-B-Quelle wurde die Bestrahlungseinheit UV/Puva 800 (Waldmann, Schweningen , Germany) ausgestattet mit Philips TL 20W/12-Lampen (Emissionsspektrum zwischen 285 und 350 nm; Maximum bei 310-315 nm) eingesetzt.

Die zweite chromatographische Trennung nach 90°-Drehung der Platte erfolgte wiederum als Dunkelentwicklung. Nach Trocknen der Platten wurden die R_F-Werte aller Substanzen berechnet und die TRT-Versuche wiederholt, bei denen eine Abweichung einzelner Substanzen von der Diagonalen zu erkennen waren. Die Kontrolle erfolgte durch Platten, die

keiner Reaktion ausgesetzt wurden: sowohl zweidimensionale Entwicklung als auch damit verbundene Trocknungsvorgänge fanden unter Lichtausschluß statt.

3.6 Präparative Dünnschichtchromatographie

Die Aufreinigung der über Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen erfolgte über die präparative Dünnschichtchromatographie in einzelne Banden.

Anfänglich wurde versucht, das Rohextrakt direkt über Dickschichtplatten chromatographisch aufzutrennen. Dies erwies sich aufgrund der Vielzahl der Einzelkomponenten als unmöglich.

Aber auch die Dickschichtchromatographie der Säulenfraktionen zeigte keine gute Trennschärfe zwischen den Einzelbanden. Zudem differierten die R_f -Werte der Banden auf den Dickschichtplatten stark von denen derselben Banden auf den Dünnschichtplatten. Daher erfolgte die Trennung der Säulenfraktionen mittels Dünnschichtchromatographie. Für die Aufarbeitung wurden jeweils 150–200 μ l der einzelnen Säulenfraktionen mittels Linomat über lange Bahnen auf Kieselgel 60- Platten aufgetragen. Die Einstellung des Linomat zeigt die folgende Tabelle.

Plattenbreite	200 mm
Bandenbreite	180 mm
Auftragsgeschwindigkeit	4 sec/ μ l
Startposition	20 mm
Abstand zwischen Banden	0 mm
Volumen*	150-200 μ l
Druck Hauptventil	>100 bar
Druck Reduzierventil	4-5 bar

*in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration und Konsistenz der aufzuarbeitenden Probe

Tab. 4: Einstellung des Linomat bei der präparativen DC

Nach Entwicklung der Platten in TEA wurden die aufzuarbeitenden fluoreszierenden Banden im UV-Licht bei 256 nm mit Bleistift markiert und mittels Skalpell aus der Platte herausgelöst. Nicht-fluoreszierende Banden konnten im sichtbaren Licht direkt aus der Platte gelöst werden.

Die erhaltenen Mischungen aus Pigment und Kieselgel wurden fein zermörsert und im Verhältnis 1: 1 mit jeweils 25 ml Aqua dest. und Ethylacetat versetzt. Unter Phasenbildung reicherten sich die Pigmente in der Ethylacetatphase an, das Kieselgel verblieb in der wäßrigen Phase. Die obere Phase mit gelösten Pigment wurde abgehoben und mit

wasserfreiem Natriumsulfat (Na_2SO_4 , Fluka) versetzt. Dieses zieht eventuell noch vorhandenes freies Wasser aus der Ethylacetatphase ab (Bindung als Kristallwasser, Ausscheidung von Natriumsulfat aus wäßrigen Lösungen als Dekahydrat: $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{H}_2\text{O}$). Ethylacetatphase mitsamt Natriumsulfat wurden zentrifugiert (5 min bei 4000 Umdrehungen/min). Der Überstand aus Ethylacetat und Pigment wurde in Autosamplerröhrchen abpipetiert, unter Stickstoffstrom bei 40°C in einem Heizblock (Techne, Wertheim, FRA) getrocknet und bei -20°C gelagert.

3.7 HPLC

3.7.1 Analytische HPLC

Über Säulen- und Dünnschichtchromatographie vorgereinigte Fraktionen wurden in einem analytischen reversed-Phase-HPLC-Verfahren auf ihre Zusammensetzung überprüft.

Die Reversed- phase- HPLC ist dadurch charakterisiert, daß ihre stationäre Phase weniger polar ist als die mobile Phase. Probesubstanzen treten also um so eher mit der apolaren Oberfläche der Säulenfüllung in Wechselwirkung je apolarer, d.h. je lipophiler sie selbst sind. Als mobile Phase werden in der Reversed-phase-Chromatographie Gemische aus Wasser und mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln eingesetzt. Über den Wasseranteil des Gemischs lassen sich die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen aus dem Probengemisch steuern: je höher der Wassergehalt des Eluenten ist, desto länger sind die Retentionszeiten der lipophilen Probesubstanzen.

Verwendet wurde eine Merck-Hitachi Anlage (L-3000 Multi Channel Photodetektor mit einer L-6200A Pumpe) mit einer RP8 Säule. Der Fluß lag konstant bei 1 ml/Minute, der Druck bei 140-169 bar. Um eine gute Trennung der Einzelsubstanzen zu erzielen, wurde eine Gradientenelution durchgeführt.

In der Gradientenelution werden die Eigenschaften der mobilen Phase während der Elution verändert. Bei der Trennung der Pigmente wurde die Zusammensetzung des Laufmittels variiert. Verwendet wurde entweder ein einfach linearer oder ein zusammengesetzt linearer Gradient (Tab. 5).

Die mobile Phase setzte sich aus 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.0; hergestellt mit gradientenreinem Wasser für die HPLC, Merck) und Acetonitril (CH_3CN , gradientenrein, Merck) zusammen. Der analytische Gradient zeigte folgenden Aufbau: Beginn mit 15% Acetonitril und 85% Phosphatpuffer zur Elution polarer Substanzen. Steigerung des

Acetonitrilanteils auf 60% bis zur 25. Minute und Konstanthaltung über 10 Minuten für die Elution apolarer Substanzen. Bis zur 40. Minute Rückkehr zu den Ausgangsbedingungen. Äquilibration der Säule für 15 Minuten.

Acetonitril und Wasser für den Phosphatpuffer wurden zuvor mit einem Supleco Filtrationsapparat 2 (Supleco, Bellefonte, USA), versehen mit einem Nylon 66 Filter, entgast.

Zeit (Minuten)	Acetonitril (%)
0	15
25	60
35	60
40	15
55	15

Tab. 5: Profil des eingesetzten Gradienten (zusammengesetzt linearer Gradient)

Aus dem zeitlichen Verlauf des analytischen Gradienten wurde für einzelne Peaks die der Retentionszeit entsprechende Acetonitrilkonzentration bestimmt und so die Bedingungen für die präparative Auftrennung der Substanzen unter isokratischen Bedingungen formuliert.

3.7.2 Präparative HPLC

Die präparative HPLC erfolgte in isokratischer Elution, d.h. bei konstanter Zusammensetzung der mobilen Phase. Die in der analytischen HPLC erhaltenen Daten wurden dabei auf die isokratischen Bedingungen übertragen. Für die jeweils präparativ aufzureinigende Substanz wurde aus dem analytischen Gradienten die ihrer Retentionszeit entsprechende Acetonitrilkonzentration ermittelt. Die präparative HPLC wurde dann jeweils bei einer 5-10% niedrigeren Acetonitrilkonzentration durchgeführt.

Um spätere Analysemöglichkeiten nicht durch Reste des in der analytischen HPLC verwendeten Phosphatpuffers negativ zu beeinflussen, wurde dieser in der präparativen HPLC durch Wasser für die HPLC (Merck) ersetzt. Dieser Austausch hatte keine Veränderung des Bandenmusters zufolge.

Die Anlage zur präparativen Aufarbeitung der Substanzen bestand aus einer Lichrospher 100-RP-8 (10x250mm)-Säule auf einem Gilson Modell 302 (Pumpe) und einem eingesetzten 802-Modul. Die HPLC erfolgte bei einem Fluß von 6,25 ml/min, um die präparative Säule nicht zu überlasten und die Detektionsgrenze nicht zu unterschreiten. Aufgrund der aus Ergebnissen

von Voruntersuchungen (3.5.3) erwarteten Indolstruktur der Verbindungen wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert.

Die einzelnen Peaks der präparativen HPLC wurden in mit 96%igem Ethanol vorgereinigten Erlenmeyerkolben aufgefangen. Die Acetonitrilkomponente des Laufmittels wurde durch Einengung des Eluats im Rotationsverdampfer bei 30°C entfernt. Die im Kolben verbleibende Wasserphase (in der die aufgereinigten Substanzen aufgrund ihrer Lipophilie keine Löslichkeit zeigten und ausfielen) wurde über einer Kältemischung aus Isopropanol und Trockeneis unter ständigem Drehen (Erhalt einer möglichst großen Oberfläche) eingefroren. Die eingefrorenen Substanzen wurden bis zur vollständigen Trocknung lyophilisiert (Lyovac GT2).

Die weiterführende Analytik der aufgereinigten Substanzen erfolgte durch Einbeziehung moderner analytisch-chemischer Methoden durch Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. Steglich am Institut für organische Chemie der Ludwig-Maximilian-Universität München (G. Wille, Dr. N. Arnold).

Auswahlkriterium für Substanzen, die der weiteren Analytik zugeführt wurden, stellte wie bereits erwähnt der Anhalt für Tyrosinaseinhibition durch die Substanzen dar. Eine erste Reinsubstanz, die aus einer Dünnschichtbande mit Tyrosinaseinhibition aufgereinigt werden konnte, wurde so auf Trockeneis an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Steglich weitergeleitet.

3.8 Untersuchungen zur Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung isolierter Substanzen erfolgte am Institut für organische Chemie der Ludwig- Maximilian- Universität München durch Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. Steglich. 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-Spectrum (Perkin-Elmer 1420 oder Bruker IFS 45 FT-IR). Röntgenstrukturanalyse (Enraf-Nonius CAD4), UV-Spektrometrie (Perkin-Elmer Lambda 16) sowie Schmelzpunktbestimmung mittels Reichert Thermovar.

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

3.9 Tyrosinasereaktion

Die Erkrankung der Pityriasis versicolor kann mit Depigmentierungen der Haut einhergehen. Daher könnte eine der möglichen Wirkungen der von *M. furfur* gebildeten Pigmente in der Hemmung der Melaninsynthese bestehen. Jung wies 1976 eine Hemmung der Tyrosinase durch einen Auszug aus Schuppen der Pityriasis versicolor nach. In Anlehnung an seine Untersuchungen wurden die *Malassezia*-Pigmente auf eine Hemmung dieses Enzyms überprüft.

Die Tyrosinase kontrolliert als zentrales Enzym der Melanogenese die beiden einzigen enzymvermittelten Reaktionen der Melaninsynthese (Abb. 8):

- 1) Hydroxylierung der Ausgangssubstanz Tyrosin zu DOPA (3,4- Dihydroxyphenylalanin)
- 2) Oxidation von DOPA zu Dopachinon.

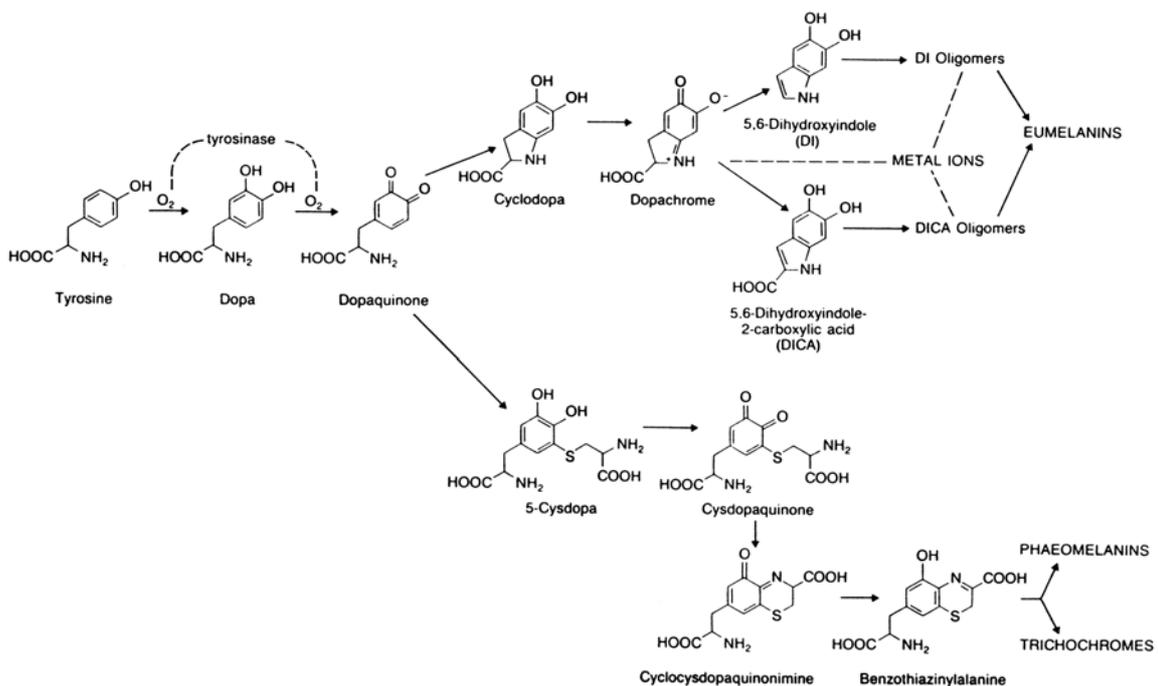


Abb. 8: Melanogenese (nach Prota 1988)

In einem nach Anlehnung an Jung (1976) konzipierten Assay wurden die Pigmente auf eine Hemmung der Oxidation von DOPA zu Dopachinon überprüft. Diese Reaktion kann photometrisch verfolgt werden, da das entstehende Dopachinon Licht der Wellenlänge 475 nm absorbiert. Die Absorptionzunahme von Dopachinon bei $\lambda_{\max} = 475$ nm dient im Testsystem als physikalische Meßgröße für die Reaktionsgeschwindigkeit v . Folgende Ansätze wurden (in Anlehnung an Jung) verwendet:

Testsubstanz gelöst in	100 μ l DMSO
DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)	2,5 mg in 2 ml 0,05M Phosphat-Puffer (pH 7.0)
[Konzentration DOPA ($M_{\text{DOPA}} = 197,2$)	$6,3 \times 10^{-3}$ Mol/l]
Phosphatpuffer (0,05M; pH 7.0)	1,4 ml
Tyrosinase aus Pilzen (EC 1.14.18.1; Sigma)	150 U in 320 μ l Phosphatpuffer

Die Pigmente in den jeweiligen Aufreinigungsphasen (Säulenfraktion, Dünnschichtbande und Reinsubstanz) zeigten gute Löslichkeit in DMSO. Die in der Tyrosinasereaktion zu überprüfenden Pigmente wurden daher in jeweils 100 μ l DMSO aufgenommen und mit dem Reaktionsansatz vermischt. Dieser setzte sich wie oben beschrieben aus 1,4 ml 0,05M Phosphatpuffer (pH 7.0) und 2ml einer 2,94 mM Dopalösung zusammen. Bei der Zugabe des gelösten Pigments zum Reaktionsansatz traten die folgenden beiden Probleme auf:

- 1) Einzelne Substanzen bzw. Substanzgemische flockten aus, sobald sie in den wäßrigen Reaktionsansatz gegeben wurden. Diese (wenigen) Ansätze konnten nicht auf Enzymhemmung untersucht werden, da kein anderer geeigneter Lösungsvermittler ohne Beeinflussung der Enzymaktivität gefunden werden konnte.
- 2) Nach Zugabe des in DMSO gelösten Pigments stellte sich unterschiedliche starke Braunfärbung des Reaktionsansatzes ein. Somit variierte die Absorption (gemessener Wert bei 475nm) zwischen den verschiedenen Meßansätzen. Die differierenden Leerwerte der Substanzen wurden daher vor der Zugabe des Enzyms notiert und dann der jeweilige Ansatz auf Null kalibriert. Der Ansatz für diese Eichung bestand aus 3,72 ml Phosphatpuffer und 100 μ l DMSO.

Dem jeweils zu untersuchenden Ansatz wurde Tyrosinase (Aufschwemmung aus Tyrosinase (150 U/ml) in 320 ml Phosphatpuffer, pH 7.0) hinzugesetzt. Nach Zugabe der Tyrosinase wurden die Extinktionen in 30-sekündigen Abständen über maximal zehn Minuten bestimmt. Die gemessene Absorptionzunahme stellte dabei ein Maß für die Menge des in der Reaktion

gebildeten Dopachinons da. Über einen Beobachtungszeitraum von zehn Minuten hinausgehende Messungen zeigten keine sinnvollen Ergebnisse, da die Extinktion durch spontane Umsetzung des Dopachinon zu grauschwärzlichen Melaninvorstufen und Melanin wieder abnahm.

Die Messung erfolgte bei 20°C in 3 ml-Makroküvetten (Müller, ratiolab, Dreieich, FRG) in einem Beckmann DU-68-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 475 nm, die dem Absorptionsmaximum des in der Reaktion gebildeten Dopachinons entspricht. Verglichen wurden die ermittelten Extinktionen in Ansätzen mit *Malassezia*- Pigment mit Extinktionen eines Kontrollansatzes. Dieser enthielt statt des in DMSO gelösten Pigments 100 µl reines DMSO. Der Kontrollansatz wurde bei allen Meßreihen mitgeführt, um eventuell auftretende Änderungen der Enzymaktivität sofort zu erfassen.

Ein möglicher Einfluß des Lösungsvermittlers DMSO auf die Enzymwirkung wurde ausgeschlossen. Bei steigender DMSO-Konzentration (0,1% bis ca. 2,9% DMSO) und dementsprechender Reduktion des Phosphatpuffers zeigte sich im Vergleich zu einem Ansatz ohne DMSO keine veränderte Enzymaktivität. Als Positivkontrolle für einen möglichen Hemmeffekt wurde als bekannter Tyrosinaseinhibitor 5-Hydroxyindol eingesetzt (Tomita 1990).

Wie bereits erwähnt diente das Tyrosinase- Assay als „Screeningmethode“ für aufzureinigende Substanzen (vgl. Abb. 6: Programm zur Aufreinigung des Rohextrakts). Das Rohextrakt selbst konnte aufgrund starker Trübung und extrem hoher Leerwerte nicht im Assay untersucht werden. Nach Vorreinigung des Rohextrakts über Säulenchromatographie war jedoch die Untersuchung von 17 der gewonnenen 20 Fraktionen möglich. Fraktionen mit Hemmwirkung wurden weiter aufgereinigt. Im einzelnen im Assay untersucht wurden daher:

- a) Säulenfraktionen (erster Trennschritt)
- b) Einzelbanden der über DC aufgetrennten hemmenden Säulenfraktion (zweiter Trennschritt)
- c) Einzelpeaks (Reinsubstanzen) der über HPLC getrennten hemmenden Banden (dritter Trennschritt)
- d) Synthese der isolierten Substanz.

Herstellung für das Tyrosinase- Assay benötigter Puffer und Lösungen:

Herstellung eines 0,05 M Phosphatpuffers (nach Sörensen):

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

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

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

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

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

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

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

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

Für einen Puffer mit $\text{pH} = 7,0$ bei 18°C und $0,2 \text{ M}$ wurden 39 ml von a) und 61 ml von b) zusammengegeben. Nach Zugabe von 100 ml Aqua dest. erhält man 200 ml eines $0,1 \text{ M}$ Puffers. Dieser wurde mit Aqua dest. auf die Hälfte verdünnt. Erhalt von 400 ml eines $0,05 \text{ M}$ Phosphatpuffers.

Herstellung der DOPA- Lösung:

$0,5 \text{ mg}$ DOPA (3,4- Dihydroxyphenylalanin) wurden in $0,4 \text{ ml}$ des $0,05 \text{ M}$ Phosphatpuffers gelöst.

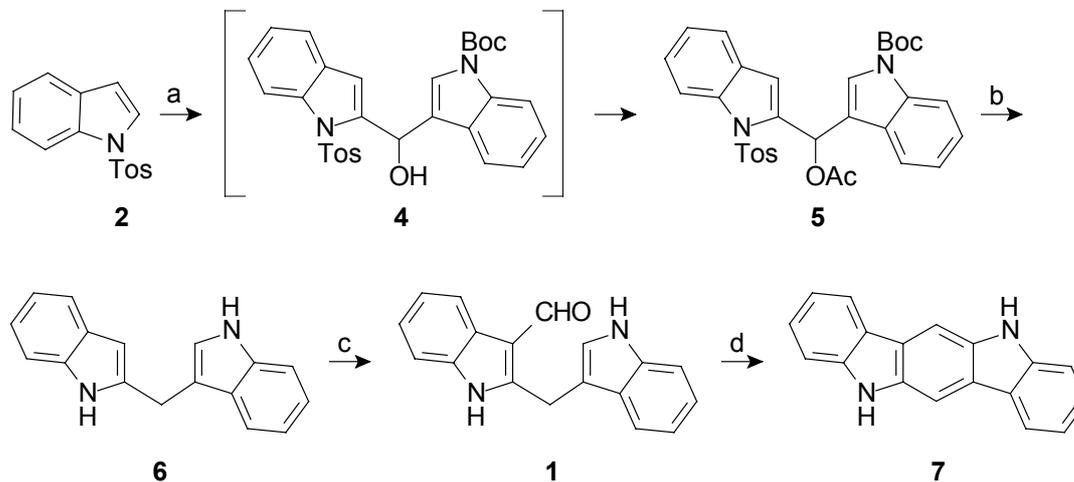
Herstellung der Tyrosinase- Aufschwemmung

Das Enzym wurde als Trockensubstanz mit einer Konzentration von 3000 U/mg geliefert. $0,3 \text{ mg}$ Tyrosinase wurden in 2 ml Phosphatpuffer gelöst; 320 ml dieser Lösung entsprechen den pro Reaktionsansatz eingesetzten 150 U .

3.9.1 Synthese des neuen Isolats (LMU München)

Eine erste Substanz aus der biologisch aktiven Dünnschichtbande (Tyrosinaseinhibition) konnte isoliert werden. Es handelt sich dabei um einen bisher unbekanntem Naturstoff (2,3'-Methylenbisindolyl-3-carbaldehyd), der den Namen Malassezin erhielt. Nach erfolgter Strukturaufklärung konnte diese Substanz synthetisiert werden. Ausgangsstoffe für die Synthese von Malassezin waren Indol und Indol-3-carbaldehyd. Diese beiden Substanzen

stellen einfache Tryptophan- Abbauprodukte dar, die ebenfalls im Rohextrakt aus Kulturen von *M. furfur* nachgewiesen werden konnten. Die Synthese von Malassezin erfolgte in fünf Schritten mit einer Substanzausbeute von 12%:



1) Malassezin; 2) Indol (mit Schutzgruppe); 4) 5) Indol-3-carbaldehyd (mit Schutzgruppen); 6) Indol-3-carbaldehyd nach Entfernung der Schutzgruppen; 7) Indolo[3,2-*b*]carbazol

Abb. 9: Synthese von Malassezin

3.9.2 Überprüfung der Synthese auf Identität mit dem Naturstoff

Durch Röntgenstrukturanalyse wurde die Identität des synthetisierten Malassezins mit dem Naturstoff bestätigt (LMU München). Das Syntheseprodukt stimmte in allen spektroskopischen Daten mit dem Naturstoff aus *Malassezia furfur* überein (genaue Daten s. Wille 2001).

Die synthetische Substanz wurde zusätzlich in der HPLC auf Identität mit den Naturstoffen überprüft. Das synthetische Malassezin und der aufgereinigte Naturstoff wurden zunächst einzeln, dann in Koinjektion über die analytische HPLC (Merck-Hitachi L-6200A; RP-8; 4x250, Fluß 1 ml/Minute, Druck bei 140-169 bar) gegeben. Jede HPLC erfolgte unter folgenden Laufmittelzusammensetzungen:

15-60% Acetonitril in Gradientenelution

55% Acetonitril in isokratischer Elution

40 % Acetonitril in isokratischer Elution.

Bei Deckungsgleichheit der Peaks von synthetisiertem Malassezin und Naturstoff unter allen eingesetzten Laufmittelbedingungen wurde von Identität der Substanzen ausgegangen.

3.10 Untersuchungen zur biologischen Aktivität des neuen Isolats

Die Totalsynthese des neuen Naturstoffs Malassezin erlaubte die Herstellung größerer Mengen dieser Substanz. Damit waren Untersuchungen möglich, die mit dem Naturstoff aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen nicht oder nur in begrenztem Umfang möglich waren:

3.10.1 Untersuchung auf Inhibition der Tyrosinase

Das synthetische Malassezin wurde auf Hemmung der Tyrosinase im unter 3.9. beschriebenen Assay überprüft.

3.10.2 Untersuchung auf Agonismus am Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor

Malassezin zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit Agonisten des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors (aryl hydrocarbon receptor, AHR).

Insbesondere bei der Synthese zeigte sich seine leichte Zyklisierbarkeit zum Indolo[3,2-*b*]carbazol, welches als AHR-Agonist bereits bekannt ist. Daher wurde Malassezin selbst auf eine mögliche agonistische Aktivität gegenüber dem AHR überprüft. Die Untersuchungen wurden im Institut für Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern (A. Baumgart, H.-J. Schmitz und D. Schrenk) durchgeführt.

Der AHR stellt einen intrazytoplasmatischen Rezeptor dar, der nach Bindung eines Agonisten über einen rezeptorvermittelten Prozeß in den Zellkern gelangt und dort auf transkriptionaler Ebene die Expression bestimmter Gene kontrolliert. Seine Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Er scheint sowohl an der Kontrolle von Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt als auch an der Expression von Genen, die eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielen. So bewirken Untersuchungen zufolge Agonisten des AHR eine erhöhte Transkription der mischfunktionellen Oxygenasen der Cytochrom P450 Isoenzyme (CYP 1A1).

Die Potenz eines Agonisten am Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors kann indirekt durch die Aktivität des CYP1-abhängigen Enzyms 7-Ethoxyresorufin *O*-Dealkylase (EROD) bestimmt werden (Burke 1974). Die Zunahme der Lichtemission von Resorufin bei 586 nm (λ_{\max} bei 511 nm) dient im in-vivo-Testsystem als physikalische Meßgröße für die Reaktionsgeschwindigkeit v . Eine halblogarithmische Auftragung von v bei verschiedenen Konzentrationen c (Agonist) ergibt einen sigmoiden Verlauf, dessen Wendepunkt die Konzentration für die Hälfte des maximalen Effekts (EC₅₀) darstellt.

Durchgeführt wurden diese Messungen in Bioassays mit Rattenhepatozyten (Wille et al. 2001).

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von Pigmenten und Fluorochromen in Kulturen von *M. furfur*

Kulturen von *M. furfur* zeigen bei Wachstum auf dem sogenannten p (Pigment)-Agar, der als einzige Stickstoffquelle die Aminosäure Tryptophan enthält, schon nach wenigen Tagen die Bildung eines bräunlichen Pigments. Dieses diffundiert in den anfänglich klar durchsichtigen Agar. Nach 14 Tagen ist eine homogene Braunfärbung des Kulturmediums zu erkennen. Im UV-Licht der Wellenlängen 254 bzw. 366 nm zeigen die Kulturplatten eine starke gelblich-grüne Fluoreszenz.

Die Pigmentbildung ist tryptophanabhängig. Sie findet sich nicht bei Kultur der Hefen auf Medien mit anderen Aminosäuren oder Zugabe weiterer Aminosäuren zum tryptophanhaltigen Medium (Mayser et al 1998).

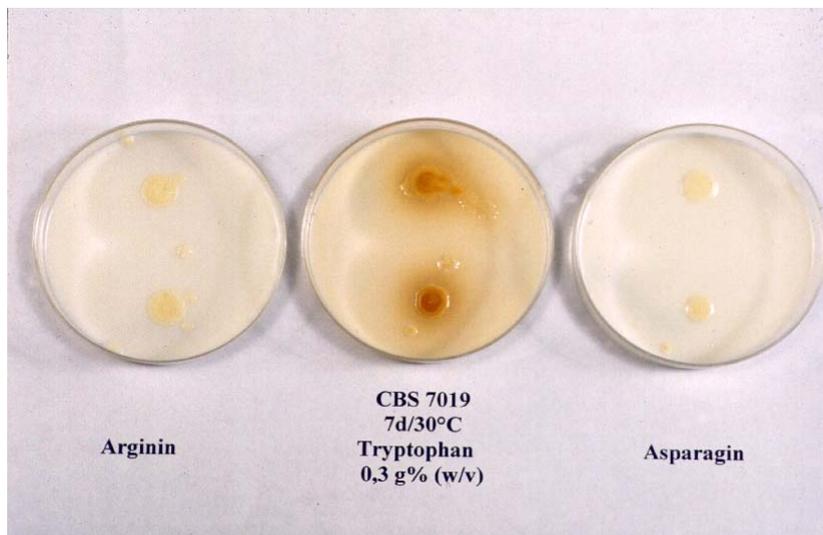


Abb. 10: Pigmentinduktion in Kulturen von *Malassezia*-Hefen durch Trp

4.2 Säulenchromatographie

Das Pigment wurde wie unter 3.2. beschrieben aus dem Kulturmedium extrahiert. Erste Versuche einer Auftrennung des Rohextrakts über Dickschichtchromatographie zeigten eine sehr komplexe Pigmentzusammensetzung aus zahlreichen Einzelkomponenten, die sich auf der Dünnschichtplatte nicht gut voneinander getrennt hatten. Um die Trennung zu verbessern, wurde das Rohextrakt daher über Säulenchromatographie vorfraktioniert. Dabei zeigte sich im sichtbaren Licht eine homogene Braunfärbung der Säule ohne Fraktionierungskriterien. Im UV-Licht konnten jedoch zahlreiche Banden durch farbige Fluoreszenz voneinander abgegrenzt werden. Daher erfolgte die Trennung im UV-Licht der Wellenlängen 254 bzw. 366 nm. Zunächst wurde sehr kleinschrittig fraktioniert. Dabei wurden bis zu 20 Fraktionen gewonnen, wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist. Auf der zur Kontrolle angefertigten Dünnschichtplatte zeigte sich eine sehr gute Trennung der einzelnen Säulenfraktionen.

Tab. 6: DC der Säulenfraktionen mit R_f -Werten der Einzelbanden (grau: Fraktionen mit Tyrosinaseinhibition)

Fraktion:	R_f -Wert:	Farben im sichtbaren Licht:	Farben im UV-Licht:
1.-3.Fraktion zeigen keine Trennung, die gesamte Bande zeigt eine braungelbe Schleifspur			
1. Fraktion	0,0125		Orange
	0,094		Gelborange
	0,34		Schwach Rosa
2. Fraktion	0,075		Bläulich
	0,13		Bläulich
	0,16		Rosa
	0,19		Bläulich
	0,23		Bläulich
	0,34		Gelb-Bräunlich
3. Fraktion	0,075		Blau (stärker als in 2)
	0,094		Hellblau
	0,13		Blau
	0,16		Rosa
	0,19		Blau
	0,25		Rosa
4.Fraktion	0,025		Blau
	0,075		Blau
	0,094		Blau
	0,13		Bläulich
	0,18		Bläulich
	0,25		Rosa
	0,28	Rosa	

Fraktion:	Rf-Wert:	Farben im sichtbaren Licht:	Farben im UV-Licht:
	0,29	Lila	
5. Fraktion	0,025		Blau
	0,075		Hellblau
	0,094	Rosa	
	0,15		Hellblau
	0,19	Rosa	Hellblau
	0,22	Gelb	Hellgelb
	0,25		Rosa
	0,28	Rosa	Rosa
	0,29	Lila	
	0,31		Rosa
	0,33		Blau
	0,36		Rosa
	0,38	Schwach Rosa	
	0,39	Lila	
	0,41		Gelb-Rosa
	0,45	Innen Gelb, außen dick Rosa Ø sehr groß	Gelber, dicker Fleck; innen keine Fluoreszenz
	0,47	Rosa	
6. Fraktion	0,025		Blau
	0,075		Hellblau
	0,094	Rosa	
	0,14		Hellblau
	0,19	Rosa	Gelb (hell)
	0,21		Gelb (dunkler)
	0,22	Gelb	Gelb (sehr hell)
	0,25		Gelb (schwach)
	0,28	Rosa	Rosa
	0,38	Rosa	
	0,39	Lila	
	0,4		Gelb
	0,44	Dick rosa, innen gelb	
7. Fraktion	0,063		Blau (schwach)
	0,094	Rosa	
	0,16	Schwach Gelb	Orange
	0,19	Bräunlich	Helles Gelb
	0,21		Dunkleres Gelb
	0,22		Sehr helles Gelb
	0,25		Schwaches Gelb
	0,28	Rosa	Rosa (0,29)
	0,38	Pink (am deutlichsten!!!)	
	0,39	Lila	
	0,41		Gelb (0,4)
	0,44	Schwach Gelb	Gelber, dicker Punkt; innen keine Fluoreszenz
	0,46	Rosa (0,47)	Hellblau
	0,48	Rosa (schwach; 0,5)	Rosa

Fraktion:	Rf-Wert:	Farben im sichtbaren Licht:	Farben im UV-Licht:
8. Fraktion	0,081	Rosa	
	0,14		Gelb (schwach)
	0,17	Gelb	Gelb (stark)
	0,2	Rosa/Bräunlich	
	0,22		Bläulich/Gelb
	0,28	Rosa	
	0,31	Gelb (schwach)	Rosa/Rot
	0,32		Blau
	0,38	Pink	
	0,39	Lila (schwach Olive)	Blau
	0,41	Gelb	
	0,42		Rosa (keine Fl. in der Mitte)
	0,44		Blau
	0,46	Rosa	
	0,48	Rosa	Rosa
9. Fraktion	0,031		Gelb/Braun
	0,056	Beim Trocknen hellblau, jetzt bräunlich	
	0,13	Gelb/Bräunlich	
	0,15		Gelb (schwach)
	0,17		Gelb
	0,19	Rosa	
	0,21	Lila/Bräunlich	
	0,22		Bläulich/Gelb
	0,25	Gelb/Orange	Bläulich (schwach)
	0,28	Lila/Bläulich	
	0,31	Deutliches, sattes Gelb (warm)	Rosa/Rot (deutl.)
	0,36	Lila (schwach/verwaschen)	
	0,38	Rosa (sehr schwach)	
	0,39	Olivgrün (Lila)	Blau
	0,4	Gelb	
	0,42	Bräunlicher Fleck (mit Lila und Braun???)	
	0,44		Rosa (keine Fluoreszenz i. Mitte)
	0,48	Pink	Rosa (0,49)
10. Fraktion	0,031		Gelb/Braun
	0,056	Rosa/Bräunlich	
	0,15	Rosa (leicht)	Bläulich
	0,17	Gelb (schwach)	Gelblich (schwach)
	0,19	Rosa (schwach)	Rosa (schwach)
	0,19	Lila (schwach)	
	0,22		Bläulich
	0,23		Rosa (schwach)
	0,31	Lila (schwach)	Rosa/Rot
	0,33		Gelb (schwach)
	0,36	Lila	
	0,38	Lila (Olivgrün)	

Fraktion:	Rf-Wert:	Farben im sichtbaren Licht:	Farben im UV-Licht:
	0,4	Gelb (0,41)	Bläulich
	0,46		Bläulich
	0,48		Rosa/Rot
	0,48		Blau
11. Fraktion	0,038		Gelb/Braun
	0,056	Bräunlich	
	0,13	Gelb	
	0,17		Gelb (stark)
	0,19	Lila	
	0,21		Bläulich
	0,23		Rosa
	0,27	Gelb	
	0,31	Orange	Rosa/Rot
	0,33		Gelblich/Braun
	0,36		Lila
	0,39	Olivgrün (Lila?)	Rosa/Gelb
	0,4		Gelb
	0,41		Gelb
	0,46		Blau
Fraktion 12	0,17	Gelb (schwach)	Gelb
	0,19	Lila	
	0,26	Gelb	
	0,31	Orange	Rosa/Rot
	0,36	Lila	
	0,39	Olivgrün (nur noch Schatten!!!!)	Rosa/Gelb
	0,41		Gelb
	0,41		Bläulich
	0,47		Gelblich
Fraktion 13	0,16	Gelb	Gelb (verwischt; 0,17)
	0,26	Gelb	
	0,31	Orange	Rosa/Rot (schwach)
	0,34	Orange mit Lila	
	0,38	Orange	Rosa/Gelb (0,39)
	0,41		Gelb
	0,41		Bläulich
	0,47		Gelblich
Fraktion 14	0,156	Gelb	
	0,17		Gelb
	0,37		Rot
	0,38	Orange	Gelb
	0,39		Gelb
	0,42	Lila Schatten	
	0,48		Blau
Fraktion 15	0,38	Orange Schatten	Schlechte Trennung !!!
	0,43	Olivgrüner – Lila Schatten	
Fraktion 16 – 20 im sichtbaren Licht schlechte Trennung; eigentlich keine Substanzen mehr zu erkennen.			

Fraktion 16	0,31		Gelb
	0,42		Gelb
	0,45		Blau/Gelb
	0,5		Blau
	0,59		Gelb
Fraktion 17 –20 sehen im UV-Licht wie Fraktion 16 aus – bis auf die gelbe Bande, die bei Rf=0,31 fehlt, und die blaue Bande bei 0,5, die wesentlich schwächer erscheint. Insgesamt sind die Banden schwächer.			

Die Säulenfraktionierung erwies sich ebenfalls für die spätere Untersuchung der *Malassezia*-Pigmente im Tyrosinase-Assay als notwendig (Entfernung von Substanzen mit den ersten Säulenfraktionen, die die photometrische Untersuchung des gelösten Rohextraktes durch Trübung des Ansatzes unmöglich machten). Für die spätere Aufarbeitung der Säulenfraktionen erwies sich eine gröbere Vorfraktionierung in 12 Fraktionen als ausreichend (Tab. 7).

Fraktion	Volumen der Fraktion (ml)	Fluoreszenz
I	130	Farbloser, nicht fluoreszierender Vorlauf
II	100	Dunkel fluoreszierendes Gelb auf der Säule, nach Auffangen im Gefäß olivgrüne Fluoreszenz
III	40	Farblose Bande auf der Säule, im Gefäß leicht gelbliche Fluoreszenz
IV	40	Rötliche Bande auf der Säule, im Gefäß leicht gelbliche Fluoreszenz
V	30	Farblose Fluoreszenz auf der Säule, im Gefäß leicht gelblich
VI	100	Gelb/Braun auf der Säule
VII	55	Braun/Gelb auf der Säule
VIII	100	Stark (dunkel)gelbe Fluoreszenz (gelbe Bande ist auf DC sofort deutlich zu erkennen, verblaßt jedoch schnell wieder)
IX	100	Hellgrüne Fluoreszenz (gelbe Bande ist auf DC zunächst undeutlich, bleibt aber lange sichtbar, ohne rosa zu werden)
X	300	Helles Braun, kaum Fluoreszenz
XI	400	Dunkles Braun, kaum Fluoreszenz
XII	300	Hellgelbe Fluoreszenz

Tab. 7: Fraktionierungsmuster (Säulenchromatographie)

Auf diese Weise wurden 12 Einzelfraktionen mit einem Gesamtvolumen von ca. 1700 ml gewonnen. Dabei verblieben Restbestände von Pigment auf der Säule, die für die weiteren Versuche nicht von Interesse waren. Bei einem Durchsatz von insgesamt 2500 ml Volumen konnten diese von der Säule gespült werden. In der Praxis erwies es sich als sinnvoll, die Säule nach dem oben beschriebenen Muster (Tab. 7) zu schneiden und mit weiteren 2000 ml Methanol das Gel zu spülen.

Die Regeneration der Säule erfolgte wie unter 3.4. beschrieben.

4.3 Dünnschichtchromatographie

Die erhaltenen Säulenfraktionen wurden getrocknet (s. 3.4) und ihre Zusammensetzung dünnschichtchromatographisch überprüft. Die Entwicklung der Kieselgelplatten in einem Laufmittelgemisch von Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 (Methode von Gill und Steglich 1987) zeigte eine vollständige Trennung der Pigmentkomponenten. Die charakteristischen Bandenmuster der jeweiligen Fraktionen erlaubten sowohl die Überprüfung des nicht immer konstanten Säulenschnitts, gleichzeitig erleichterten sie in Kombination mit den R_F -Werten die Identifikation der interessierenden Banden.

Die Abbildungen 11 und 12 geben die Dünnschichtchromatographie des Rohextrakts wieder, das zuvor in 20 Fraktionen über der Säule getrennt wurde (Tab. 6). Abb. 11 zeigt das Pigmentspektrum im sichtbaren Licht. Aus Abb. 12 geht das Fluoreszenzmuster der im Rohextrakt enthaltenen Fluorochrome bei 254 bzw. 366 nm hervor.

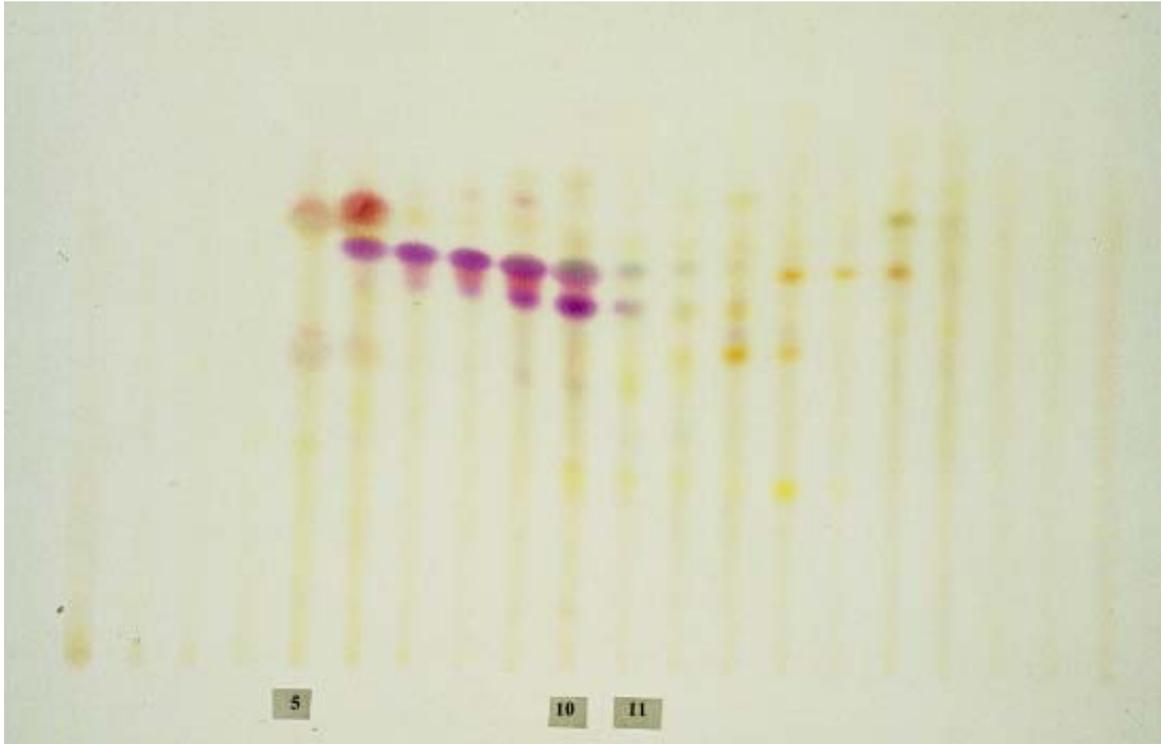


Abb. 11: Pigmentspektrum im sichtbaren Licht (DC-Trennung der 20 Säulenfraktionen)

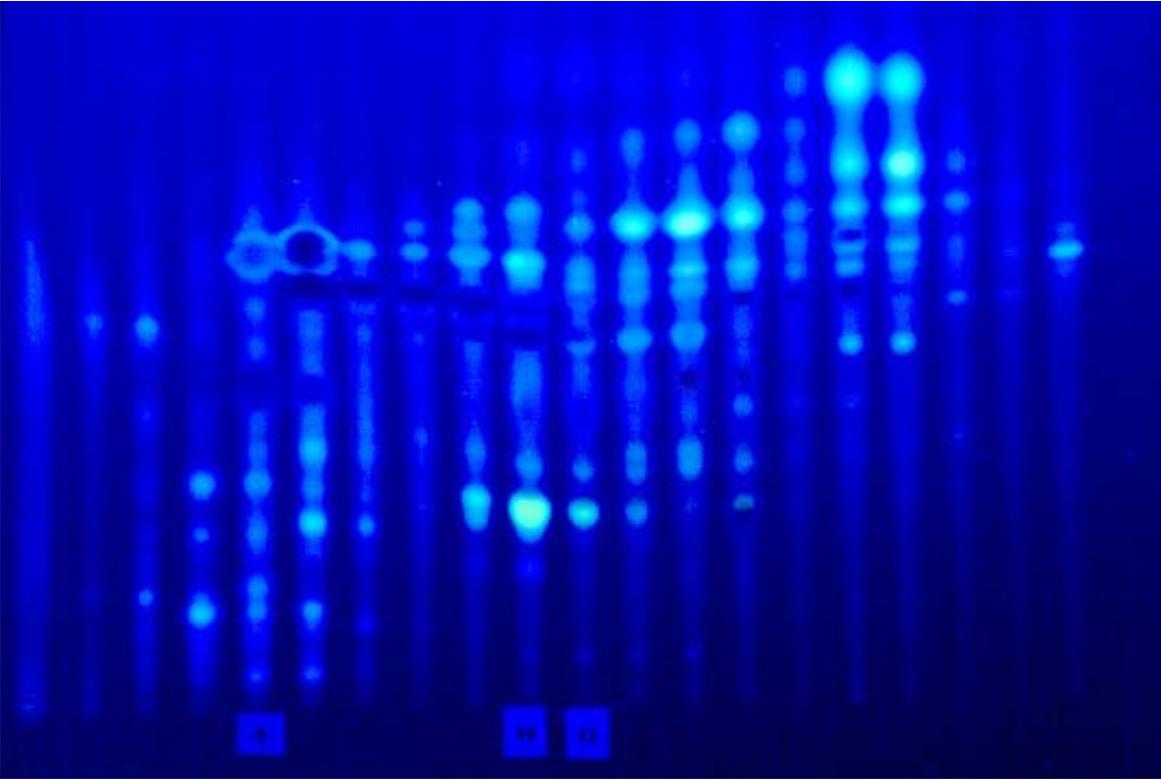


Abb. 12: Fluorochrome im UV-Licht (DC-Trennung der 20 Säulenfraktionen)

4.4 Dünnschichtchromatographische Versuche

4.4.1 pH-Abhängigkeit der Substanzen

Komponenten des von *M. furfur* gebildeten Pigments zeigten in ihrer Farbgebung eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert. Wurden die Chromatogramme Salzsäuredämpfen ausgesetzt, so zeigten einzelne Banden im sauren Milieu kräftige rote und rotbraune Pigmentierungen, die im alkalischen Bereich (Ammoniakdämpfe) in schwache Gelbtöne umschlugen. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen den Farbumschlag im sauren bzw. basischen Bereich. Die Farbumschläge der einzelnen Banden mit jeweiligem R_f -Wert finden sich in Tabelle 8.1 im Tabellenanhang.

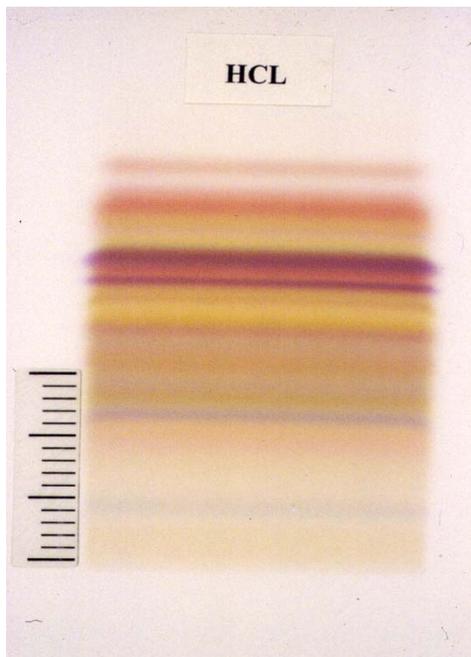


Abb. 13: DC bei Aussetzen mit HCl (rauchend) im sauren Bereich

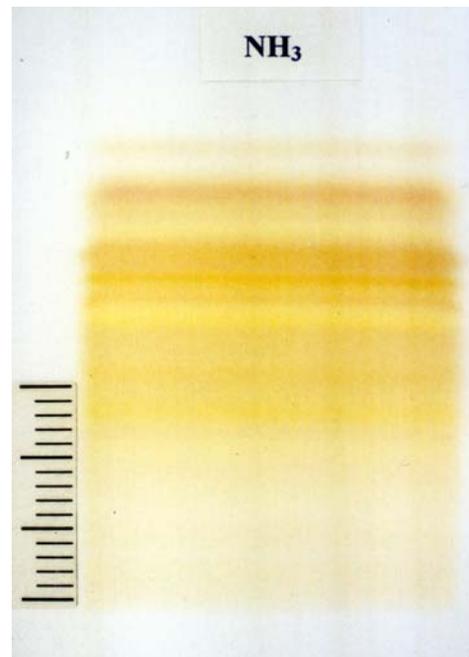


Abb. 14: DC bei Aussetzen mit NH₃-Dämpfen

4.4.2 Vergleich mit Standards

Da sich die Pigmentinduktion als spezifisch von der Tryptophangabe abhängig erwies, lag die Annahme nahe, daß es sich bei den gebildeten Pigmenten um Metabolite dieser Aminosäure im Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* handeln könnte.

Daher erfolgte der dünnschichtchromatographische Vergleich der Pigmente aus dem Rohextrakt von *M. furfur* mit Standards, die den beiden grundsätzlich möglichen Stoffwechselwegen des Tryptophans entstammen. Wie bereits erwähnt (s. auch 3.5.2) besteht der Hauptunterschied zwischen den beiden der beiden Stoffwechselwege in der Öffnung des Indolrings bei den Ommochromen bzw. seines Erhalts im Indolstoffwechselweg (s. auch Abb. 7). Beide Stoffwechselwege wurden im Naturstoffwechsel von Pilzen und Insekten beschrieben (Butenand 1956, Linzen 1974).

Beim Vergleich der R_f -Werte der Standards mit den R_f -Werten der Substanzen des Rohextraktes ließ sich nur bei Tryptophan selbst ($R_f = 0,063$ in Fraktion I) und Indol-3-Acetat ($R_f = 0,38$ in den Fraktionen II, III und IV) eine exakte Übereinstimmung der R_f -Werte finden. Die Chromatographie einer Mischung dieser Standards und der entsprechenden Fraktion führte zu Deckungsgleichheit der Banden.

Aus dem Ommochromstoffwechselweg ließ sich nur Kynurenin anhand seines R_f -Wertes, seiner blauen Fluoreszenz und durch paralleles Auftragen mit einiger Wahrscheinlichkeit identifizieren. Kynurenin kann jedoch auch spontan aus Tryptophan entstehen und ist kein sicherer Hinweis auf den Ommochromstoffwechselweg (Prof. Steglich, mündliche Mitteilung). Kein Hinweis fand sich auf die mögliche Identität mit 3-Hydroxykynurenin ($R_f = 0,13$), das die zentrale Substanz des Ommochromstoffwechsels darstellt. Damit ergaben sich in diesem Vergleich erste Hinweise auf einen Stoffwechselweg mit Bildung von Indolen. Cycloheximid und Chloramphenicol, die dem Nährmedium zum Schutz vor Kontamination zugesetzt waren, ließen sich nicht chromatographisch darstellen, da es sich bei ihnen um farblose Substanzen handelt. Der Auszug aus dem Nährmedium erwies sich chromatographisch als identisch mit einer schmutzig-bräunlichen Verfärbung, die sich regelhaft in den ersten Fraktionen zeigte und hier die untersten Banden des Chromatogramms überlagerte.

4.4.3 Untersuchung auf Indole (Ehrlich's Reagenz)

Einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen von Indolen und aromatischen Aminen im gewonnenen Pigment ergab neben dem Vergleich der Pigmentkomponenten mit Indol-Standards die Derivatisierung der entwickelten und getrockneten Dünnschichtplatten mittels p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Reagenz). Wie aus Tabelle 7.1. im Tabellenanhang zu entnehmen ist, zeigten sich nach dem Besprühen auf der Platte zahlreiche neue rosa Banden (Hinweis auf Indole) sowie nach Trocknen des Reagenz auftretende gelbliche Banden (Hinweis auf aromatische Amine).

4.4.4 Überprüfung der Stabilität – TRT-Versuche

Bei Lagerung der entwickelten Dünnschichtplatten an der Luft bei Zimmertemperatur stellte sich regelmäßig eine zunehmende Braunverfärbung insbesondere der nach Entwicklung roten Banden ein. Nach einigen Wochen Lagerung fand sich ein insgesamt abgeblaßtes Bandenmuster gelblicher Tönung. Ebenso zeigten die Chromatographieplatten einen allmählich zunehmenden Fluoreszenzverlust. Ähnliche Farbveränderungen wurde auch auf den Platten mit den Indolstandards beobachtet.

Mit der TRT-Technik (s. 3.5.4.) konnten Temperatur- und Belichtungseinflüsse auf die *Malassezia*- Pigmente nachgewiesen werden. Untersucht wurden die Auswirkungen folgender physikalischer Einflüsse auf das Rohextrakt und die Einzelfractionen:

- Bestrahlung mit 300 mJcm^{-2} UV-B
- Bestrahlung mit 2000 mJcm^{-2} UV-B
- Erhitzen auf 80°C für 20 min

Die zweidimensional entwickelten Platten wurden im UV-Licht und im sichtbaren Licht beurteilt. Fraktionen, deren erste und zweite Entwicklung in Dunkelheit bei Raumtemperatur stattfand und die keinem der genannten Einflüsse ausgesetzt wurden, zeigten in ihrem Chromatographiemuster keine Abweichungen von der Diagonalen. Sie dienten als Kontrolle.

Der Einfluß der UV- und Hitzeexposition ließ sich in einer ausgeprägten quantitativen Zunahme der Abweichungen von der Diagonalen sowohl im sichtbaren als auch im UV-Licht erkennen. Deutlich erkennbar war auch eine Zunahme veränderter Substanzen nach Bestrahlung mit 2000 mJ/cm^2 (Tab. 7.5) gegenüber Belichtung mit 300 mJ/cm^2 (Tab. 7.4). Die Hitzeexposition (Tab. 7.6) zeigte im Vergleich zu Kontrollen ebenfalls einen deutlichen Einfluß auf die Veränderung der Pigmente. Die genauen Daten zur Veränderung einzelner Banden unter den verschiedenen Einflüssen können den Tabellen 7.4-6 im Tabellenanhang entnommen werden.

Als Konsequenz erfolgte die Lagerung der Chromatogramme in Dunkelheit bei -20°C , um die Veränderungen der Substanzen möglichst gering zu halten und die weitere Analytik zu ermöglichen.

4.5 Tyrosinaseinhibition

Zur Charakterisierung bestimmter Substanzen innerhalb des Rohextrakts war die Aufreinigung einzelner Pigmente notwendig. Unter der Vermutung, daß der neue Pigmentstoffwechselweg mit der Pathogenese der Pityriasis versicolor im Zusammenhang stehen könnte, erfolgte die Auswahl der aufzureinigenden Substanzen nach möglichen biologisch-pharmakologischen Aktivitäten, die im Rahmen dieser Erkrankung von pathogenetischer Bedeutung sein könnten. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob im gebildeten Pigment Substanzen enthalten waren, die eine Hemmung der Melanogenese zeigen und so die bei der Pityriasis versicolor alba auftretenden Depigmentierungen erklären könnten.

Die Synthese des menschlichen Pigments Melanin verläuft in mehreren Schritten. Schlüsselenzym dieses Syntheseweges stellt die Tyrosinase dar, die die beiden ersten Reaktionsschritte (Abb. 15) kontrolliert. Alle weiteren Reaktionen bis zur Bildung des Melanins laufen spontan ab.

Hemmung der Tyrosinase durch ein Extrakt aus Hautschuppen bei florider Pityriasis versicolor (und damit wahrscheinlich durch Metabolite von *Malassezia*-Hefen) wurde bereits beschrieben (Jung 1976). In Anlehnung an diese Untersuchungen wurden die *Malassezia*-Pigmente auf Hemmung dieses Enzyms (Umsetzung von DOPA zu Dopachinon) überprüft.

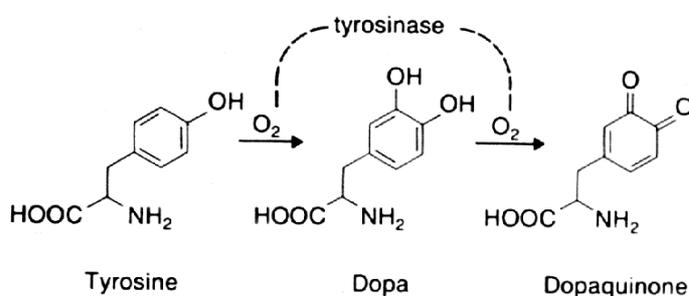


Abb. 15: Tyrosinase-katalysierte Schritte der Melanogenese

In ersten Versuchen stellte sich heraus, daß das Rohextrakt nicht direkt im unter 3.9 beschriebenen Assay untersucht werden konnte. Das Rohextrakt zeigte zwar gute Löslichkeit in DMSO, aber einzelne Bestandteile fielen aus, sobald es mit dem phosphatpufferhaltigen Reaktionsansatz gemischt wurde. Aufgrund der dabei auftretenden Trübung konnte die Reaktion nicht photometrisch verfolgt werden. Das Rohextrakt wurde daher wie unter 3.5 beschrieben über Säulenchromatographie vorfraktioniert. Bis auf die ersten drei Fraktionen, die starke Trübung im Reaktionsansatz zeigten, konnte jede Fraktion nun auf Inhibition im beschriebenen Ansatz untersucht werden.

Die Versuche zeigten, daß einzelnen Fraktionen spezifisch eine Inhibitorwirkung zugeordnet werden konnte, die sich auch in Folgeversuchen reproduzierbar erwies. Die stärkste Hemmwirkung zeigte Fraktion 10, dann folgten mit absteigender Wirkung die Fraktionen 11 und 5. Die übrigen Fraktionen zeigten keine Beeinflussung der Tyrosinase und die Umsatzkurven deckten sich in etwa mit den Kontrollkurven ohne Pigment. Die Hemmkurven sind in den Abbildungen 16, 17 und 18 dargestellt (jeweils fraktioniertes Extrakt aus CBS 1878 nach vier Wochen Wachstum auf Pigmentagar).

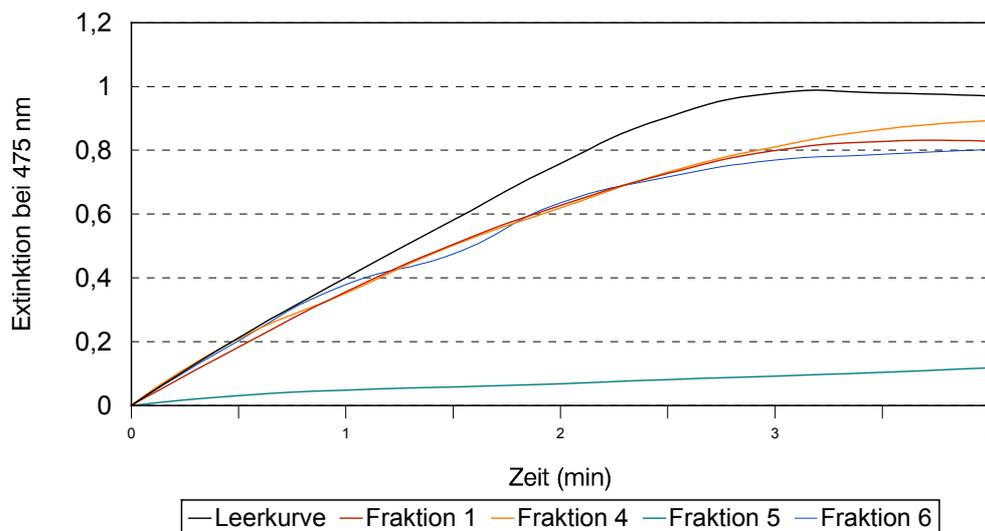


Abb. 16: Tyrosinaseinhibition durch Fraktion 5 (bei säulenchromatographischer Trennung entsprechend Tab.6)

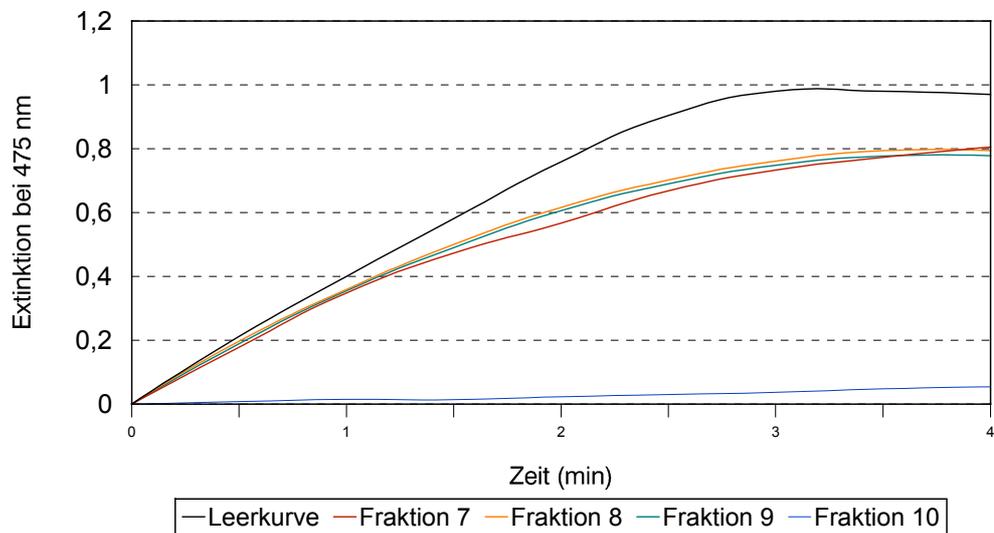


Abb. 17: Hemmung der Tyrosinase durch Fraktion 10 (bei säulenchromatographischer Trennung entsprechend Tab. 6)

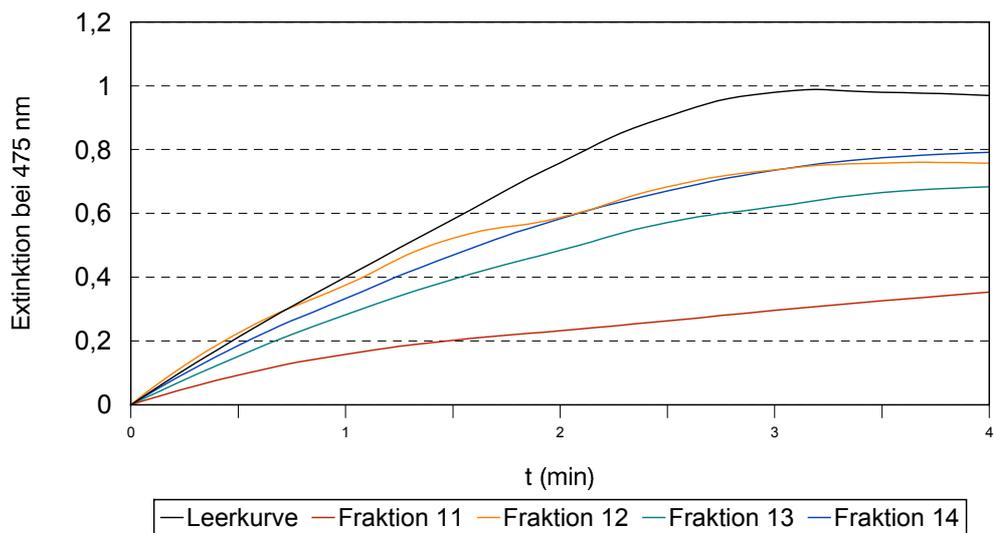


Abb. 18: Hemmung der Tyrosinase durch Fraktion 11 (bei säulenchromatographischer Trennung entsprechend Tab. 6)

Um einen Vergleich der Stärke der Hemmwirkung zu erhalten, wurde der Versuch mit 5-OH-Indol als bekanntem Tyrosinaseinhibitor durchgeführt. Dabei wurden 100 bzw. 200 µl einer 1M 5-OH-Indol-Lösung (in DMSO) zu zwei Ansätzen gegeben. Die Umsatzraten für Dopa betragen für die Kontrollen etwa 0,6 mMol/min, für die positiven Kontrollen 0,33 mMol/min (100 µl 5-OH-Indol) sowie 0,25 mMol/min (200 µl 5-OH-Indol). Unter Zusatz der zehnten Fraktion betrug der Dopa-Umsatz 0,105 mMol/min. Die Hemmwirkung entsprach damit in etwa einer Hemmwirkung von 500µl einer 1molaren 5-Hydroxyindollösung.

Ein Problem bei der Messung stellten die unterschiedlichen hohen Leerwerte der einzelnen Fraktionen dar. Diese waren auf die verschieden starke Braunfärbung der Fraktionen zurückzuführen. Während des Versuches wurden daher die Leerwerte der einzelnen Ansätze bestimmt, festgehalten und das Photometer wurde für den jeweiligen Ansatz auf Null kalibriert.

Um auszuschließen, daß es sich bei der Hemmwirkung um unspezifische toxische Effekte in Abhängigkeit von der enthaltenen Substanzmenge handelte, wurden die Leerwerte der einzelnen Fraktionen und ihre jeweiligen Hemmwirkungen verglichen (Tab. 8). Der Vergleich ergab, daß die stärkste Hemmwirkung zwar im Ansatz mit dem höchsten Leerwert zu finden war, allerdings fanden sich auch Fraktionen mit vergleichsweise hohen Leerwerten ohne Enzymhemmung (Fraktion 13). Daneben zeigten auch Fraktionen mit geringem Leerwert Hemmwirkung (Fraktion 11) während andere mit ebenso niedrigem Leerwert keine Hemmwirkung aufwiesen (Fraktion 17).

Darüber hinaus war der Leerwert in diesen Versuchen auch nicht zur Bestimmung der Substanzkonzentration zu verwenden, da sich die einzelnen Fraktionen (wie in der Dünnschichtchromatographie gezeigt, vgl. Abb. 11) aus zahlreichen verschiedenen Substanzen zusammensetzten, deren Absorptionsmaxima zudem nicht bekannt waren.

Diese Überlegungen legten nahe, daß die Hemmwirkung nicht auf unspezifische toxische Effekte in Abhängigkeit von der enthaltenen Substanzmenge zurückzuführen war, sondern daß durchaus spezifische Hemmstoffe in einzelnen Fraktionen enthalten waren.

Fraktion	Leerwert	Messergebnis
1	0,49	Keine Messung möglich (Trübung)
2	1,24	Keine Messung möglich (Trübung)
3	1,1	Keine Messung möglich (Trübung)
4	0,247	Keine Hemmung
5	0,684	Hemmung (9. Minute:0,131)
6	0,585	Keine Hemmung
7	0,250	Keine Hemmung
8	0,186	Keine Hemmung
9	0,2	Keine Hemmung
10	0,710	Hemmung (9. Minute 0,063)
11	0,39	Hemmung (9. Minute 0,381)
12	0,257	Keine Hemmung
13	0,607	Keine Hemmung
14	0,419	Keine Hemmung
15	0,182	Keine Hemmung
16	0,355	Schwache Hemmung
17	0,397	Keine Hemmung
18	0,23	Keine Hemmung
19	0,158	Keine Hemmung
20	0,1580,23	Keine Hemmung

Tab. 8: Leerwerte der Säulenfraktionen

4.5.1 Dünnschichtchromatographie der Hemmfraktionen

Die Hemmung der Tyrosinase durch einzelne Fraktionen erwies sich in Folgeversuchen als reproduzierbar. Die stärkste Hemmung fand sich je nach Schnitt der Säule in der zehnten oder elften Fraktion. Die hemmenden Fraktionen wiesen ein konstantes Bandenmuster auf (Tab. 9).

Sichtbares Licht		UV-Licht	
Farben	R _f -Wert	Farben	R _f -Wert
Bräunlich (vorher Blau)	0,063	Bräunlich/Gelb/Hell	0,038-0,05
Schwach gelblich	0,069-0,075	Schwach blau	0,069-0,089
Rosa	0,094-0,11	Blau	0,13-0,14
Bräunlich/Rosa	0,16-0,17	Blau	0,16-0,18
Gelb	0,18-0,21	Orange/Braun	0,18-0,19
Rosa	0,21-0,23	Stark fl. Gelb	0,19-0,22
Lila/Rosa (die beiden subst. Sind nur i. Mitte d. Platte getrennt)	0,24-0,26	Hellblau	0,23-0,24
Rosa/Lila	0,26-0,28	Rosa/erscheint unten Gelb	0,26-0,28
Gelb (leicht Orange ?)	0,33-0,34	Rosa	0,33-0,34
Lila	0,36-0,38	Gelb/Braun	0,36-0,37
Rosa	0,38-0,39	Hellblau/Lila	0,37-0,38
Lila Rand, innen ist Gelb zu erkennen	0,39-0,43	Rosa	0,38-0,4
Schwaches, helles Gelb	0,44-0,46	Bläulich/Lila	0,4-0,43
<u>Rosa, dieses ist aus folgenden Einzelbanden aufgebaut:</u>	0,47-0,51	Gelblich	0,43-0,44
- kräftiges Rosa	0,47-0,48	Rosa	0,46-0,48
- schwaches Rosa	0,48-0,49	Hellblau	0,48-0,49
- Rosa, ins Braun übergehend	0,49-0,51	Nichts/dunkles Lila	0,49
		Gelb/Rosa	0,5-0,51
		Helle Schatten, Farbe nicht zu erkennen	0,53-0,64

Tab. 9: Bandenmuster der **Hemmfraktion** im sichtbaren und im UV-Licht

Einzelne Banden der Hemmfraktion auf der Dünnschichtplatte zeigten während der ersten Stunden bei Raumtemperatur charakteristische Veränderungen. Diese bestanden in Form von

Farbumschlägen mit besonders starker Ausprägung in den oberen Banden: Rosa ($R_f = 0,49-0,51$) wurde nach einigen Stunden tief braun, während Lila/Gelb ($R_f = 0,39-0,43$) in ein Olivgrün überging. Die unteren Banden blaßten bereits nach einigen Stunden an der Luft ab und waren farblich nur direkt nach Entwicklung und Trocknen der Platten zu charakterisieren. Beim Vergleich der Dünnschichtchromatographien der Hemmfraction und ihrer Nachbarfraktionen ohne Hemmwirkung fand sich kein deutlicher Unterschied in der Zusammensetzung des Bandenmusters. Allerdings unterschieden sich die Banden in ihrer Farbintensität. Insbesondere bei den Banden mit hohen R_f -Werten zeigten sich die Farben in den nicht hemmenden Fraktionen weniger intensiv. Davon betroffen waren im einzelnen die zwei lila Banden ($R_f = 0,34-0,35$ und $R_f = 0,37-0,38$) sowie die von ihnen eingeschlossene rosa Bande ($R_f = 0,35-0,37$). In diesem Bereich zeigte sich ein weiterer interessanter Unterschied. Die lila Bande der Hemmfraction ($R_f = 0,39-0,43$), die bei Trocknung und Verbleib bei Raumtemperatur einen Olivton annahm, stellte sich in der nicht hemmenden Fraktion eher bräunlich/orange dar.

Die Unterschiede in Farbintensität und selbst in der Farbgebung konnten allerdings nicht als sicherere Hinweise auf einen spezifischen Unterschied in der Zusammensetzung der beiden Fraktionen gewertet werden, da sie ebenso gut auf einem generellen Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Fraktionen beruhen konnten. Die Hemmwirkung konnte daher nicht durch den direkten Vergleich des Bandenmusters zwischen hemmender und nicht hemmenden Fraktionen auf eine bestimmte Bande eingegrenzt werden. Deshalb wurden die einzelnen Banden der Hemmfraction aufgereinigt und dann auf Hemmung der Tyrosinase untersucht. Zu diesem Zweck wurde erneut Rohextrakt aufbereitet. Mit jeweils 10-20 μ l jeder Säulenfraktion wurde eine Übersichtschromatographie angefertigt und die R_f -Werte der Banden bestimmt. Eine Hälfte jeder Fraktion wurde im oben beschriebenen Ansatz auf Hemmung der Tyrosinase untersucht. Die verbleibende Hälfte der hemmenden Fraktion wurde über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Sie konnte dünnschichtchromatographisch in 16 Banden zerlegt werden. Die DC-Banden der Hemmfraction zeigen folgende R_f -Werte und Eigenfarben (Tab. 10).

Bande	Farbe:	R_f-Wert/Details:
1	unterhalb des untersten schwach fluoreszierenden Hell	0,031
2	UV-Gelb	0,05
3	Blau	im UV-Licht sichtbar;0,069-0,089
4	Blau 2	im UV;0,13-0,18
5	UV-Orange	0,18-0,19
6	Stark fl. Gelb	0,19-0,22
7	Hellblau	UV; 0,23-0,24
8	Weiß über Rosa/Lila :	0,26-0,28
9	Rosa/Gelb im UV-Licht :	0,26-0,28 im sichtbaren Licht Rosa/Lila
10	Sichtbar : Gelb; UV: Rosa	0,33-0,34
11	Keine Farbe	0,34-0,36; liegt im sichtbaren Licht zwischen unterem Lila und Gelb (10)
12	Unteres Lila	0,36-0,38
13	Rosa zw. Beiden Lila:	0,39-0,4
14	Oberes Lila, innen Gelb, später Oliv	0,4-0,43
15	Gelb	0,44-0,46
16	Oberstes Rosa, die drei zuvor beschriebenen Banden sind zusammen ausgekratzt; mittlere Bande rosa oder farblos?	0,47-0,51

Tab. 10: R_f-Werte der DC-Banden der Hemmfraction (grau hinterlegt: Banden mit Tyrosinaseinhibition)

Bei der Untersuchung der einzelnen Banden fand sich eine Hemmung des Enzyms in den Banden 13 bis 15. Keine Hemmung zeigten die Banden 1 bis 12. Die Hemmwirkung der Einzelbanden war jeweils schwächer als die durch die Gesamtfraction erzielte Tyrosinasehemmung. Die Inhibitorwirkung der Einzelbanden ist in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt. Aus dieser Abbildung geht ebenfalls die Stärke der jeweiligen Hemmungen hervor. In absteigender Reihenfolge hemmt Bande 15 stärker als die Banden 16, 13 und 14. Über die Konzentrationen der Banden konnte wiederum aufgrund der unbekanntenen Zusammensetzung allerdings keine Aussage gemacht werden.

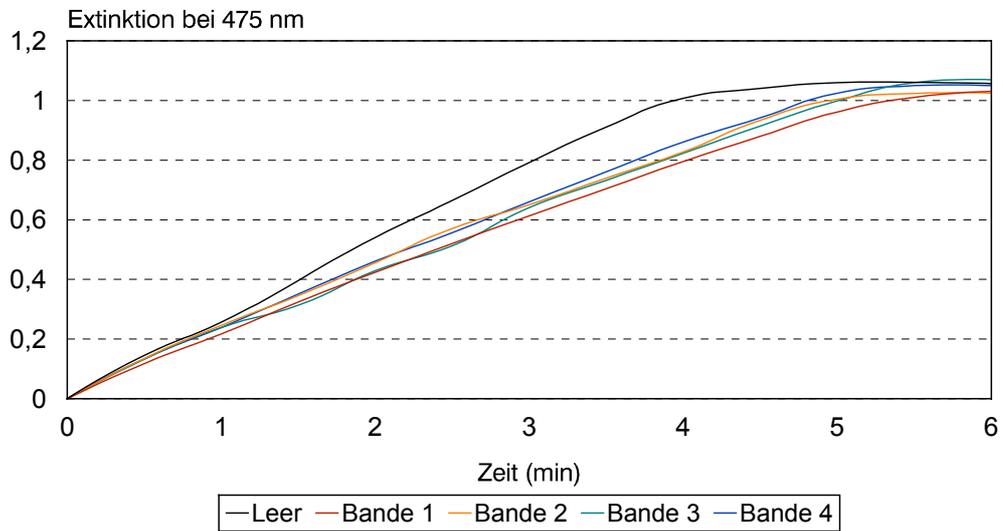


Abb. 19: Keine Hemmung der Tyrosinase durch DC-Bande 1-4

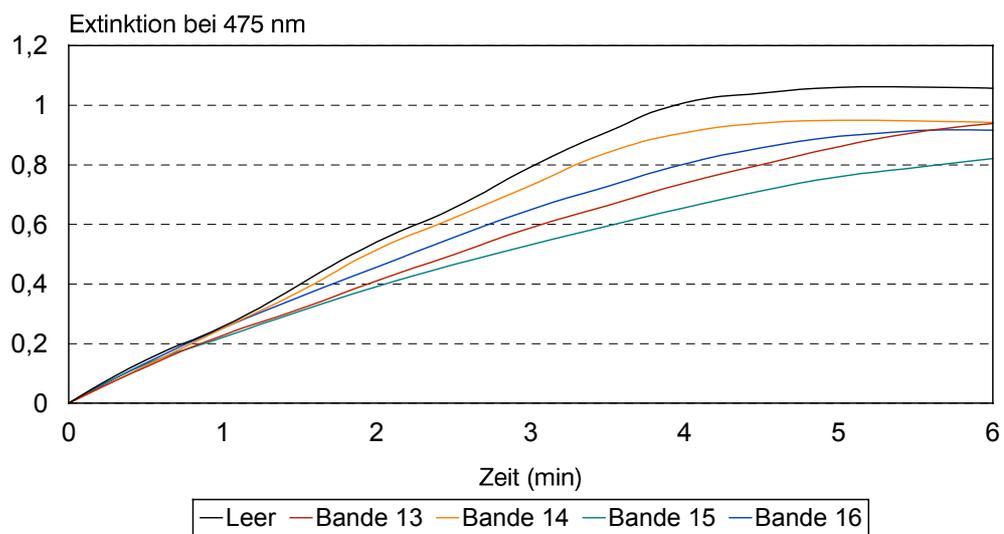


Abb. 20: Hemmung der Tyrosinase durch DC-Bande 16

4.6 HPLC

4.6.1 Analytische HPLC

Die hemmenden Einzelbanden wurden mittels analytischer HPLC auf ihre Zusammensetzung überprüft. Jeweils 5-10 µl der hemmenden Bande wurden bei einem Gradienten von 15-60% Acetonitril und 50 mM Phosphatpuffer chromatographiert.

Das HPLC-Muster der hemmenden Banden zeigte bis zu 15 Peaks. Die HPLC-Muster der Banden waren jeweils voneinander verschieden. In allen hemmenden Banden fand sich ein gemeinsamer Peak bei 24,1 min (ca. 60% Acetonitril). Weitere gemeinsame Peaks fanden sich nicht.

In der Annahme, daß die den untersuchten Banden gemeinsame Hemmwirkung auf diese allen gemeinsame Substanz zurückzuführen sei, wurde diese Substanz aus weiteren Chargen von Rohextrakt aufgereinigt.

4.6.2 präparative HPLC

Durch Aufreinigung neuen Rohextrakts wurde der allen Hemmbanden gemeinsame Peak aus der gelben ($R_f = 0,44-0,46$) und der rosa Bande ($R_f = 0,47-0,51$) über die präparative HPLC isoliert. Aus technischen Gründen konnte die präparative HPLC nicht im Gradienten durchgeführt werden. Die Auftrennung der gelben Bande erfolgte daher isokratisch. Der Phosphatpuffer wurde durch gradientenreines Wasser ersetzt (keine Versalzung der aufgetrennten Substanzen und so bessere Voraussetzung für die spätere Analyse; mündliche Mitteilung aus München), so dass sich das Laufmittel aus einem Gemisch aus 45% Acetonitril und gradientenreinem Wasser zusammensetzte.

Bei der eingesetzten Konzentration erschien die gesuchte Substanz nach 8,1 min. In mehreren Folgeläufen wurden ca. 10 ml der in Acetonitril gelösten Banden aufgereinigt. Nach Abrotieren des Acetonitrilanteils mittels Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung (Lyovac GT2) wurden ungefähr 0,2 mg einer weiß bis leicht gelblichen Substanz erhalten.

Die Überprüfung der isolierten Peaks im analytischen Gradienten zeigte die Reinheit der Substanzen an (Peak bei 24,1 min). Koinjektion der aus beiden Banden aufgereinigten Peaks ergab Deckungsgleichheit und bestätigte, daß es sich bei den beiden aufgereinigten Substanzen um identische Stoffe handelte.

4.7 Tyrosinasereaktion

Ein erster Versuch der aus der Hemmbande aufgereinigten Substanz (Peak bei 24,1 min) in einer mit den vorhandenen Waagen nicht bestimmbar Menge zeigte Hemmwirkung auf die Tyrosinase (Abb. 21)

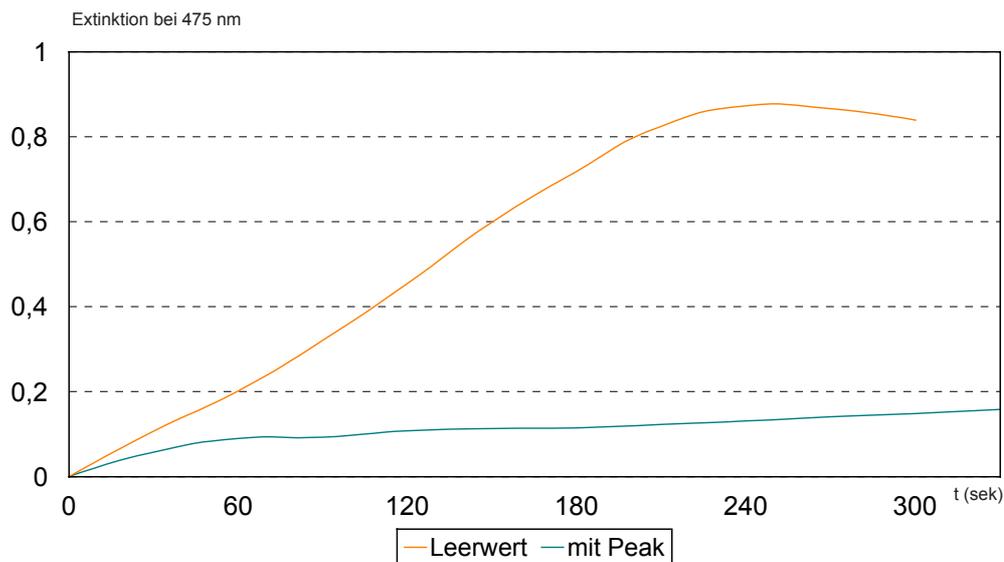


Abb. 21: Hemmung der Tyrosinasereaktion durch Einzelpeak (8,1 min bei 45% CH₃CN aus Bande 15/16)

Für die Strukturaufklärung war die gewonnene Substanzmenge (0,2 mg) nicht ausreichend. Daher erfolgte die erneute Auftrennung von Rohextrakt. Um größere Substanzmengen zur Strukturaufklärung zur Verfügung stellen zu können, wurden ca. 200 Kulturplatten aufgearbeitet und der entsprechende Peak mittels HPLC isoliert. Da die gelbe DC-Bande (15) mengenmäßig am größten war, wurde nur diese Bande aufgereinigt. Der aufgereinigte Peak fand sich bei 21,8 min in der Gradienten-HPLC. Bei der Aufarbeitung jeder Rohextraktcharge erfolgte die Überprüfung der Säulenfraktion auf Hemmung der Tyrosinase. Die über HPLC aufzutrennenden DC-Bande und die nach HPLC-Trennung gewonnene Substanz wurde nicht auf Tyrosinaseinhibition überprüft, um die Substanzmenge nicht weiter zu verringern.

Nach Überprüfung auf Reinheit konnten so ca. 0,8 mg einer hellgelben Festsubstanz zur Analyse gegeben werden.

4.8 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der isolierten Substanz erfolgte durch Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Steglich am Institut für organische Chemie der LMU München. Dort wurde die Reinheit des aufgereinigten Peaks bestätigt. Das UV- Spektrum der Substanz zeigte Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{max}} = 219, 243, 267$ und 290 nm und lieferte damit bereits einen Hinweis auf das Vorliegen einer Indolstruktur der Verbindung.

Die Molekülmasse der isolierten Substanz wurde durch hochauflösende Massenspektroskopie (HRMS) zu $274,1113$ g/mol bestimmt. Daraus ergab sich eine Summenformel von $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$. Auch das Massenspektrum bestätigte die im Rahmen der Vorversuche (Ehrlich's Reagenz, Vergleich mit Standards) gewonnene Vermutung, daß der neue Pigmentstoffwechselweg mit der Bildung von Indolderivaten einhergeht. Es fanden sich folgende Bruchstücke: 257,1 (Abspaltung einer Hydroxygruppe – OH); 157,1 (**Abspaltung von Indol – $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}$**); 128,1 (Verlust einer Aldehydgruppe – CHO). Dieser Massenverlust von 29 wies auf einen endständigen Aldehyd hin. Auch das IR-Spektrum deutete mit der charakteristischen Carbonylbande bei 1930 nm auf eine 3-Indolylketonstruktur hin (Millich 1958).

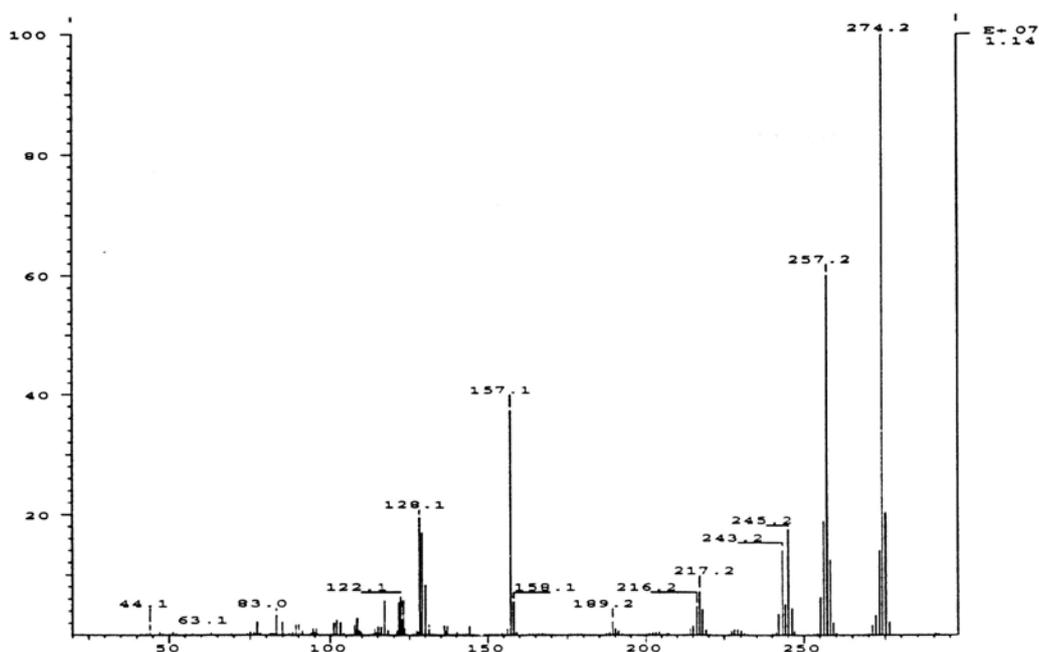


Abb. 22: Massenspektrum

In H-NMR- und H,H-COSY-Spektren zeigten sich im Aromatenbereich zwei Ringsysteme (AA'BB'-Systeme). Unter Berücksichtigung zuvor aus dem Rohextrakt mit GC/MMS identifizierter Derivate (3-Methyl-1H-indol, Indol-3-ethanol, Indol-3-aldehyd, 1-H-Indol-3-Essigsäuremethylester und Indol) (Mayser et al 1998) wurde eine verbrückte Struktur aus zwei Indolringsystemen angenommen. Die genaue Positionierung der in der Massenspektrometrie erkennbaren Aldehydgruppe (2- oder 3-Position) an einem der Pyrrolringe wurde durch UV-Spektren bestimmt. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der isolierten Verbindung mit einer äquimolaren Mischung aus Indol-3-carbaldehyd und Indol, deutliche Unterschiede allerdings mit dem UV-Spektrum einer Mischung aus Indol-2-carbaldehyd mit Indol. Diese Ergebnisse deuteten auf die 3-Stellung der Aldehyd-Gruppe hin.

Die Verbrückung der beiden Indolringsysteme über die Methylengruppe konnte durch Vergleich von ^{13}C und ^1H -NMR-Daten dieser Gruppe mit den entsprechenden Daten des nahe verwandten 3,3'-Methylenbisindols gesichert werden (Bestätigung durch NOESY-Spektrum). Damit ergab sich für die isolierte Substanz die folgende Strukturformel, auf deren Grundlage die MS- und NMR-Spektren vollständig interpretierbar waren:

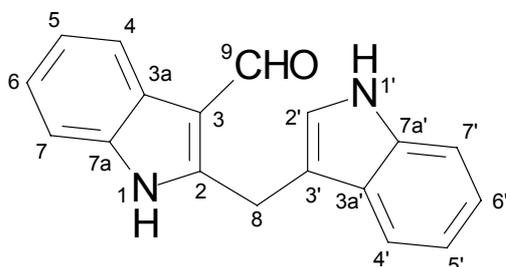


Abb. 23 Strukturformel Malassezin

Bei dieser Verbindung handelt es sich um eine in der Gruppe der Naturstoffe bisher unbekannte Substanz. Die Verbindung ist lediglich als massenspektroskopisches Fragment aus 3-Formyl-2,3'-(o-acetamidophenethyliden)bisindol bekannt (Echavarren, A.M. 1990).

In der Gruppe der Naturstoffe sind Verbindungen mit 2,3'-Bisindolylstruktur äußerst selten. Bisher wurden erst einzelne Verbindungen dieser Art aus Schwämmen der Gattung Gellius, die sogenannten Gellusine isoliert (Ishii et al. 1988). Diese stellen halogenierte Alkaloide dar, die sich allerdings bis auf die Bisindolylstruktur in ihrem Substitutionsmuster deutlich vom Malassezin unterscheiden.

4.8.1 Überprüfung der Münchner Synthese auf Identität mit dem Naturstoff

Das bisher unbekannte Indolderivat Malassezin wurde in München synthetisiert (Wille 1999). Ausgangssubstanzen bildeten dabei Indol und Indol-3-carbaldehyd, die beide im Rohextrakt vorhanden sind (Syntheseweg s. Abb. 9). Durch HPLC-Koinjektion der Substanz mit der gelben Bande (Probe 14) unter variierten Bedingungen konnte gezeigt werden, daß die dargestellte Substanz tatsächlich als Naturstoff unter den Pigmenten der *Malassezia*-Hefen zu finden war. Bei Koinjektion der synthetisierten Substanz und der Bande 14 fand sich bei verschiedenen Gradienten und unterschiedlichen isokratischen HPLC-Bedingungen Deckungsgleichheit des Peaks der Synthese und einer Komponente der ursprünglichen Probe: Deckungsgleichheit bei Gradienten 15-60% CH₃CN: 21,24 min (Abb. 24-26), Deckungsgleichheit bei isokratischen Elutionsbedingungen von 55% CH₃CN: 3,9 min. Die synthetisierte Substanz fand sich nicht in den benachbarten Banden, so auch nicht in Probe 13 (Pink/Oliv).

4.8.2 Überprüfung von Malassezin auf Hemmung der Tyrosinase

Im Enzymversuch zeigte die in München synthetisierte Substanz Malassezin nicht die erhoffte Hemmung der Tyrosinase.

In darauf durchgeführten Folgeversuchen (n=18) konnte jedoch die Hemmung des Enzyms durch die Säulenfraktion, der die aufgereinigte Substanz entstammte, wiederholt werden. Bei der erneuten Untersuchung der Dünnschichtbanden dieser Fraktion zeigte sich allerdings, daß die Enzyminhibition auf die benachbarte Bande zurückzuführen war (lila-gelbe Bande, die sich nach einiger Zeit bei Raumtemperatur oliv verfärbte). Die Auftrennung dieser Dünnschichtbande mittels HPLC erwies sich in zahlreichen Folgeversuchen mit den gegebenen präparativen isokratischen HPLC-Bedingungen als nicht möglich (Überlagerung der Peaks, keine deutliche Trennung).

Um trotz der nicht möglichen weiteren Trennung der Dünnschichtbande einen ersten Einblick in die Wirkweise der Enzymhemmung zu gewinnen, erfolgten die Versuche zur Lineweaver-Burk-Kinetik unter Verwendung der gesamten hemmenden Dünnschichtbande. Dabei setzte sich diese aus mindestens 12 einzelnen Peaks zusammen, wie die Protokolle der analytischen HPLC zeigten. Aufgrund der schon angesprochenen Mengenproblematik konnte die Messung allerdings nicht wiederholt werden, so dass die Ergebnisse nur näherungsweise zu betrachten sind. Sie sind daher nur im Tabellenanhang dargestellt.

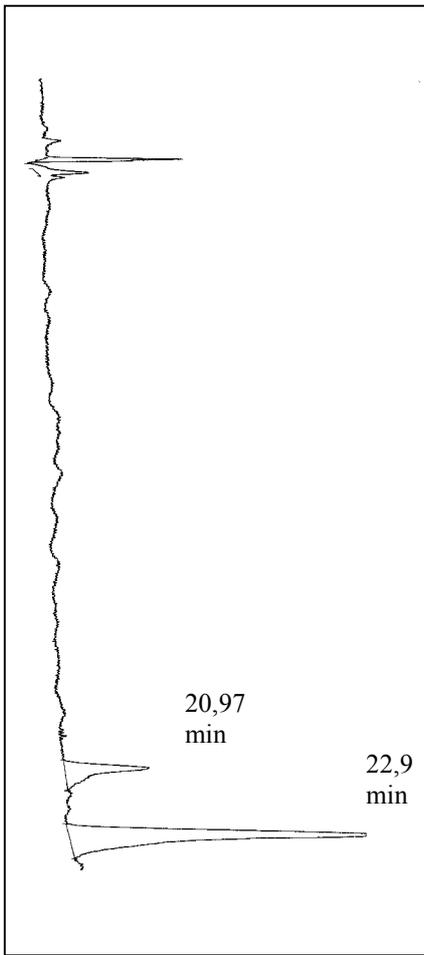


Abb. 24: gelbe Bande (15) im Gradienten (15-60%CH₃CN): der Peak bei 22,9 min wurde isoliert.

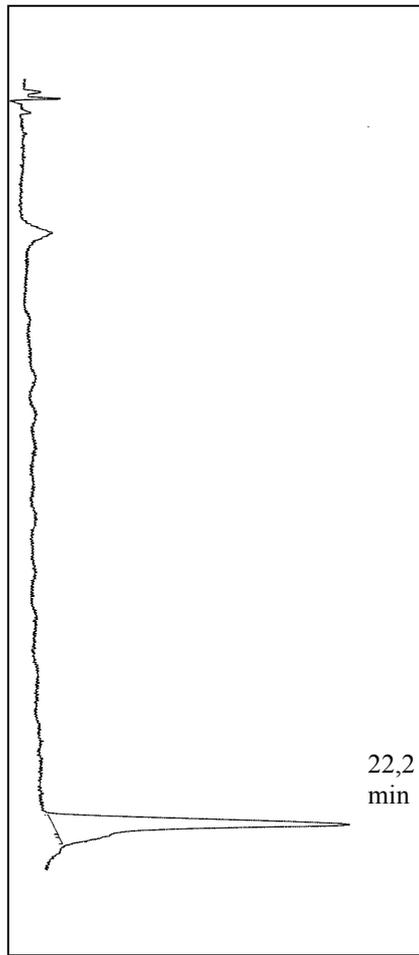


Abb. 25: synthetisches Malassezin erscheint im Gradienten bei 22,2 min.

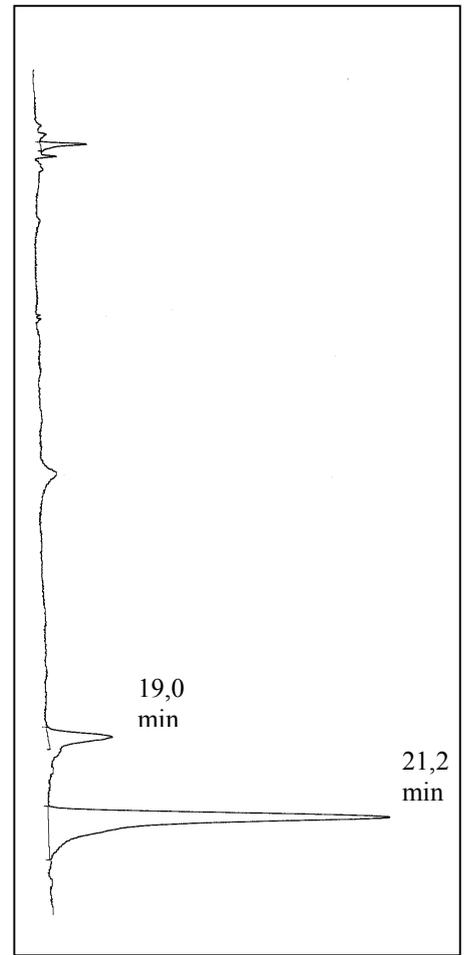


Abb. 26: Koinjektion von synthetischem Malassezin und Bande 15, aus der der Naturstoff aufgereinigt wurde, zeigt Deckungsgleichheit des Peaks von Malassezin und Hauptpeak der gelben Bande bei 21,23 min.

4.9 Malassezin und seine Eigenschaft als Agonist des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors

Malassezin weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Indolo-[3,2-b]-carbazol auf. Diese Verbindung ist als Agonist des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors (AHR) bekannt. Malassezin wurde daher auf agonistische Aktivität an diesem Rezeptor überprüft.

Der AHR stellt einen intrazytoplasmatischen Rezeptor dar, der nach Bindung eines Agonisten über einen rezeptorvermittelten Prozeß in den Zellkern gelangt und dort auf transkriptionaler Ebene die Expression bestimmter Gene kontrolliert. Er scheint sowohl an der Kontrolle von Zellwachstum als auch der Zelldifferenzierung beteiligt. Eine Induktion dieses Rezeptors bewirkt aber auch eine erhöhte Transkription der mischfunktionellen Oxygenasen der Cytochrom P450-Superfamilie. Der Rezeptor ist somit auch an der Regulation des Fremdstoffmetabolismus beteiligt. Untersuchungen zur Funktion dieses Rezeptors wurden überwiegend an Hepatozyten durchgeführt, allerdings liegt er in zahlreichen Geweben vor, so auch in den Keratinozyten der Epidermis (Jones 1997). Experimentell konnte gezeigt werden, dass Malassezin als Agonist des AHR Cytochrom P450 ($EC_{50}=1.57 \mu\text{M}$) in Rattenhepatozyten induziert (Wille et al. 2001).

Damit stellt Malassezin einen AHR-Agonisten dar, der nicht den bisher postulierten strukturellen Hauptkriterien eines solchen entspricht: so ist seine Struktur weder planar noch passt sie in ein $7 \times 14 \text{ \AA}$ großes Rechteck, beides Kriterien, die lange Zeit als Voraussetzung für die Funktion eines AHR-Agonisten als unabdingbar angesehen wurden (Gillner et al. 1985). Zusätzlich unterscheidet er sich von den bisher bekannten AHR-Agonisten durch seine offenkettige Struktur und stellt damit den ersten AHR-Agonisten dieser Struktur dar (Abb. 27).

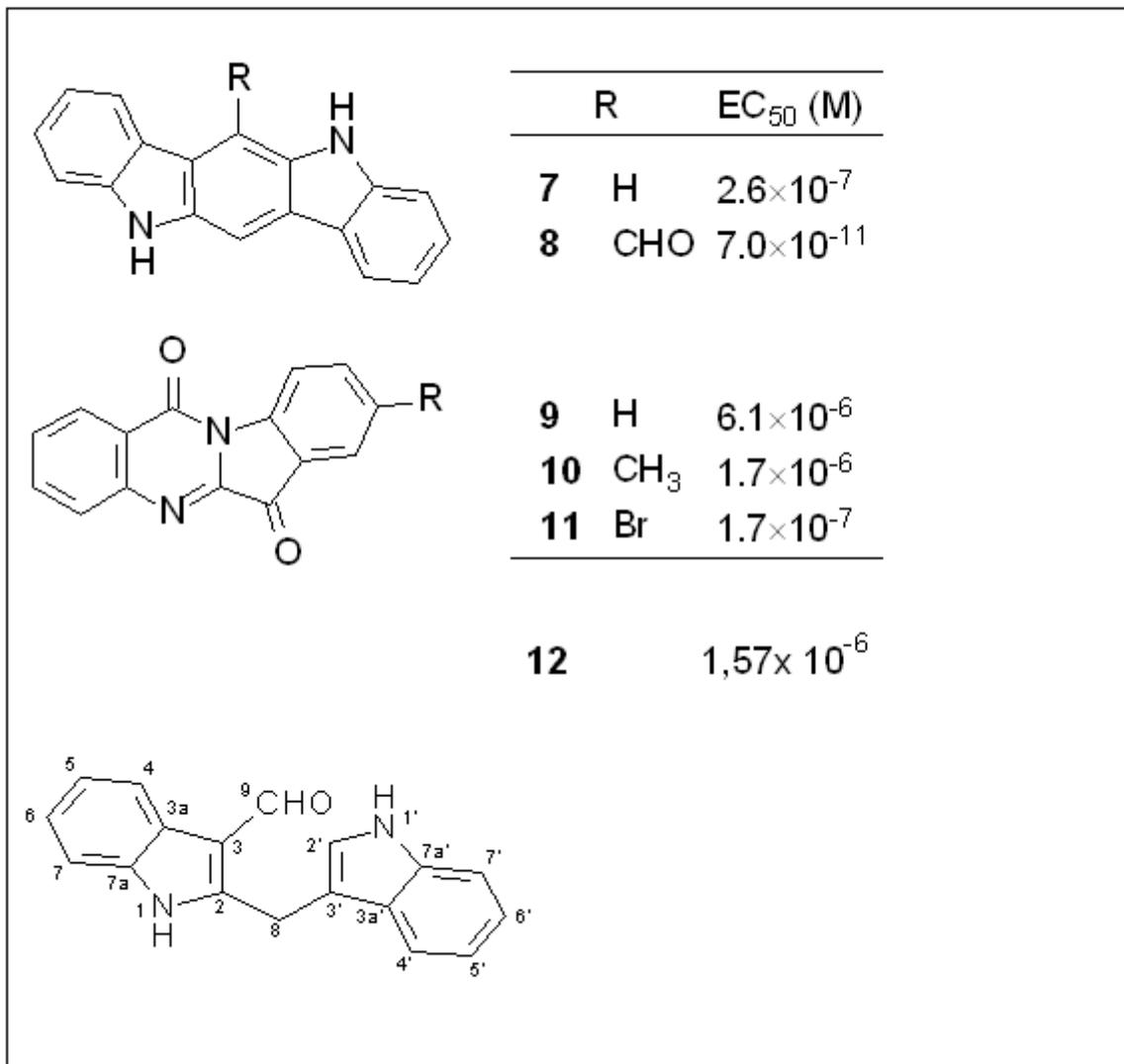


Abb. 27: Bekannte AHR-Agonisten und ihre jeweilige Affinität zum Rezeptor: Indolo-[3,2-*b*]carbazol (**7**), 6-Formyl-indolo[3,2-*b*]carbazol (**8**), Tryptanthrine (**9-11**) sowie Malassezin (**12**)

5 Diskussion

Die Kultur der lipiddependenten *Malassezia*-Hefen ist auf einem Minimalmedium aus Agar, einer Lipid- und einer Stickstoffquelle möglich. Durch Gabe von Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle wurde ein bisher unbekannter Stoffwechselweg in *Malassezia furfur*-Stämmen induziert (Mayser et al. 1998). Dieser beinhaltet die Bildung eines braunen Pigments mit gelblich-grüner Fluoreszenz im UV-Licht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung dieses Pigments auf mögliche pathogenetisch bisher nur unzureichend geklärte Phänomene der Pityriasis versicolor.

Die Pityriasis versicolor stellt eine durch *Malassezia*-Hefen verursachte Hauterkrankung dar, die mit Pigmentverschiebungen der Haut einhergeht (Sunenshine 2002). Bei diesen Pigmentverschiebungen handelt es sich einerseits um makulöse Hyperpigmentierungen eines breiten Farbspektrums von gelblichen über rötlich-braune bis zu schwarzen Farbtönen (Pityriasis versicolor), andererseits um Hypo- und Depigmentierungen, die sich im Anschluss an das hyperpigmentierte Stadium oder auch spontan entwickeln (Pityriasis versicolor alba). Die hyperpigmentierten Hautveränderungen zeigen im UV-Licht gelblich-grüne Fluoreszenz. Die Pathogenese der Pigmentierungen und Depigmentierungen bei der Pityriasis ist letztendlich ungeklärt, wenn auch verschiedene Hypothesen zu ihrer Entstehung vorliegen. Gerade deshalb erscheinen die Parallelen zwischen der Pigmentbildung durch *Malassezia furfur* in Kultur und den Hyperpigmentierungen der durch *Malassezia*-Hefen verursachten Pityriasis versicolor interessant.

5.1 Tryptophanmetabolite als mögliche Ursache von Hyper- und Depigmentierungen

Zur Abklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Pigmentbildung durch *Malassezia furfur* in Kultur und der Klinik der Pityriasis versicolor wurde ein Weg zur Trennung und Aufreinigung einzelner Pigmentkomponenten erarbeitet. Da die Induktion der Pigmentbildung nur durch die alleinige Verfügbarkeit von Tryptophan erfolgte, lag die Annahme nahe, daß es sich bei den Pigmenten um Tryptophanmetabolite handelt.

Zwei verschiedene Wege des Tryptophanmetabolismus sind beschrieben. Zum einen der „Ommochromstoffwechselweg“, hier erfolgt die Öffnung des Pyrrolrings im Indolmolekül, zum anderen der „Indolstoffwechselweg“ unter Erhaltung des Indolringsystems des Tryptophans.

Bereits bei der chromatographischen Auftrennung der *Malassezia*-Pigmente ergaben sich Hinweise auf das Vorliegen von Indolkomponenten. So zeigte sich eine vollständige Trennung der Pigmentkomponenten nach der Methode zur dünnschichtchromatographischen Darstellung von Indolen (Gill und Steglich 1987), auch mittels Ehrlich's Reagenz konnten Indole dargestellt werden. Im dünnschichtchromatographischen Vergleich des Pigments mit Standards des Ommochrom- und Indolstoffwechselweges konnte die zentrale Substanz des Ommochromweges 3-Hydroxy-Kynurenin nicht nachgewiesen werden, wohl aber zeigte sich die Identität einzelner Banden des Pigments mit Indol-3-Acetat ($R_f = 0,38$ in den Fraktionen II, III und IV). Auch der erste Metabolit, der aufgereinigt wurde, zeigt Indolstruktur. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Pigmentbildung durch *Malassezia*-Hefen mit der Bildung von Indolderivaten einhergeht.

Indole zählen zu den bekannten Syntheseprodukten von Pilzen. Medizinisch bedeutsam sind hier beispielsweise Serotonin-Antagonisten mit LSD-ähnlicher Wirkung wie Psilocybin, Psilocin und Baeocystin. Diese insbesondere von Psilocybe-Arten gebildeten Substanzen stellen den Auslöser des Mycetismus cerebralis dar (Bresinsky 1985). Desweiteren sind Indole als Naturpigmente seit langem bekannt. Purpur und Indigo stellen nur zwei Beispiele von Farbstoffen mit Indolgrundstruktur dar (Breuer 1989). Auch Melanin, das Pigment der menschlichen Haut stellt ein Polyindolderivat dar.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Bildung von Pigmenten mit Indolstruktur durch *Malassezia*-Hefen die Hyperpigmentierungen bei der Pityriasis versicolor erklären könnte.

Bildung von Pigmenten und Fluorochromen bei Erregern von Hautinfektionen ist schon lange bekannt, so erkannte Lücke bereits 1862 die Ursache der grünspanartigen Verfärbung eitrigiger Wundinfektionen in der Pigmentbildung durch *Pseudomonas aeruginosa* (Schaal 1994). Bekannt sind hier insbesondere Pyocyanin (*Pseudomonas aeruginosa*), aber auch weitere Substanzen wie Pyorubin und Pyomelanin wurden beschrieben. Die Pigmente zeigen im UV-Licht blau-grünliche Fluoreszenz. Auch *Corynebacterium minutissimum* ist für die Bildung fluoreszierender Substanzen bekannt. So findet sich bei Infektionen der Haut Fluoreszenz der betroffenen Areale durch Bildung von Porphyrinen.

Pigmentbildung durch *Malassezia*-Hefen war bislang nicht bekannt. Mit der Entdeckung des Pigmentstoffwechselweges der *Malassezia*-Hefen muß die Genese der Hyperpigmentierungen bei der Pityriasis versicolor durch farbige Stoffwechselprodukte der Erreger diskutiert werden. Dies insbesondere vor dem Hintergrund zwar zahlreicher aber in neueren Untersuchungen teils nicht belegter Hypothesen zur Genese der Hyperpigmentierungen.

Bisherige Hypothesen zur Entstehung der Hyperpigmentierungen bei der Pityriasis versicolor umfassen verschiedene Mechanismen. So werden

- 1) entzündliche Prozesse (Dotz 1985, Kwon-Chung 1992, Hay 1992, Galadari 1998),
- 2) Veränderung melanozytärer Strukturen (Allen 1972, Charles 1973),
- 3) die Eigenfarbe der Pilzzellen selbst (Mittag 1996) sowie
- 4) ein vermehrter Turnover der Epidermis mit Verdickung des Stratum corneum als Ursache der Hautpigmentierungen diskutiert (Galadari 1998).

Entzündliche Veränderungen als Ursache der Hyperpigmentierungen stehen im Widerspruch zum klinischen Ablauf der Erkrankung ohne deutliche Entzündungszeichen (Mittag 1996). Histologisch finden sich trotz hoher Erregerdichte im Stratum corneum nur geringfügige entzündliche Veränderungen der Dermis, eindeutige Entzündungszeichen fehlen (El-Hefnawi et al. 1972; Charles et al. 1973; Ackermann 1997). Auch die humorale und zelluläre Abwehrreaktion fallen eher gering aus (Sohnle 1978 und 1983, Wu 1985, Nenoff et al. 2001). Andere *Malassezia*-assoziierte Erkrankungen wie beispielsweise das seborrhoische Ekzem sind im Gegensatz zur Pityriasis versicolor durch deutliche Entzündungszeichen gekennzeichnet, verlaufen aber ohne die typischen Hyperpigmentierungen.

Eine veränderte Größe, Verteilung und Anzahl von Melanosomen (Allen 1972, Charles 1973) erscheinen als Ursache der Hyperpigmentierungen fraglich. Zum einen konnten diese Beobachtungen durch andere Autoren nicht bestätigt werden (Galadari 1998), zum anderen wird das Auftreten von Pityriasis versicolor in Läsionen der Vitiligo beschrieben (Dotz 1985). In Vitiligoherden bestehen aufgrund autoimmunologischer Vorgänge keine Melanozyten mehr; so daß sie zumindest hier für die Pathogenese der Hyperpigmentierungen nicht von Bedeutung sein können.

Belege für die Pilzzellen selbst als Ursache der Hyperpigmentierungen der Haut finden sich in der Literatur nicht, ein vermehrter Turnover der Epidermis mit Verdickung des Stratum corneum konnte von Charles (1973) nicht bestätigt werden, allerdings stellte er histologisch eine leichte Hyperkeratose der Herde fest.

Allen genannten Hypothesen fehlt eine Erklärung für die Fluoreszenz der Hyperpigmentierungen sowie für ihre immer wieder beschriebene Farbvielfalt.

Diese Phänomene wie auch das Auftreten von hyperpigmentierten Herden in Läsionen der Vitiligo wären durch die Pigmentbildung der *Malassezia*-Hefen erklärbar. Die Fluoreszenz der erkrankten Hautareale könnte direkt auf die Bildung der Fluorochrome zurückgeführt werden. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, zeigt das Pigment bei der chromatographischen Trennung zahlreiche verschieden farbige Fluoreszenzen, insbesondere

aber finden sich gelb und blau fluoreszierende Banden bei der Dünnschichtchromatographie. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Fluoreszenz eines ersten aufgereinigten Fluorochroms in Abhängigkeit von der Lipophilie des Lösungsmittels farblich variiert (Mayser und Stapelkamp 2002).

Auch die zahlreichen Farbtöne der Hyperpigmentierungen bei der Pityriasis versicolor könnten auf den Pigmentstoffwechsel von *M. furfur* zurückgeführt werden: bei dünnschichtchromatographischer Trennung des braunen Pigments werden zahlreiche Pigmente des gesamten Farbspektrums sichtbar (Tab. 6). Sie umfassen gelbe, rote, orange, grüne, blaue und braune Banden. Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Pigmente sind gegenüber Sauerstoff empfindlich. Bei protrahierter Verweildauer an der Luft finden sich Farbumschläge zunächst kräftig roter Farbtöne in bräunliche, dann gelbliche Farbtöne, bevor sich nach einigen Wochen ein insgesamt abgeblaßtes Bandenmuster zeigt. Dieser Effekt wird durch Exposition der Substanzen gegenüber höheren Temperaturen und UV-Licht verstärkt, wie die TRT-Versuche zeigen. Analog diesen Umsetzungen könnte der charakteristische Farbwechsel der PV-Läsionen vom rötlichen ins bräunlich-gelbe erfolgen. Hierfür wären somit weder Entzündungszellen (für das rötliche - bisher als entzündlich gedeutete Stadium) noch Melanosomen (für das bräunliche Stadium) erforderlich. Damit könnte *M. furfur* auch in Vitiligoherden pigmentierte Hautveränderungen hervorrufen. Einen weiteren Einflußfaktor auf die farbliche Varianz der gebildeten Pigmente stellt der pH-Wert dar. So zeigen einzelne Banden der DC im sauren Milieu kräftige rote und rotbraune Pigmentierungen, die im alkalischen Bereich (Ammoniakdämpfe) in schwache Gelbtöne umschlagen. Inwieweit diese pH-Schwankungen allerdings in vivo von Bedeutung sind, ist fraglich.

Besonderes Interesse galt der Frage, ob im gebildeten Pigment Substanzen vorhanden sind, die auch die Depigmentierungen der Pityriasis versicolor alba erklären können. Dabei handelt es sich um Depigmentierungen der Haut, die bei einem Teil der Patienten nach Abblässen der Hyperpigmentierungen auf der Haut erscheinen und sehr resistent sind. Unter Sonneneinstrahlung bzw. UV-Therapie zeigt sich hier keine Bräunung der Haut, erstaunlicherweise findet sich auch kein Sonnenbrand in den depigmentierten Arealen, wie es von anderen Depigmentierungen, beispielsweise der Vitiligo bekannt ist.

Ebenso wie die Pathogenese der Hyperpigmentierungen ist die Entstehung dieser Depigmentierungen nicht geklärt. Auch hier existieren verschiedene Modelle. Lange Zeit wurden die Depigmentierungen als Pseudoleukoderm infolge der lichtfilternden Wirkung durch Schuppen- und Pilzauflagerungen verstanden (Lutz 1892, Kistiakowsky 1927,

Wertheim 1928, Lewis 1936, Allen 1972). Diese These wurde gestützt durch Beobachtung der Entwicklung von Depigmentierungen in vormals hyperpigmentierten Arealen unter UV-Bestrahlung (Kistiakovsky 1927, Wertheim 1928). Insbesondere das vollständige Fehlen eines Erythems in den befallenen Hautarealen bei deutlicher Umgebungsreaktion der Haut bei UV-Bestrahlung wurde als Hauptargument für das Vorliegen eines (physikalischen) Lichtfilters angesehen. Heute wird vom Vorliegen eines echten Leukoderms ausgegangen. Gegen ein Pseudoleukoderm aufgrund rein physikalischer Filterwirkung gegenüber UV-Strahlung: sprechen:

- Klinische Beobachtungen von Depigmentierungen in nicht belichteter Haut wie der Genitoanalregion (Artom 1930, Blumenthal 1971, Nia 1979) sowie Depigmentierungen schwarzer Haut (Jeliffe 1954, Sulzberger und Satenstein in Lewis 1935, Goldsmith 1936). Aufgrund dieser Beobachtungen vermutete Sulzberger bereits 1935 das Vorliegen eines „das Hautpigment aktiv entfernenden Agens“ (Lewis, G.M. 1935).
- Die deutlich zeitlich verzögerte Repigmentierung der Herde trotz nicht mehr vorhandener Schuppung; eine Tatsache, die Barney 1932 zu der Vermutung einer Zerstörung bzw. „Lähmung“ der Pigmentzellen veranlaßte („destroyed or paralysed pigment forming cells“), da selbst mit Einsatz von Bergamotte-Öl unter UV-Bestrahlung keine Repigmentierung der weißen Herde innerhalb von drei bis sechs Wochen erzielt werden konnte (Pardo-Castello 1932).
- Die histologisch und elektronenmikroskopisch sichtbare melanozytäre Schädigung mit eingeschränkter Melanogenese.

Insbesondere ultrastrukturelle Untersuchungen zur Mikromorphologie der depigmentierten Haut liefern Hinweise auf Wechselwirkungen der *Malassezia*-Hefen bzw. ihrer Metabolite mit der Melanogenese. So zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen selektiv toxisch-degenerative Veränderungen der Melanozyten in Form von mitochondrialer und zytoplasmatischer Vakuolisierung unterschiedlicher Stärke, Hervortreten des Zytoskeletts und Einstellung der Melaninproduktion bis zur Zellschrumpfung von Melanozyten (Galadari 1992, Brethnach 1984). Die Anzahl der Melanosomen im Stratum spinosum ist im Vergleich zu gesunder Haut deutlich vermindert (3,5 Melanosomen versus 21,3 in gesunder Haut-Galadari 1992, Karaoui 1980). Das einzelne Melanosom ist verkleinert und die Melanosomen liegen nicht wie in gesunder Haut verteilt vor, sondern bilden Aggregate (Galadari 1992, Brethnach 1984). Auch lichtmikroskopisch findet sich in den depigmentierten wie auch in den hyperpigmentierten Arealen im Vergleich zu gesunder Haut des gleichen Individuums eine

geringere Dichte des Pigments innerhalb der Melanozyten in DOPA-Reaktion und Fontana-Färbung (El-Gothamy 1975). Die beschriebenen Veränderungen sprechen sowohl für eine Störung der Melanogenese (herabgesetzte Pigmentproduktion) als auch für eine toxische Schädigung der Melanozyten (strukturelle Veränderungen).

Versuche zur Identifikation des für die Depigmentierungen verantwortlichen Agens liegen vor, waren jedoch durch die problematische Extraktion der Pigmente und Fluorochrome aus Schuppen von Pityriasis-Herden unergiebig (Lewis und Hopper 1936). Weitere Untersuchungen konzentrieren sich auf die Hemmung der Tyrosinase, die als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym innerhalb der Melanogenese eine Schlüsselposition einnimmt. Jung et al. zeigten eine Hemmung dieses Enzyms durch ein Ether-Extrakt aus Schuppen der Pityriasis versicolor (1976), verantwortliche Substanzen wurden aber nicht identifiziert. Sie führten die Hemmwirkung später auf Dicarbonsäuren zurück, ohne diese allerdings im Schuppenextrakt nachgewiesen zu haben (Bojanowsky 1979). Dicarbonsäuren wurden 1978 durch Nazarro-Porro aus Kulturen von *Malassezia*-Hefen isoliert. Insbesondere die Azelainsäure (HOOC-(CH₂)₇-COOH), eine der isolierten Dicarbonsäuren, hemmt in vitro die Tyrosinase und wurde zum verantwortlichen Agens der Depigmentierungen erklärt (Nazarro-Porro 1978). In in-vitro-Untersuchungen zeigt Azelainsäure eine kompetitive Inhibition der Umsetzung von DOPA zu Dopachinon (Schallreuter und Wood 1990). Folgeuntersuchungen zeigen jedoch, dass die Azelainsäure in ihrer angenommenen in-vivo-Konzentration die Melanogenese gesunder Melanozyten weder in vitro noch in vivo beeinflussen kann (Breathnach 1984, Robins 1987). Zudem handelt es sich bei der Azelainsäure um eine intrazelluläre Substanz, eine spontane Freisetzung der Azelainsäure aus den Hefezellen wurde nicht beobachtet. Ihre extrazelluläre Wirksamkeit ist somit zumindest fraglich. Azelainsäure kann zudem regelmäßig aus *Malassezia*-Hefen isoliert werden. Durch Azelainsäure hervorgerufene Depigmentierungen müssten dann bei jedem Menschen zu jeder Zeit in den besiedelten Arealen auftreten, da die Hefen zur residenten Hautflora gehören. Diese Beobachtungen sprechen gegen die Azelainsäure als depigmentierendes Agens bei der Pityriasis versicolor alba.

Betrachtet man Melanin als ein Polyindolderivat, so sind Wechselwirkungen von durch *M. furfur* gebildeten Indolverbindungen mit der Melanin-Synthese denkbar. Die Hemmung der Tyrosinase durch 5-OH-Indol ist bereits bekannt (Tomita 1990). In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Hemmung der Tyrosinase durch Metabolite der *Malassezia*-Hefen gezeigt werden. Eine Beteiligung von 5-OH-Indol als bekanntem Tyrosinaseinhibitor

wurde durch Vergleich der DC-Banden mit Standards ausgeschlossen. Die Tyrosinaseinhibition konnte spezifisch einer einzelnen Dünnschichtbande zugeordnet werden und somit auf die Substanzen, aus denen sich die Bande zusammensetzt, eingegrenzt werden (Thoma et al 2000). Die Isolierung und Analyse (LMU-München) einer ersten Einzelsubstanz aus dieser Bande zeigte ein in der Naturstoffchemie bisher unbekanntes Indolderivat [2-(1H-Indol-3-ylmethyl)-1H-Indol-3-Carbaldehyd], welches die Bezeichnung Malassezin erhielt. Malassezin selbst zeigt keine Hemmung der Tyrosinase.

Histologische Folgeversuche bestätigten in der negativen DOPA-Reaktion zuvor in Pigmentextrakt inkubierter humaner Epidermis die Hemmung der Melanogenese durch die aufgereinigte Dünnschichtbande (Thoma et al. 2000 u. 2001, Dahms 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass eine oder mehrere Substanzen dieser Dünnschichtbande einen Tyrosinaseinhibitor darstellen. In einer aktuellen Arbeit konnten Substanzen mit tyrosinaseinhibitorischen Eigenschaften aufgereinigt werden (Daten noch nicht veröffentlicht). Somit könnten Stoffwechselprodukte mit Eigenschaften eines Tyrosinaseinhibitors für die Depigmentierungen der Pityriasis versicolor alba verantwortlich sein.

Erste Untersuchungen an Melanozytenkulturen zeigen Schädigungen der Melanozyten durch Komponenten des Pigments aus *M. furfur*, und zwar insbesondere durch das Malassezin (Podobinska et al. in press). Wenn Malassezin somit auch nicht durch Inhibition der Tyrosinase an den Depigmentierungen der Pva beteiligt ist, so ist dennoch vorstellbar, dass es über zellschädigende Eigenschaften für die elektronenmikroskopisch sichtbare Schädigung der Melanozyten verantwortlich sein könnte.

Diese Hypothese ist durchaus vereinbar mit der Beobachtung, dass bereits im hyperpigmentierten Stadium der Erkrankung die Pigmentzellen in den betroffenen Arealen einen verminderten Melaningehalt (El-Gothamy et al.1975) sowie ultrastrukturelle Störungen aufweisen (Breathnach et al. 1975). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Hemmung der Melanogenese wahrscheinlich bereits in der hyperpigmentierten Phase der Erkrankung beginnt, die einsetzende Hypopigmentierung zu diesem Zeitpunkt aber durch die aktive Pigmentproduktion der Hefen "überdeckt" wird. Mit dieser Annahme vereinbar ist auch die Beobachtung, daß in hyperpigmentierten Läsionen zahlreiche Hefen isoliert werden können (aktive Pigmentproduktion). In hypopigmentierten Läsionen hingegen finden sich keine oder nur sehr spärlich *Malassezia*- Hefen (El-Hefnawi et al. 1972, Karaoui et al. 1980). Einzelne Pigmentbestandteile jedoch sind in den depigmentierten Arealen noch nachweisbar wie die

Fluoreszenz depigmentierter Haut im Wood-Licht deutlich macht. Die Wirkung der gebildeten Pigmente könnte damit die Besiedelung der Hautareale durch die Hefen überdauern und so auch durch die toxische Wirkung die lang andauernde und therapieresistente „Lähmung der Pigmentproduktion“, die selbst durch Behandlung mit phototoxischen Substanzen wie Bergamotte-Öl und UV-Licht nicht zu überwinden ist (Barney 1932), bedingen.

5.2 Malassezin als Agonist des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors

Der erste in der vorliegenden Arbeit aufgereinigte Metabolit aus dem Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* stellt eine in der Natur bisher unbekannt Indolverbindung dar. Die Substanz erhielt den Namen Malassezin. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit [2-(1H-Indol-3-ylmethyl)-1H-Indol-3-Carbaldehyd] mit Agonisten des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors (AHR) wurde die Substanz auf Agonismus am genannten Rezeptor überprüft. Dabei weist Malassezin die Eigenschaft eines AHR-Agonisten auf und induziert Cytochrom P450 ($EC_{50}=1.57 \mu\text{M}$) in Kulturen von Rattenhepatozyten (Wille et al. 2001, Thoma et al. 2002).

Der AHR stellt ein lösliches intrazytoplasmatisches Protein dar, das nach seiner Aktivierung über den ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) in den Zellkern eingeschleust wird. Der Komplex aus AHR und ARNT induziert dann über Aktivierung von Enhancern die vermehrte Transkription bestimmter Gensequenzen (Denison et al 2003). AHR und ARNT können in vielen Geweben nachgewiesen werden. Sie sind sowohl in Basalzellen als auch in sich differenzierenden Keratinozyten vorhanden (Jones 1997).

Dem AHR werden insbesondere Aufgaben bei der Regulation des Fremdstoffwechsels der Zelle zugeschrieben (Schmidt et al. 1996). Am besten untersucht ist seine Aktivierung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine, Dibenzofurane, Biphenyle) sowie halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (Benzo(a)pyrene, Benzoflavone, aromatische Amine) mit der daraus resultierenden Induktion von Cytochrom P450 (CYP1A1). Die genannten polyzyklischen und halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe gelten dabei als hochaffine Agonisten, die alle bestimmten strukturellen Kriterien genügen. So stellen sie planare Moleküle dar, die in ein $7 \times 14 \text{ \AA}$ großes Rechteck passen (Gillner et al. 1985).

Neben seiner Rolle bei xenobiotischen Prozessen ist der AHR auch an der Kontrolle komplexer zellulärer Programme wie Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt (Puga 2002, Jones 1997). Dabei scheinen AHR-Agonisten sowohl zur

Zellproliferation als auch zur Apoptose führen zu können, welcher Weg unter welchen Bedingungen eingeschlagen wird, ist unklar (Puga 2002). Insbesondere Untersuchungen an AHR-defizienten Mäusen legen eine besondere Bedeutung dieses Rezeptors für die Organogenese nahe. AHR-defiziente Mäuse entwickeln neben komplexen organischen Störungen progressive Ulzerationen der Haut (Fernandez-Salguero 1997). AHR-negative Linien von Maus-Hepatoma-Zellen zeigen im Vergleich zu Kontrollen verlängerte Zellverdopplungszeit, AHR-negative Fibroblasten weisen ein verlangsamtes Wachstum auf. Aus Untersuchungen an Mauskeratinozyten wird ein AHR-induzierter vermehrter Übergang von Zellen aus der G₀-Phase in den Zellzyklus durch Aktivierung von immediate-response-Proteinen abgeleitet (Puga 2002). Ein natürlicher (endogener) Agonist, der die basale Induktion von CYP1A1 bewirkt, ist allerdings nicht bekannt (Denison 2002). Ein Zusammenspiel verschiedenster niedrig-affiner endogener AHR-Agonisten, die durch akkumulierte Aktivierung des AHR bestimmte biologische Aktivitäten gewebespezifischer Art hervorrufen, wird vermutet (Denison 2002).

Malassezin erfüllt die Hauptstrukturkriterien eines potenten (hochaffinen) AHR-Agonisten nicht. Fraglich ist an dieser Stelle, ob Malassezin einen neuen Prototyp von AHR-Agonisten mit offenkettiger Struktur darstellt (vgl. Abb. 23 und 27) oder ob Malassezin durch Ringschluss in den bekannten AHR-Agonisten Indolo[3,2-*b*]carbazol konvertiert. Allerdings konnte in den durchgeführten Untersuchungen kein Indolo[3,2-*b*]carbazol im Überstand der Zellkulturen mittels Fluoreszenz/HPLC-Analyse gefunden werden. Damit scheint Malassezin einer erst unlängst bekannt gewordenen Gruppe von AHR-Agonisten anzugehören, die sich durch strukturelle Heterogenität auszeichnet und eher niedrige Affinität zum AHR aufweist (Denison 2003).

Ein endogener Agonist des AHR in Keratinozyten ist nicht bekannt, es wird allerdings vermutet, dass ein bisher noch nicht identifiziertes Tryptophanderivat die basale Expression von CYP1A1 reguliert (Wei et al. 2000). Induktion der Cytochromaktivität (CYP1A1) in Keratinozyten via AHR-Aktivierung durch Photoprodukte von Tryptophan (6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazol und 6,12-Diformylindolo[3,2-*b*]carbazol) ist bereits bekannt (Wei et al. 1999, Rannug et al. 1995).

Fraglich ist die Rolle der AHR-Aktivierung durch den Tryptophanmetaboliten Malassezin. Untersuchungen zur Aktivierung des AHR durch den hochaffinen Rezeptoragonisten TCDD lassen insbesondere eine Störung der terminalen Zelldifferenzierung vermuten (Loertscher 2002, Jones 1997). Eine beschleunigte terminale Differenzierung humaner Keratinozyten durch Exposition gegenüber TCDD wird berichtet (Gaido und Maness 1994). Die Chlorakne,

die nach Kontakt mit TCDD zu finden ist, geht mit Verhornungsstörungen der Epidermis und der Haarfollikel einher. Histologische Untersuchungen zeigen Hyperkeratosen der follikulären sowie interfollikulären Epidermis mit morphologischen Anomalitäten der Talg- und Schweißdrüsen (Caputo 1988, Moses 1985). Malassezin stellt einen weitaus schwächeren Agonisten als das hochaffine TCDD dar. Vorstellbar wäre an dieser Stelle eine Veränderung des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens der Keratinozyten bei der Pityriasis versicolor durch Aktivierung des AHR, die für die pityriasiforme Schuppung der erkrankten Hautareale verantwortlich sein könnte.

Zu untersuchen bleibt weiterhin ein möglicher Effekt des AHR-Agonisten auf die *Malassezia*-Zellen selbst. Der AHR ist bei verschiedenen Tier- und Pflanzengattungen bekannt (Hahn 2002), Untersuchungen zum Vorkommen dieses Rezeptors bei Hefen der Gattung *Malassezia* liegen in der Literatur nicht vor. AHR-Agonisten konnten bereits aus Kulturen von *Candida lipolytica* isoliert werden (Schrenk et al 1997).

Weiterer Forschung bedarf auch die Frage, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen an Melanozyten durch Malassezin eventuell AHR-vermittelte Prozesse darstellen. Untersuchungen über das Vorkommen von AHR in Melanozyten liegen in der Literatur bisher nicht vor.

5.3 Einbindung des Indolstoffwechselweges in die Pathogenese der Pityriasis versicolor

Wenn auch letztlich ein endgültiger Beweis für eine Verbindung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese von *M. furfur* mit der Pathogenese der Erkrankung der Pityriasis versicolor aussteht, ergibt sich hieraus ein neues Konzept, welches einige bislang unerklärbare Phänomene der Erkrankung erklären könnte:

Vermehrtes Schwitzen und Okklusion, die Hauptmanifestationsfaktoren der PV könnten zu einem Verlust hydrophiler Stickstoffquellen mit relativer Anreicherung des hydrophoben Tryptophan im Hautmilieu führen. Tryptophan stellt aufgrund seiner relativ großen Seitenkette bestehend aus einem Indolring an einer Methylengruppe (Stryer 1994) zusammen mit Phenylalanin die am stärksten hydrophobe Aminosäure dar. Tryptophan gehört zu den Aminosäuren, die im Oberflächenfilm der Haut vorhanden sind (Burke 1962), im Gegensatz zum Phenylalanin wurde Tryptophan allerdings nicht im Schweiß als freie Aminosäure identifiziert (Liappis 1980). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß Tryptophan bei starkem Schwitzen auf der Haut akkumuliert während andere Aminosäuren (selbst stärker hydrophobe AS wie Phenylalanin) mit dem Schweiß von der Haut gespült werden. Ursächlich

für die Akkumulation von Tryptophan könnte eine Bindung dieser Aminosäure an Hautoberflächenproteine sein, zumindest im Serum ist die Albuminbindung von Tryptophan bekannt (Mc Menamy 1958). Direkte Untersuchungen des Aminosäuremusters, das bei starkem Schwitzen auf der Haut verbleibt, liegen nicht vor.

Diese Konstellation mit Anreicherung von Tryptophan im Hautmilieu könnte dann die Synthese von Pigmenten und Fluorochromen induzieren, wobei diese als Sekundärmetaboliten über einen längeren Zeitraum auch nach Beendigung des Manifestationsfaktors „Hyperhidrose“ nachwirken und einige der klinischen Erscheinungen wie Hyperpigmentierung und Fluoreszenz, Depigmentierungen und eventuell auch die pityriasisforme Schuppung hervorrufen könnten.

Interessant ist, dass unter den Tryptophanmetaboliten mit dem lipophilen Pityriacitrin ein potenter Breitband-UV-Filter nachgewiesen werden konnte (Mayser et al 2002). Die UV-Filterwirkung dieser Verbindung könnte erklären, warum an Pityriasis versicolor alba Erkrankte in den depigmentierten Arealen keinen Sonnenbrand erleiden, obwohl die Erkrankung gerade in den sonnenreichen, äquatornahen Regionen der Erde besonders häufig vorkommt. Durch die gelbe Eigenfarbe des Pityriacitrins könnte gleichzeitig erklärt werden, warum die Depigmentierungen der Pva nicht wie bei der Vitiligo als reinweiß, sondern als leicht gelblich (Keddie 1974) beschrieben werden. Eine weitere Verbindung (Pityrialacton) mit UV-absorbierender Wirkung und fluoreszierenden Eigenschaften wurde mittlerweile beschrieben. Diese könnte für die orangegelbe bis gelbgrünliche Fluoreszenz der Läsionen verantwortlich sein (Mayser in press).

Ein Vorteil der Pigmentbildung für die Hefezellen selbst könnte damit in der Produktion von Lichtschutzfaktoren liegen, die die Hefezellen vor starker Sonneneinstrahlung schützen (Vorkommen der Erkrankung insbesondere in den Tropen). Mit der Pigmentproduktion findet ein Verbrauch von Tryptophan statt. Tryptophan selbst gilt zwar als natürlicher Lichtschutzfilter auf der menschlichen Haut, ist aber auch für seine starke Photoreaktivität im UVB-Bereich mit Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [singuleter Sauerstoff ($1O_2$) und Superoxidradikale (O_2^-)] bekannt. Diese werden für Membran- und DNA-Schäden verantwortlich gemacht (Babu et al. 1992). Mit dem Verbrauch von Tryptophan für die Pigmentsynthese wird somit eine Quelle schädlicher reaktiver Sauerstoffspezies minimiert. Gleichzeitig entstehen mit der Pigmentbildung potente Breitband-UV-Filter. Untersuchungen an Kulturen von *Malassezia*-Hefen konnten hier verbesserte Wachstumsraten in Anwesenheit des gebildeten Pigments im UVA- und UVB-Bereich zeigen (Mayser und Pape 1998).

Der Pigmentstoffwechsel könnte somit als Schutzmechanismus der *Malassezia*-Hefen in einer Stickstoffmangelsituation aufgefasst werden, der durch Reduktion möglicher schädigender Einflüsse (reaktive Sauerstoffspezies) und Bildung von Schutzfaktoren (UV-Filter) zum Überleben der Mikroorganismen bei starker Sonneneinstrahlung beiträgt.

6 Zusammenfassung

Malassezia-Hefen gelten als Erreger der Pityriasis versicolor (PV), einer Hauterkrankung, die mit makulösen Hyperpigmentierungen eines breiten Farbspektrum einhergeht. Die Hyperpigmentierungen können im Laufe der Erkrankung in depigmentierte Areale mit eingeschränkter Melaninsynthese übergehen (Pityriasis versicolor alba). Charakteristisch für das hyperpigmentierte Stadium der Erkrankung ist die feine Schuppung der Haut sowie die gelblich-grünliche Fluoreszenz der Herde im UV-Licht. Trotz Vorliegen verschiedener Hypothesen ist die Genese der Hyper- und Depigmentierungen sowie der Fluoreszenz der Erkrankungsherde nicht geklärt.

Die Kultur von *Malassezia*-Hefen ist auf einem Minimalmedium aus Agar, einer Lipid- und einer Stickstoffquelle möglich. Mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle bilden Kulturen von *Malassezia furfur* ein braunes Pigment mit gelblich-grüner Fluoreszenz.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Kopplung verschiedener chromatographischer Verfahren ein Weg zur Aufreinigung einzelner Pigmentkomponenten erarbeitet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Pigmentstoffwechsel von *M. furfur* mit der Bildung von Indolen einhergeht. Ein erster Metabolit wurde isoliert. Es handelt sich um das 2,3'-Methylenbisindolyl-3-carbaldehyd, ein bisher in der Naturstoffchemie unbekanntes Indolderivat mit Eigenschaften eines Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor-Agonisten. Eine mögliche Rolle dieser Substanz bei der Entstehung der Schuppung der Herde durch Interaktion mit dem AHR ist zu diskutieren. Bei der DC-Trennung des Pigments findet sich ein breites Farbspektrum von gelben, roten, violetten und braunen Banden, teils mit Fluoreszenz. Die farbliche Vielfalt der gebildeten Pigmente könnte das Farbspektrum der Hautveränderungen bei der PV erklären. Im Pigment enthaltene Fluorochrome könnten die Ursache für die Fluoreszenz in den Läsionen der PV darstellen. Durch Assay-geleitete Fraktionierung des Pigments von *M. furfur* wurde eine DC-Bande detektiert, die in in-vitro-Untersuchungen die Tyrosinase hemmt. Die Inhibition der Melanogenese durch Bestandteile des Pigments könnte eine Erklärung für die Depigmentierungen bei PVa bieten.

Wenn auch ein endgültiger Beweis für eine Verbindung der Trp-abhängigen Pigmentsynthese von *M. furfur* mit der Pathogenese der Erkrankung aussteht, ergibt sich hier ein neues Konzept, welches einige bisher unerklärbare Phänomene wie Hyper-, Depigmentierungen und Fluoreszenz der Erkrankung erklären kann.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, Z., Berderly, A., Lefler, E.: *Pityrosporum orbiculare* in Children. *Mykosen* 30: 581-583, 1987
- Ackerman, A. B.: *Histologic diagnosis of inflammatory skin disease*. 2nd edn., Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 757-8, 1997
- Adamson, H.G.: Pityriasis versicolor with subsequent leukodermic patches. *Brit. J. Derm.* 61: 322-322, 1949
- Alijabre, S.H.M., Alzayir, A.A.A., Abdulghani, A., Osman, O.O.: Pigmentary changes of tinea versicolor in dark-skinned patients. *Int. J. Dermatol.* 40:273-275, 2001
- Allen, H.B., Charles, C.R., Johnson, B.L.: Hyperpigmented tinea versicolor. *Arch. Dermatol.* 112: 1110-1112, 1972
- Artom, M.: Contributo allo studio della pityriasis versicolor acromizzante. *Gior. ital. Derm. e Sif.*:71: 1945, 1930
- Ashbee, H.R., Evans, G.V.: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 21-57, 2002
- Ashbee, H.R., Ingham, E., Holland, K.T., Cunliffe, W.J.: The carriage of *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor. *Br. J. Dermatol.* 129: 533-540, 1993
- Ashbee, H.R., Ingham, E., Holland, K.T., Cunliffe, W.J.: Cell-mediated immune responses to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. *Exp. Derm.* 3: 106-112, 1994
- Ashbee, H.R., Fruin, A., Holland, K.T., Cunliffe, W.J., Ingham, E.: Humoral immunity to *Malassezia furfur* serovars A,B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. *Exp. Derm.* 3: 227-233, 1994
- Babu, V., Joshi, P.C.: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. *Indian J Biochem Biophys* 29(3): 296-8, 1992
- Baillon, E.H.: *Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau*. Paris, Faculté de Médecine de Paris: 234, 1889
- Baker, B.S., Powles, A., Garioch, J.J., Hardman, C., Fry, L.: Differential T-cell reactivity to the round and oval forms of *Pityrosporum* in the skin of patients with psoriasis. *Br. J. Derm.* 136: 319-325, 1997
- Balus, L., Grigoriu, D.: *Pityriasis versicolor*. Alsbach, Cilag GmbH, 1982
- Barfatani, M., Munn, R.J., Schjeide, O. A.: An ultrastructure study of *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 43: 231-233, 1964

- Barney, R.E.: Pseudo-Achromia Postparasitaria- Tinea versicolor. Arch. Dermat.&Syph. 25: 1167, 1932
- Belew, P.W., Rosenberg, E.W., Jennings, B.R.: Activation of the alternative pathway of complement by *Malassezia ovalis*. Mycopathologia 70: 187-191, 1980
- Bergbrant, I.M., Faergemann, J.: Variations of *Pityrosporum orbiculare* in Middle-aged and Elderly Individuals. Acta Derm. Venereol. 68: 537-540, 1988
- Besnier, E., Balzer, F.: Les dermatomycoses. Gaz. Hebdom. Med. Chir. 19: 326-328, 341-344, 1882
- Blumenthal, H.: Tinea versicolor of the penis. Arch. Derm. 103: 461-462, 1971
- Bojanowsky, A., Bohner, E., Jung, E.G.: Pityrosporum orbiculare: Erreger verschiedener klinischer Bilder und Modell einer Depigmentierungsart. Act. Dermatol. 5: 19-25, 1979
- Borelli, D., Jacobs, P.H., Nall, L.: Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. J. Am. Acad. Dermatol. 25:300-305, 1991
- Bouassida, S, Boudaya, S, Ghorbel, R et al. Pityriasis versicolor in children: a retrospective study of 164 cases. Ann. Dermatol. Venereol. 1998;125; 581-584
- Breathnach, A.S., Gross, M., Martin, B.: Freeze-fracture replications of cultured Pityrosporum orbiculare. Sabouraudia 14: 105-113, 1976
- Breathnach, A.S., Nazzaro-Porro, M, Martin, B.: Ultrastructure of skin in pityriasis versicolor. Giorn. Ital. Derm. 110: 457-469, 1975
- Breathnach, A.S., Nazzaro-Porro, M., Passi, S.: Azelaic acid. Br. J. Derm. 111: 115-120, 1984
- Breuer, Hans: dtv- Atlas zur Chemie, 4. Auflage: 455, 1989
- Brotherton, J.: Lack of swelling and shrinking of *Pityrosporum ovale* in media of different osmotic pressures and its relationship with survival in the relatively dry condition of the scalp. J. Gen. Microbiol. 48: 305-308, 1967 (a)
- Brotherton, J.: The sulphur metabolism of *Pityrosporum ovale* and its inhibition by selenium compounds. J. Gen. Microbiol. 49: 393-400, 1967 (b)
- Bruke, M.D., Mayer, R.T.: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metab Dispos 2: 583-588, 1974
- Burke, R.C.: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings. J. Invest. Derm. 36: 389-401, 1961
- Burke, R.C.: Investigations in tinea versicolor: Lipid and aminoacid studies. Yale J. Biol. Med. 35: 206-221, 1962/63

- Burkhart, C.G., Dvorak, N., Stockhard, H.: An unusual case of tinea versicolor in an immunosuppressed patient. *Cutis* 27: 56-58, 1981
- Butenandt, A., Biekert, E., Linzen, B.: Über Ommochrome VII. Mitteilung. Modellversuche zur Bildung des Xanthommatins in vivo. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 305: 284-289, 1956
- Calman, K.C., Muir, A.V., Milne, J.A., Young, H.: Survey of the distribution of steroid dehydrogenases in sebaceous glands of human skin. *Br. J. Derm.* 82: 567, 1970
- Caputo, R., Monti, M., Ermacora, E., Carminati, G., Gelmetti, C., Gianotti, R., Gianni, E., Puccinelli, V.: Cutaneous manifestations of tetrachlorodibenzo-p-dioxin in children and adolescents. Follow-up 10 years after the Seveso, Italy, accident. *J. Am. Acad. Dermatol.* 19: 812-819, 1988
- Castellani, A.: Fungi and fungous diseases: lecture I, Genus *Pityrosporum* (Sabouraud, 1895). *Arch. Derm. Syphilol.* 16: 383-425, 1927
- Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., Beidler, J.G.: Hypopigmentation in tinea versicolor: A histochemical and electronmicroscopic study. *Int. J. Derm.* 12: 48-58, 1973
- Chatterji, A.: Observation on dopa reaction in the lesions of pityriasis versicolor. *Indian J. Derm.* 17: 4;94-95, 1972
- Chetty, G.N., Kamalam, A., Thambiah, A.S.: Pityriasis versicolor - a study of 200 cases in a tropical skin clinic. *Mykosen* 22: 234-246, 1979
- Cohen, M.M.: A simple procedure for staining tinea versicolor (*M. furfur*) with fountain pen ink. *J. Invest. Derm.* 22: 9-10, 1954
- Conklin, R.J.: Common cutaneous disorders in athletes. *Sports Med* 9: 100-119, 1990
- Cotterill, J.A., Cunliffe, W.J., Williamson, B., Bulusu, L.: Age and sex variation in skin surface lipid composition and sebum excretion rate. *Br. J. Derm.* 87: 333-340, 1972
- Crespo Erchiga, V., Ojeda Martos, A., Vera Casano, V., et al: Mycology of Pityriasis versicolor. *J. Mycol. Med.* 9: 143-148, 1999
- Crespo Erchiga, V., Ojeda Martos, A., Vera Casano, V., et al: *Malassezia globosa* as the causative agent of Pityriasis versicolor. *Br. J. Dermatol.* 143: 799-803, 2000
- Dahms K, Krämer HJ, Thoma W, Mayser P. Tyrosinaseinhibition durch Tryptophanmetabolite von *Malassezia furfur* in humaner Epidermis. *Mycoses.* 2002;45; 230
- Daneshvar, S.A., Hashimoto, K.: An unusual presentation of tinea versicolor in an immunosuppressed patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17: 304-305, 1987

- Denison, M. S., Scott, R. N.: Activation of the aryl-hydrocarbon-receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 309-34, 2003
- Denison, M. S., Pnadini, A., Scott, R. A., Baldwin, E. P., Bonati, L.: Lignad binding and activation of th Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141: 3-24, 2002
- Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Derm.* 69: 224-248, 1977
- Dotz, W.I., Henrikson, D.M., Yu, G.S.M.: Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmentated skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12:37-44, 1985
- Echavarren, A. M.: Lewis acid-catalyzed reactions of alpha,beta.-unsaturated N,N-dimethylhydrazones with 1,4-benzoquinone. Formation of indoles by a novel oxidative rearrangement *J. Org. Chem.* 55: 4255-4260; 1990
- Eichstedt, C.F.: Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde* 853: 270-271, 1846
- El-Gothamy, Z., Abdel-Fattah, A., A.F.: Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies. *Int. J. Derm.* 14: 510-515, 1975
- El-Gothamy, Z.: Amino acid metabolism of *Malassezia furfur*. *Annls Parasitol. Hum. Comp.* 56: 359-361, 1981
- El-Hefnawi, H., El-Gothamy, Z., Refai, M.: Studies on pityriasis versicolor in Egypt. II. Clinical and therapeutic. *Mykosen* 14: 483-490, 1971
- El-Hefnawi, H., El-Gothamy Z., Refai, M.: Studies on Pityriaisis versicolor in Egypt. III. Laboratory Diagnosis and Experimental Infection. *Mykosen* 15: 165-170, 1972
- Elmets, C.A.: Management of common superficial fungal infections in patients with AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31: 60-63, 1994
- Faergemann, J.: Tinea versicolor and *Pityrosporum orbiculare*: Mycological investigations, experimental infections, and epidemiological surveys. *Acta Dermatovener. Suppl.* 86, 1-23, 1979
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. *Acta Derm. Venereol.* 60: 531-33, 1980
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Experimental infections in rabbits and humans with *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale*. *J. Invest. Derm.* 77: 314-318, 1981
- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Growth and Filament Production of *Pityrosporum orbiculare* and *Pityrosporum ovale* on Human Stratum Corneum in vitro. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* 63: 388-392, 1983

- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Quantitative Variations in Distribution of *Pityrosporum orbiculare* on Clinically Normal Skin. *Acta Derm. Venereol.* (Stockh) 63: 346-348, 1983
- Faergemann, J.: A new Model for Growth and Filament Produktion of *Pityrosporum ovale* (*orbiculare*) on Human Stratum Corneum in vitro. *J. Invest. Derm.* 92: 117-119, 1989
- Frey, H.P., Zieloff, K.: Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1993
- Faergemann, J.: Tinea versicolor (tinea pityriasis versicolor). In: Demis D., ed. *Clinical Dermatology*. Philadelphia: Unit 17-2, Lippincott-Raven, 1995 I-II
- Fernandez-Salguero, P. M., Ward, J. M., Sundberg, J. P., Gonzalex, F., J.: Lesions of aryl hydrogen receptor-deficient mice. *Vet. Path.* 34: 605-641, 1997
- Fritsch, P.: *Dermatologie und Venerologie*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1998
- Gaido, K.W., Maness, S.C.: Regulation of Gene Expression and Acceleration of Differentiation in Human Keratinocytes by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127:199-208, 1994
- Galadari, I.: Pityriasis versicolor- is it infectious or not? *Dermatol.* 5: 33-35, 1998
- Galadari, I., El Komy, M.: Tinea versicolor: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. *Int. J.Dermatol.* 31 (4): 253-6, 1992
- Gill, M., Steglich, W.: *Pigments of Fungi (Macromycetes)*. Progress in the Chemistry of natural products Bd.51; Wien, New-York: Springer Verlag, 1987
- Gillner, M., Bergmann, J., Cambillau, C, Fernström, B., Gustafsson, J.-Ä.: Interactions of indoles with teh specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin in rat liver.: *Mol. Pharm.* 28: 357-63, 1985
- Gloor, M., Wiegand, I., Friedrich, H.C.: Über Menge und Zusammensetzung der Hautoberflächenlipide beim sogenannten seborrhoischen Ekzem. *Derm. Mschr.* 158: 759-64, 1972
- Gloor, M, Kümpel, D., Friedrich, H.C.: Predisposing factors on the suRface of the skin in persons with pityriasis versicolor. *Arch. Derm. Res.* 254: 281-286, 1975
- Götz, H.: Pityriasis versicolor. In: *Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten*. Handbuch für Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: A. Marchionini, H. Götz). Erg. Bd. IV/3, Heidelberg: Springer Verlag, 352-360, 1962
- Gudden, B. von.: Beitrag zur Lehre von den durch Parasiten bedingten Hautkrankheiten. II. Pityriasis versicolor. *Arch. Physiol. Heilk. Stuttg.*, 12: 496-505

- Guého, E., Kurtzman, C.P., Peterson, S.W.: Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. *System. Appl. Microbiol.* 12: 230-236, 1989
- Guého, E., Meyer, S.A.: A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie van Leeuwenhoek* 55: 245-251, 1989
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 337-355, 1996
- Guillot, J., Guého, E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 297-314, 1995
- Gupta, A.K., Kohli, Y., Faergemann, J. et al: Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med. Mycol.* 39: 199-206, 2001
- Gupta, A.K., Bluhm, R., Summerbell R.: Pityriasis versicolor. *JEADV* 16: 19-33, 2002
- Hafez, M., el-Shamy, S.: Genetic susceptibility in pityriasis versicolor. *Dermatologica* 171: 86-88, 1985
- Hagler, A.N., Ahearn, D.G.: Rapid diazonium blue B test to detect basidiomycetous yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 204-208, 1981
- Hahn, M.E.: Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141: 131-160, 2002
- Hay, R.J., Roberts, S.O.B., Mackenzie, D.W.R.: Pityriasis versicolor. In: *Textbook of Dermatology* (Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, eds) 5th edn., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: pp. 1176-8, 1992
- Hildick-Smith, G., Blank, H., Sarkany, I.: *Fungus Diseases and Their Treatment*. London, J.A. Churchill Ltd.: p. 5, 1964
- Imamura, S., Tanaka, M., Furukawa, F., Danno, K.: Immunological aspects on pityriasis versicolor. *Jap. J. Med. Mycol.* 21: 157-161, 1980
- Ingham, E., Cunningham, A.C.: *Malassezia furfur*. *J. Vet. Med. Mycol.* 31: 265-288, 1993
- Ishii, H., Murakami, K., Sakurada, E, Hosoya, K., Murakami, Y. *J Chem. Soc. Perkin. Trans. I*: 2377-2385; 1988
- Jeliffe, D.B., Jacobson, F.W.: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. *J. Trop. Med. Hyg.* 57: 290-293, 1954
- Jones, C.L., Reiners, J.J.: Differentiation status of cultured murine keratinocytes modulates induction of genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch Biochem Biophys* 347(2):163-73, 1997

- Jung, E.G., Bohnert, E.: Mechanism of depigmentation on pityriasis versicolor alba (Pva). *Derm. Res.* 256: 333-334, 1976
- Karaoui, R., Bou-Resli, M., Al-Zaid, N.S., Mousa, A., Selim, M.: Clinical and epidemiological studies of tinea versicolor in Kuwait. *Mycosen* 23: 351-367, 1980
- Keddie, F.M.: Tinea versicolor, 1846-1900. A historical survey based on selections from the writings of the nineteenth century. In: *The diagnosis and treatment of fungal Infections* (Hrsg.: H.M. Robinson jr.) Springfield: C.C. Thomas, pp.169-184, 1974
- Keddie, F.M., Orr, A., Liebes, D.: Direct staining on vinyl plastic tape demonstrating the cutaneous flora of the epidermis by the strip method. *Sabouraudia* 1: 108, 1961
- Kistiakovsky, E.V.: Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. *Arch. Derm. Syph.* 15: 685-689, 1927
- Konrad, K., Wolff, K.: Hyperpigmentation, Melanosome Size, and Distribution Patterns of Melanosomes. *Arch. Dermatol.* 107: 853-860, 1973
- Korting, H.C., Loferer, S., Hamm, N.: The detergent scrub method for quantitative determination of *Malassezia furfur* on chest and back skin: comparative evaluation of three different media. *Mycoses* 34:267-271, 1991
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E.: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp. 170-182, 1992
- Labows, J.N., McGinley, K.J., Leyden, J.J.: Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. *Appl. Environm. Microbiol.* 38: 412-415, 1975
- Leeming, J.P., Notman, F.H.: Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 2017-2019, 1987
- Lewis, G.M.: Tinea versicolor (white). *Arch. Derm. Syph.* 31: 911-913, 1935
- Lewis, G.M., Hopper, M.E.: Pseudoachromia of tinea versicolor. *Arch. Derm. Syph.* 34: 850-861, 1936
- Liappis, N., Kochbeck, E., Eckhardt, G., Hahne, H., Kessler, K., Bantzer, P.: Aminosäurenverluste im menschlichen Schweiß. *Arch. Dermatol. Res.* 269: 311-323, 1980
- Linzen, B.: The Tryptophane - Ommochrome pathway in insects in: *Advances in insect physiology*. ed.: Treherne, J.E., Berridge, M.J., Wigglesworth, V.B.; Vol. 10, London and New York: Academic press, 1974.
- Lockshin, N.A.: Tinea versicolor masquerading as vitiligo. *Cutis* 12: 245-247, 1973
- Loertscher, J. A., Lin, T., Peterson, R. E., Allen-Hoffmann, B. L.: In utero exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes accelerated terminal differentiation in fetal mouse skin. *Reprod. Develop. Toxicol.*68: 465-72, 2002

- Lutz, A.: Korrespondenz. Honolulu, September 1891. Mh. Prakt. Dermatol. 14: 152-155, 1892
- Marples, M.J.: The incidence of certain skin diseases in Western Samoa: a preliminary survey. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 44: 319-322, 1950
- Mason, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism. Adv. Enzymol. 19:79-86, 1957
- Mayser, P., Pape, B.: Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. Antonie van Leeuwenhoek 73: 315-319, 1998
- Mayser, P., Imkampe, A., Winkeler, M., Papavassilis, C.: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. Arch. Dermatol. Res. 290: 277-282, 1998
- Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.-J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityriacitrin- un ultraviolet-absorbierend von der Hefe *Malassezia furfur*. Arch. Dermatol. Res. 294: 131-134, 2002
- Mayser P, Stapelkamp H, Krämer HJ, Irlinger B, Steglich W: Pityrialacton – a new fluorescing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. Antonie van Leeuwenhoek (in press)
- Mayser, P., Wille, G., Imkampe, A., Thoma, W., Arnold, N., Monsees, T.: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. Mycoses 41: 265-271, 1998
- McAleer, R.: Pityriasis versicolor. Aust. J. Derm. 21: 42-46, 1980
- McDaniel, W.E.: Tinea versicolor. Arch. Dermatol. 113: 519-520, 1977
- Mc Ginley, K.J., Lantis, L.R., Marples, R.R.: Microbiology of tinea versicolor. Arch. Dermatol. 102:168-171, 1970
- Millich, F., Becker, E. I.: Synthesis and Infrared Spectra of Some Indole Compounds. J. Org. Chem. 23: 1096-1102; 1958
- Mittag, H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. Mycoses 38: 13-21, 1995
- Mittag, H.: Zur Morphologie der Malassezia-assozierten Erkrankungen. Mycoses 39: 13-19, 1996
- Moses, M., Prioleau, P. G.: Cutaneous histologic findings in chemical workers with and without chloracne with past exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. J. Am. Acad. Dermatol. 12: 497-506, 1985
- Moynahan, E.J.: Pityriasis versicolor alba (speckled torso syndrome) and mediterranean holidays. Lancet 2: 471-472, 1976

- Nakabayashi, A., Sei, Y., Guillot, J.: Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med. Mycol.* 38: 337-341, 2000
- Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Nazzaro, P., Morpurgo, G.: Growth requirement and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 66: 178-82, 1976
- Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Mercantini, R.: Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J. Invest. Derm.* 69: 531-534, 1977
- Nazzaro-Porro, M., Passi, S.: Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of *Pityrosporum*. *J. Invest. Derm.* 71: 205-208, 1978
- Nenoff, P., Reinl, P., Haustein, U.-F.: Der Hefepilz *Malassezia*. *Der Hautarzt.* 52: 73-86, 2001
- Nia, A.K., Smith, E.L.: Pityriasis versicolor of the glans penis. *Brit. J. Vener. Dis.* 55: 230, 1979
- Noble, W.C., *Microbiology of Human Skin*. London: Lloyd-Duke. pp. 3-65; 263-268, 1981
- Oguchi, M.: Electron microscopic studies of melanocytes in the affected skin of tinea versicolor. *Acta Dermatol. (Kyoto)* 77: 187-92, 1982
- Pardo-Castello, V.: *Achromia parasitaria*. *Arch. Derm. Syph.* 25: 785-789, 1932
- Podobinska, M., Krämer, H.-J., Bartsch, A., Steglich, W., Mayser, P.: A cytotoxic metabolite from *Malassezia furfur*: isolation and chemical identification as malassezin. *Arch Derma Res* (in press)
- Prota, G.: Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* 8: 525-556, 1998
- Puga, A., Xia, Y., Elferink, C.: Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem. Biol. Interact.* 141: 117-130, 2002
- Rannug, U.; Rannug, A.; Sjöberg, U; Li, H; Westerholm, R; Bergman, J.: Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 2(12): 841-5, 1995
- Razack, E.M.A., Tambiah, A.S.: A clinical study of pityriasis versicolor in Madras. *Sabouraudia* 15: 305-311, 1977
- Roberts, S.O.B.: *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br. J. Derm.* 81: 264-269, 1969
- Roberts, S.O.B.: Pityriasis versicolor: A clinical and mycological investigation. *Br. J. Derm.* 81: 315-326, 1969
- Roberts, S.O.B.: The mycology of the clinically normal scalp. *Brit. J. Derm.* 81: 626-628, 1969

- Robins, E.J., Breathnach, A.S., Bennet, D., Picardo, M., Passi, S., Nazzaro-Porro, M.: Ultrastructural observations on the effect of azelaic acid on normal human melanocytes and human melanoma cell line in tissue culture. *Br. J. Derm.* 113: 687-697, 1987
- Rook, A. Wilkinson, D.S., Ebling, F.I.G. In *Textbook of Dermatology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford&Edinburgh: 1146, 1968
- Ruete, A.: Pityriasis versicolor. In: *Jadassohns Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten* (Hrsg.: J. Jadassohn). Bd. XI., Berlin: Springer Verlag, pp. 696-710, 1928
- Ruete, A.E.: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. *Derm. Wochenschr.* 96: 333-6, 1933
- Saadatzadeh, MR, Ashbee, HR, Holland, KT, Ingham, E. Production of the myzelial phase of *Malassezia* in vitro. *Med Mycol.* 39: 487-493, 2001
- Schallreuter, K.U., Wood, J.W.: A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 282: 168-171, 1990
- Schmidt, J.V., Bradfield, C.A.: Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89, 1996
- Schaal, K. P., Graevenitz, A.: Pseudomonaden und andere anspruchlise, nicht-fermentierende, gramnegative Bakterien. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie* (Hrsg. H. Brandis), 7. Auflage, Gustav-Fischer. Stuttgart, Jena, NewYork, pp. 466-467, 1994
- Schrenk, D., Reibniger, D., Till, M., Vetter, S., Fiedler, H.P.: Trypanthrins: a novel class of agonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol* 54: 165-71, 1997
- Shifrine, M., Marr, A.G.: The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. *J. Gen. Microbiol.* 32:263-270, 1963
- Simmons, R.B., Ahearn, D.G.: Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. *Mycologia* 79: 38-43, 1987
- Simmons, R.B., Gueho, E.: A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res.* 94: 1146-1149, 1990
- Sloof, W.Ch.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: *The Yeasts - A Taxonomic Study* (Hrsg. J. Lodder) 2nd edition, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970
- Stryer, L.: *Biochemie* 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford: pp. 18/19, 1994
- Swift, J.A., Dunbar, S.F.: The ultrastructure of *Pityrisporum ovale* and *Pityrosporum canis*. *Nature* 206: 1174-1175, 1965

- Stefanovic, M., Medicijan, M.: Die Verbreitung der Pityriasis versicolor bei der Sportjugend. *Castellania* 4: 29-31, 1976
- Sunenshine, P.J., Schwartz, R.A., Janniger C.K.: Tinea versicolor. *Int. J. Dermatol.* 37: 648-655, 1998
- Tanaka, M., Imamura, S.: Immunological studies on *Pityrosporum* genus and *Malassezia furfur*. *J. Invest. Derm.* 73: 321-324, 1979
- Thoma, W., Dahms, K., Krämer, H.-J., Steglich, W., Irlinger, B., Mayser, P.: Tyrosinaseinhibition durch KO27- einen Stoffwechselmetaboliten von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 44: 238-239, 2001
- Thoma, W., Krämer, H.-J., Irlinger, B., Baumgart, A., Schmitz, H.-J., Mayser, P.: Isolation neuer Arylhydrocarbonrezeptoragonisten aus Tryptophanmetaboliten von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 45: 249, 2002
- Thoma, W., Trinkaus, M., Mayser, P.: Identifikation eines Tyrosinase-Inhibitors im Stoffwechsel von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 43:264, 2000
- Thoma, W., Trinkaus, M., Mayser, P.: Tyrosinaseinhibition durch Stoffwechselprodukte von *M. furfur*. *H+G* 75: 473, 2000
- Thompson, E., Colvin, J.R.: Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani & Chalmers. *Can. J. Microbiol.* 16: 263-265, 1970.
- Throne, B.: Achromia postparasitaria. *Arch. Dermat. Syph.* 18: 148, 1928
- Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M.: A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using streptomyces bikiniensis. *J. Antibiotics* 43: 1601-4, 1990
- Tosti, A., Villardita, S., Fazzini, M.L.: The parasitic colonization of the horny layer in tinea versicolor. *J. Invest. Derm.* 59: 223-237, 1972
- Van Abbe, N.J.: The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosm. Chemists* 15: 609-630, 1964
- Wei, Y.D., Rannug, U.; Rannug, A.: UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact*;118(2): 127-40, 1999
- Wei, Y.D., Bergander, L., Rannug, U.; Rannug, A.: Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Arch Biochem Biophys*:383(1):99-107, 2000
- Wertheim, L: Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. *Derm. Zeitschrift* 38: 343-354, 1928
- Wilde, P.F., Stewart, P.S.: A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. *Biochem. J.* 108: 225-231, 1968

Willan, R.: Description and treatment of the cutaneous diseases. Order II. Scaly diseases of the skin. London: pp.192-196, 1801

Wille, G.: Synthese und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Schleimpilzen und lipophilen Hefen. Dissertation.de, Verlag im Internet, Berlin, 2000

Wille, G., Mayser, P. Thoma, W., Monsees, T., Baumgart, A., Schmitz, H.J., Schrenk, D., Polborn, K., Steglich, W.: Malassezin – A Novel Agonist of the Arylhydrocarbon Receptor from the Yeast *Malassezia furfur*. J. Bioorg. Med. Chem. 9(4): 955-60, 2001

Wise, F., Sulzberger, M.B.: The year book of Dermatology and Syphilology, Chicago, Year Book Publishers, Inc. 29, 1932

Wu, Y.C., Chen, K.T.: Humoral immunity in patients with tinea versicolor. J. Dermatol. 12: 161-166, 1985

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

8 Tabellenanhang

Tabelle 8.1: pH-Abhängigkeit der Substanzen und Untersuchung auf Indole (Ehrlichs's Reagenz):

Rf-Werte	Platte unbehandelt	Platte mit rauchender HCl	Platte mit Ehrlichs Reagenz	Platte im UV-Licht
1. Fraktion :				
0	Orange/Braun	Orange/Braun	uninteressant	uninteressant
	Ausläufer bis 0,5			
2. Fraktion :				
	s. erste Fraktion		Uninteressant	
0,13				Hellblau
0,18				Hellblau
0,23				Gelb
0,34				Rosa
0,39				Rosa
0,43				Gelb
3. Fraktion :				
0,094				Hellblau
0,13				Rosa
0,17				Gelb (deutl.)
0,18	Gelb (deutl.)	Bräunlich	Rosa	
0,22	Gelb	Bräunlich	Gelb/Bräunlich	Gelb (deutl.)
0,27	Rosa	Rosa	Lila/Rosa	Rosa
0,3			Rosa (undeutl.)	
0,33			Rosa	
0,34			Gelb	Rosa/Gelb (undeutl.)
0,38			Lila (schwach)	
0,39			Gelb	
4. Fraktion :				
0,031				Hellblau
0,062			Gelb/Orange	
0,063			Hellblau/Lila	Rosa
0,075				Rosa
0,094				Blau
0,13			Gelb/Orange	Rosa
0,16			Rosa	Rosa
0,17		Rosa (deutl.!!!!)		Rosa
0,18	Gelb (deutl.)		Rosa	
0,2			Gelb/bräunlich	
0,22	Gelb (undeutl.)	Gelb/Bräunlich	Rosa	Gelb (deutlich!!!)
0,26			Gelb/Bräunlich	Fluoreszenz fehlt total
0,27	Rosa	Rosa	Lila	
0,28			Rosa	Rosa
0,29				Fluoreszenz fehlt total
0,3	Lila (undeutl.)	Lila		
0,31			Grün (hell) mit lila Rand	Rosa
0,32			Rosa	

Rf-Werte	Platte unbehandelt	Platte mit rauchender HCl	Platte mit Ehrlichs Reagenz	Platte im UV-Licht
4. Fraktion (Forts.) :				
0,33	Rosa (undeutl.)	Lila (deutl.)		Blau
0,34	Blau	Blau (deutl.)	Gelb	
0,35	Gelb	Lila mit deutl. rosa Randzone	Lila	Rosa
0,36			Gelb	Fluoreszenz fehlt total
0,37			Lila	
0,38	Rosa	Rosa		
0,39	Gelb	Rosa/Gelb	Hellblau	Fluoreszenz fehlt total
0,4			Braun/Lila mit rosa Randzone	
0,41				Grün/Gelb
0,42			Lila/Rosa (schwach), evtl.darüber Schatten von Rosa/Lila/Gelb	
5. Fraktion :				
0,031	Rosa (undeutl.)	Rosa (undeutl.)		
0,094				Hellblau
0,13	Rosa	Rosa (undeutl.)	Rosa	
0,16	Gelb		Rosa	Rosa
0,17		Rosa		
0,18				Hellgelb/Blau
0,21				Rosa
0,22		Bräunl./Gelb -!-!-	Rosa	
0,24		Rosa		Gelb (warmer Ton)
0,25		Gelb (undeutl.)	Gelb	
0,26	Orange/Braun	Rosa (deutl.)	Lila/Bräunlich	
0,27				Rosa
0,29			Hellgrün (lila Rand)	Fluoreszenz fehlt total
0,3	Rosa	Lila (deutl.)		
0,31		Rosa		
0,33			Gelb	
0,34	Gelb	Lila	Lila	
0,35	Lila (schwach)	Gelb (schwach)		
0,36	Rosa (schwach)	Rosa	Gelb	Fluoreszenz fehlt total, oder eigentlich Lila?
0,37	Rosa/Lila	Gelb (mit lila Rand)	Lila	
0,38	Blau	Rosa		
0,39				Olivgrün, keine Fluoreszenz
0,4	Gelb	Rosa	Braungrün (rosa Rand)	
0,41				Fluoreszenz in Mitte fehlend (oder lila) mit gelb fluoreszierendem Rand
0,42	Rosa/Braun	bräunlich	Grün	
0,44			Pink (deutl. und klar)	
0,45	Gelb	bräunlich		
0,48	Rosa Ausläufer	bräunlich	Gelb	
0,49			Rosa	
6. Fraktion :				
0,056			Rosa	
0,063			Hellblau	Rosa
0,094				Hellblau
0,11			Rosa	
0,13	Rosa	Rosa		

Rf-Werte	Platte unbehandelt	Platte mit rauchender HCl	Platte mit Ehrlichs Reagenz	Platte Im UV-Licht
0,2				Gelb
0,22			Rosa	Rosa
0,23		Rosa (deutl.)		
0,24				Gelb (schwach)
0,25			Rosa	
0,27				Rosa
0,28			Gelb	
0,29	Rosa	Lila (deutl.)	Rosa	
0,31		Rosa (deutl.)		
0,33		Lila (deutl.)		
0,35			Lila	Lila (ohne Fluoreszenz)
0,36	Rosa	Gelb	Rosa	
0,38	Lila/Blau	Rosa (schwach)	Lila	Lila (ohne Fluoreszenz)
0,41	Gelb	Rosa	Gelb (deutl.)	Rosa
0,42		Rosa (schwach)		Lila (ohne Fluoreszenz)
0,44			Pink	Rosa
0,45	Rosa			
0,46			Rosa/bräunlich	
0,47				Hellblau
7. Fraktion :				
0,063	Rosa	Rosa	Hellblau	
0,11			Rosa	
0,13		Rosa		
0,16		Rosa		
0,17		Rosa		
0,2			Gelb	Bläulich-Gelb
0,21	Gelb	Bräunlich		
0,22			Lila	Gelb (warmer Ton)
0,23			Rosa	
0,24	Rosa	Lila		
0,29		Lila	Rosa	
0,31	Rosa	Rosa (deutl.)		
0,33			bräunlich	Lila
0,34	Gelb	Lila/Blau		
0,35			Lila	
0,36	Olivegrün/Lila		Rosa	
0,37	Rosa	Gelb		
0,38	Gelb/Grün/Lila		Lila	Lila
0,4	Gelb	Rosa		
0,41			Rosa	
0,42		Rosa/bräunlich	Gelb/bräunlich	Lila/Blau
0,44	Rosa		Pink	
0,45				Rosa
0,46	Rosa			
0,47			Rosa/bräunlich	Gelb
8. Fraktion :				
0,063	Rosa	Rosa	Hellblau	
0,13		Rosa		
0,15		Gelb		
0,17			Rosa	
0,2			Gelb	
0,22			Lila	Gelb (warmer Ton)
0,23	Orange	Bläulich	Rosa	
0,25			Lila	
0,26				Gelb (schwach)
0,27		Lila (schwach)		

<i>Rf-Werte</i>	<i>Platte unbehandelt</i>	<i>Platte mit rauchender HCl</i>	<i>Platte mit Ehrlichs Reagenz</i>	<i>Platte im UV-Licht</i>
0,28		Lila		
0,29				Rosa
0,31		Lila/Blau		
0,32			Bräunlich	
0,33	Gelb			
0,35	Olivgrün		Lila	Lila
0,36			Rosa	
0,38	Olivgrün/Gelb		Lila	Lila
0,4	Orange/Lila		Rosa	
0,48			Rosa Schatten	
0,49			Gelber Schatten	
9. Fraktion :				
0,13		Rosa		
0,15		Gelb		
0,16		Rosa		
0,19			Rosa	
0,2			Gelb	
0,22			Lila	Rosa
0,23			Rosa	bläulich
0,25			Lila	
0,27				Lila (schwach)
0,28				Rosa
0,29	Gelb	Lila		
0,31				Lila (ohne Fluoreszenz)
0,32	Orange	Lila/Blau	Orange	
0,34				Lila (ohne Fluoreszenz)
0,36	Olivgrün/Lila		Lila	
0,38	Gelb		Lila	Lila (ohne Fluoreszenz)
0,39	Blau			
0,41	Orange		Rosa	
0,47	Rosa		Rosa Schatten?	Gelb
0,49			Gelber Schatten	
0,51				Hellblau
0,55				Rosa
10. Fraktion :				
0,13		Rosa		
0,15		Gelb		
0,16		Rosa		
0,21	Gelb	Gelb		
0,24		Orange		
0,28		Lila		Rosa
0,3			Orange	
0,31	Gelb	Bläulich		
0,32	Orange	Orange	Orange	Blau
0,34				Lila
0,36	Olivgrün		Lila	
0,38	Gelb			Lila
0,39	Blau (schwach)			
0,41			Rosa/Gelb	
11. Fraktion :				
0,14		Gelb		
0,2		Orange		
0,21			Gelb	
0,23		Orange (schwach)		
0,28		Lila (schwach)		
0,29		Orange		

<i>Rf-Werte</i>	<i>Platte unbehandelt</i>	<i>Platte mit rauchender HCl</i>	<i>Platte mit Ehrlichs Reagenz</i>	<i>Platte im UV-Licht</i>
0,3			Orange	
0,31	Gelb			
0,32	Orange		Orange	
0,36			Lila	
0,38	Orange (deutl.)		Orange	Rötlich
0,41			Rosa/Gelb (schwach)	
0,47				Gelb
0,5				Blau
0,54				Rosa
12. Fraktion :				
0,25		Lila		
0,26		Orange		
0,29		Orange		
0,3		Lila		
0,34			Lila	
0,36	Orange (hell)		Orange	
0,38	Orange (deutl.)		Orange	Gelb
0,39			Lila	
0,4	Rosa/Orange			
0,43	Olivgrün		Braun/Grün	
0,44				Gelb
0,51				Gelb
0,56				Rosa
0,59				Gelb
13. Fraktion :				
0,34	Es zeigt sich ein braun-gelber Streifen und keinerlei Auftrennung der Substanzen in Einzelbanden		Lila	
0,36			Orange	
0,38			Orange	
0,43			Braun/Grün	
0,44			Braun/Grün	
0,46				Rosa
0,51				Gelb
0,55				Rosa

Tabelle 8.2: Rohextrakt Kontrolle: zweidimensionale Dunkelentwicklung

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0/0	Gelb-Orange (vgl. Standards)	
2)	0,063/0,063	Rosa	
3)	0,16/0,16	Rosa	
4)	0,11/0,11		Orange-Rosa
5)	0,13/0,13	Rosa	
6)	0,19/0,19	Hellblau	
7)	0,26/0,26		Gelb
8)	0,28/0,28	Hellgelb mit Schweif bis 0,41/0,28	
9)	0,29/0,29		Rosa
10)	0,34/0,34		Gelb
11)	0,36/0,36		Rosa
12)	0,41/0,41	Rosa	Orange
13)	0,43/0,43	Rosa	
14)	0,44/0,44		Orange-Rosa
15)	0,44/0,44		Blau-Grün Konstellation violett-rosa-violett
16)	0,46/0,46	Gelb	Rosa
17)	0,46/0,46	Orange-Braun	Blau-Grün
18)	0,48/0,48	Gelb	Rosa
19)	0,49/0,49	Rosa	Gelb
20)	0,5/0,5	Gelb	
21)	0,51/0,51		Gelb/Braun
22)	0,52/0,52	Hellgelb	
23)	0,58/0,58	Heller Fleck	
im sichtbaren Licht keine deutlichen Abweichungen von der Diagonalen; Abweichungen im UV-Licht:			
24)	0,5/0,28	Rosa	
25)	0,79/0,38	Rosa (über Lila-rosa-lila Komplex)	
26)	0,72/0,36	Rosa, parallel zur 1. Richtung	

Anmerkung: Verbindung zwischen Gelb (8, auf der Diagonalen) und Rosa (24, abweichend von Diagonale)

Tabelle 8.3: Auftrennung des Rohextrakts in 8 Fraktionen, TRT-Versuche mit den Einzelfractionen ohne Belichtung:

Fraktion I:

Ban de	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0/0	Rosa	
2)	0,013/0,013		Braun
3)	0,063/0,063	Rosa	
4)	0,094/0,094	Gelb	
5)	0,14/0,14	Gelb	
6)	0,19/0,19	Rosa	Gelb
7)	0,20/0,20	Gelb	
8)	0,25/0,25	Gelb	
9)	0,26/0,26	Rosa	
10)	0,28/0,28	Gelb	
11)	0,29/0,29	Rosa	
12)	0,31/0,32	Gelb	
keine Abweichung von der Diagonalen im UV-Licht; Abweichung im sichtbaren Licht:			
13)	0,39/0,26		Rosa

Fraktion II:

Im sichtbaren Licht ist eine Diagonale zu erkennen, davon abweichend jedoch zwei Punkte, deren zweiter sich scheinbar aus mehreren Farben zusammensetzt (bräunlich-gelber Schweif unten, oben roter Punkt). Im UV-Licht ist keine deutliche Diagonale zu erkennen, sie weist einen ausgeprägten Knick auf.

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,063/0,063	Gelb	
2)	0,13/0,13	Blau	
3)	0,16/0,16	Hellgelb	
4)	0,19/0,19	Gelb	Gelb
5)	0,2/0,23	Hellblau	
6)	0,22/0,22		Lila (schwach)
7)	0,25/0,29	Gelb, scheinbar darunter liegendes Rosa	Gelb
8)	0,33/0,39	Gelb ab	
9)	0,36/0,41	Rosa hier ist der	
10)	0,39/0,44	Gelb Knick in der	
11)	0,44/0,44	Rosa zu Diagonalen erkennen!!!	
12)	0,47/0,47	Gelb	
von der Diagonalen abweichende Punkte:			
13)	0,39/0,34		Rosa
14)	0,47/0,44	Gelb ????	Rosa
15)	0,42/0,44		Brauner Schweif

Fraktion III :

Ban de	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,081/0,081	Weißlich/Hellblau	Gelb
2)	0,10/0,10		Rosa
3)	0,16/0,16	Hellblau	Gelb
4)	0,17/0,17	Gelb	Gelb
5)	0,22/0,22	Kräftig Hellgelb	Orange
6)	0,26/0,26		Rosa
7)	0,34/0,34	Gelb	Gelb/Braun
8)	0,36/0,36		Rosa
9)	0,38/0,38	Fluoreszenz aufgehoben	Blau
10)	0,39/0,39		Rosa/Lila
11)	0,41/0,41	Gelb	Gelb/Braun
12)	0,43/0,43	Gelb mit zentral nicht fluoreszierendem Punkt	Bräunlich-Rosa
13)	0,44/0,44	Gelb	Leicht Rosa
14)	0,48/0,48	Rosa	Gelblich

Von Diagonalen abweichend:

	Von (4) ausgehend	Gelbe Gerade parallel zur 1. Entwicklung (etwas schräg verlaufend) mit deutlich gelben Punkt (15).	
15)	0,22/0,19	Gelb	
16)	0,19/0,25	Gelb	
17)	0,44/0,26	Gelb	
18)	0,22/0,26	Rosa	Gelb

Fraktion IV:

Ban de	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
	0,19/0,19	Gelb, setzt sich unten aus Orange und oben aus einem helleren Gelb zusammen	
1)	0,20/0,20		Gelb/Rosa
2)	0,22/0,22		Gelb
3)	0,25/0,25	Gelb/Hellblau	
4)	0,29/0,29		Rosa
5)	0,29/0,29		Rosa
6)	0,36/0,36		Lila
7)	0,38/0,38	Gelb	Rosa
8)	0,41/0,41	Fluoreszenzaufhebung	Lila
9)	0,42/0,42		Gelb
10)	0,44/0,44	Gelb	Gelb
11)	0,48/0,48	Gelb	Rosa
12)	0,52/0,52	Gelb	Schwach Rosa
Im UV-Licht Diagonale mit folgenden Schleifspuren:			
	(8)	Zeigt Ausläufer bis 0,41/0,19	= Punkt (14)
Auf (11) und (12) im sichtbaren und im UV-Licht schwach rosa Parallele in 2. Entwicklungsrichtung			
13)	0,38/0,11		Rosa
Aus Punkt (13) geht parallel zur ersten Trennrichtung eine dünne, blaue Gerade hervor, in blauen Eckpunkt mündet, um dann in 2. Trennrichtung wieder auf die Diagonale zuzulaufen und in Punkt (8) auf diese zu treffen.			
14)	0,41/0,19		Rosa, auf derselben Höhe mit Punkt (7)
15)	0,41/0,23		Rosa, auf derselben Höhe mit Punkt (9)
16)	0,38/0,23		Rosa, auf derselben Höhe mit (7)

Fraktion V:

Ban de	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,063/0,063	Gelb	Rosa
2)	0,14/0,14	Weiß ???	
3)	0,17/0,17		Gelb
4)	0,18/0,18		Orange
5)	0,20/0,20	Gelb	
6)	0,22/0,22	Gelb	
7)	0,24/0,24	Rosa	
8)	0,31/0,31	Rosa	Gelb
9)	0,35/0,35	Gelb	
10)	0,37/0,37		Lila
11)	0,38/0,38		Rosa
12)	0,39/0,39		Lila
13)	0,41/0,41	Gelb	Gelb
14)	0,42/0,42		Orange
15)	0,45/0,45	Rosa	Lila
16)	0,49/0,49		Gelb/Rosa
Von der Diagonalen abweichend:			
17)	0,41/0,2		Lila/Rosa
18)	0,39/0,34		Lila
19)	0,25/0,29	Gelb	

Punkt (19) mit Schleifspur bis 0,25/0,2; dieser Punkt liegt auf einer Geraden mit Punkt (5)

Fraktion VI:

Ban de	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,063/0,063		Rosa/Orange
2)	0,17/0,17	Gelb, mit Ausläufer in Entwicklungsrichtung 1	
3)	0,19/0,19		Blau
4)	0,22/0,22	Gelb	
5)	0,23/0,23	Rosa	
6)	0,26/0,26	Gelb	
7)	0,28/0,28		Orange
8)	0,29/0,29	Rosa	
9)	0,31/0,31	Gelb	
10)	0,34/0,34		Blau
11)	0,38/0,34		Dunkelblau
12)	0,39/0,39		Heller Fleck
13)	0,4/0,4	Gelb/Grün	
14)	0,44/0,44	Gelb	
15)	0,51/0,51	Gelb/Weiß	
Im UV-Licht zeigt sich abweichend ein blauer Punkt (17) mit den Koordinaten (0,5/0,44), d.h. er geht von Punkt (15) aus in erster Entwicklungsrichtung			
Im sichtbaren Licht erkennt man eine hauptsächlich gelb/orange Diagonale mit drei blauen Punkten; das unterste Blau zeigt schwache Streifen in erster Entwicklungsrichtung :			
18)	0,34/0,19		Blau, spannt Dreieck zwischen (3) und (10) aus
19)	0,39/0,09		Blau

Fraktion VII:

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,13/0,13	Rosa	
2)	0,15/0,15		Rosa
3)	0,17/0,17	Schwärzlich	
4)	0,18/0,18	Rosa	
5)	0,21/0,21	Gelb	
6)	0,25/0,25	Helleres Gelb	Gelb/Orange
7)	0,29/0,29		Orange
8)	0,31/0,31	Gelb	
9)	0,32/0,32		Grünlich/Gelb
10)	0,34/0,34		Orange
11)	0,37/0,37		Grünlich
12)	0,45/0,45	Gelb	Gelblich
13)	0,47/0,47	Hellblau	
14)	0,5/0,5	Orange	
Im sichtbaren Licht nur eine Abweichung von Diagonalen; Abweichungen im UV-Licht:			
	0,35/0,18		Blau
	0,4/0,33	Gelb	
	0,43/0,3	Gelb	
	0,43/0,23	Rosa	
	0,49/0,21	Gelb	
	0,6/0,3	Rosa	
	0,28/0,1	Blau	
	0,4/0,37	Hellblau, bes. dick !!!	

Fraktion VIII:

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,2/0,2		Gelb
2)	0,28/0,28	Gelb	
3)	0,33/0,33	Gelb	
4)	0,34/0,34	Rosa	Orange
5)	0,39/0,39	Orange/Gelb	
6)	0,44/0,44		Gelb
7)	0,46/0,46	Gelb	
8)	0,48/0,48	Blau, zeigt Ausläufer in 2. Laufrichtung	
9)	0,5/0,5	Orange	Gelb/Rosa
10)	0,53/0,53	Gelb	
11)	0,63/0,63	Gelb	
im sichtbaren Licht keine Abweichungen von Diagonalen; Abweichungen im UV-Licht:			
12)	0,45/0,19	Gelb	
13)	0,53/0,63	Gelb	
14)	0,25/0,41	Rosa	
15)	0,25/0,63	Rosa	

Tabelle 8.4: Rohextrakt: zweidimensionale Entwicklung mit 300 mJcm⁻² UVB:

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,22/0,22	Gelb	
2)	0,23/0,23		Gelb, schon ausgekratzt
3)	0,24/0,24	Deutliches Gelb	
4)	0,28/0,28	Gelb/Rosa	
5)	0,33/0,33	Rosa	Orange
6)	0,35/0,35		Lila
7)	0,36/0,36	Gelb	Rosa
8)	0,37/0,37		Lila
9)	0,38/0,38		Gelb
10)	0,4/0,4	Bläulich/Weiß	
11)	0,42/0,42	Gelb	Rosa
12)	0,44/0,44	Rosa	
13)	0,48/0,48	Heller Fleck	
von Diagonale abweichend:			
14)	0,37/0,23		Lila, verbunden mit (2) durch gelbe Spur und durch lila Spur mit (11)
15)	0,37/0,2		undeutliches Lila
16)	0,36/0,13		Rosa, liegt auf Gerade mit (7)
17)	0,32/0,13		Rosa, auf Gerade mit (16)
18)	0,42/0,48		Rosa, auf Gerade mit (11)
19)	0,28/0,48	Rosa	
Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
20)	0,4/0,25	Gelb, mit (3) durch gelbe Gerade verbunden	
21)	0,56/0,25	Gelb/Rosa, mit (20) durch Gerade verbunden	
22)	0,48/0,29	Gelb	
23)	0,44/0,29	Rosa	
24)	0,34/0,48	Bläulich/Weiß	

Tabelle 8.5: Rohextrakt: TRT-Versuch: zweidimensionale Entwicklung mit 2000 mJ/cm² UVB-Belichtung

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
Im sichtbaren Licht liegen besonders die gelb-braunen Töne auf der Diagonalen Während lila, helles Rosa und ein hellblauer Farbton von der Diagonalen abweichen:			
1)	0/0	Orange (bis 0,47/0 Schmierspür)	Rosa (vgl. Standard)
2)	0,063/0,063		Gelb
3)	0,094/0,094	Hellblau	
4)	0,16/0,16	Hellblau	
5)	0,16/0,16	Rosa/Orange	
6)	0,21/0,21	Gelb, deutlich!!!!	Rosa
7)	0,22/0,22	Schwaches Hellgelb	
8)	0,25/0,25	Rosa	
9)	0,30/0,30		Rosa
10)	0,33/0,33		Rosa
11)	0,34/0,34	Gelb/Rosa	Orange/Rosa
12)	0,36/0,36		Lila/Rosa
13)	0,38/0,38	Gelb/Blau	
14)	0,38/0,39		Gelb
15)	0,41/0,41		Gelb/Rosa
16)	0,43/0,43	Rosa/Gelb	
von Diagonale abweichend:			
17)	0,34/0,13		Hellblau
18)	0,37/0,13		Hellblau
Verbindung zwischen (17) und (18) untereinander und mit Diagonalen; Schweif in 2. Entwicklungsrichtung zur Diagonalen und zu Lila (10, 12) des Lila-Rosa-Lila-Komplexes			
19)	0,36/0,094		Rosa
20)	0,37/0,094		Hellblau
21)	0,37/0,19		Lila
22)	0,34/0,19		Lila (schwächer als (21))
(21) und (22) durch Schleifspur mit Lila-Rosa-Lila –Komplex (10) und (12) verbunden.			
23)	0,39/0,17		Rosa
24)	0,34/0,17		Rosa
25)	0,39/0,21		Gelb
(23) und (25) auf Gerade, gelber Schweif zu (15) auf Diagonale			
26)	0,29/0,19	Gelber Schweif, von (6) ausgehend	
27)	0,38/0,17	Rosa	
28)	0,47/0,22	Rosa	
29)	0,33/0,45	Hellgelb	
30)	0,38/0,43	Schwächer Gelb	
31)	0,38/0,53	Rosa	
32)	0,28/0,45	Deutlich Hellblau (Ø 2 cm !!!)	
in Höhe von 0,34/0 eine blaue und in Höhe von 0,39/0 eine rosa Gerade zur Diagonalen			

Tabelle 8.6: Rohextrakt: zweidimensionale Entwicklung nach Erhitzen auf 80°C für 20 min:

Bande	Rf-Werte (1./2. Entwicklung)	Farben im UV-Licht	Farben im sichtbaren Licht
1)	0,063/0,063	Orange	
2)	0,13/0,13	Blau	
3)	0,17/0,17	Hellblau	
4)	0,19/0,19		Sichtbares Gelb
5)	0,2/0,2	Deutl. Gelb	
6)	0,22/0,22	Blau	
7)	0,29/0,29		Orange/Rosa
8)	0,33/0,33		Lila
9)	0,34/0,34	Hellgelb	Rosa
10)	0,35/0,35		Orange
11)	0,36/0,36	Hellblau	Lila
12)	0,37/0,37		Bläulich
13)	0,38/0,38		Gelb
14)	0,39/0,39	Rosa	
15)	0,41/0,41	Hellblau	
16)	0,45/0,45	Hellblau	
17)	0,48/0,48	Rosa	
18)	0,53/0,53		Rosa
19)	0,56/0,56	Heller Fleck	
Abeichungen von der Diagonalen im sichtbaren und im UV-Bereich:			
	Von (3) ausgehend zeigt sich eine gelbe Gerade, die bis zum gelben Pkt. (22) führt. Auf dieser Geraden liegen folgende Punkte:		
20)	0,28/0,17	Gelb	
21)	0,36/0,17	Gelb	
22)	0,4/ 0,17	Gelb	
23)	0,41/0,094	Hellblau	
24)	0,33/0,13	Rosa	
25)	0,45/0,29	Gelb	
26)	0,36/0,5	Deutl. Gelb	
27)	0,36/0,53	Orange	
	0,33/0,1		Hellblau, auf Höhe von (9)
	0,36/0,1		Hellblau, auf Höhe von (11)
	0,35/0,1		Rosa, auf Höhe von (10)
	0,37/0,16		Lila
	0,33/0,16		Lila
	0,37/0,36		Lila, auf Höhe von (10)
	0,36/0,5		Gelb

8.7 Assay zur Enzymkinetik der hemmenden Dünnschichtbande:

335 µl einer 6,4 mM L-DOPA Lösung wurden mit 805 µl eines 0,05 M Phosphatpuffers (pH=7) und 34 µl DMSO zusammengegeben. Im DMSO gelöst wurden verschiedene Konzentrationen der Hemmfraction (=Effektorfraction). Ansätze mit reinem DMSO wurden zur Kontrolle mitgeführt. Nach Zugabe von 107 µl Tyrosinase (500 U/ml) wurde die Absorption bei 475 nm nach jeweils 60 Sekunden gemessen.

Es fanden sich folgende Ergebnisse:

Ansatz	Substratkonzentration (DOPA) in µMol/Ansatz	Effektorkonzentration in mg/Ansatz	Extinktion bei 475 nm nach jeweils 60 s
1	0,44	000000	0,035
2	0,61	000000	0,203
3	0,71	000000	0,227
4	1,4	000000	0,287
5	2,1	000000	0,330
Ansatz	Substratkonzentration (DOPA) in µmol/Ansatz	Effektorkonzentration in mg/Ansatz	Extinktion bei 475nm nach jeweils 60 s
1a	0,44	0,27	0,003
2a	0,61	0,27	0,052
3a	0,71	0,27	(0,155)
4a	1,4	0,27	0,096
5a	2,1	0,27	0,249
Ansatz:	Substratkonzentration (DOPA) in µMol/Ansatz	Effektorkonzentration in mg/Ansatz	Extinktion bei 475 nm nach jeweils 60s
1b	0,44	0,54	0
2b	0,61	0,54	0,004
3b	0,71	0,54	0,015
4b	1,4	0,54	0,025
5b	2,1	0,54	

Die Menge des entstandenen Dopachinons wurde nach der Formel $E = \epsilon \times c \times d$ berechnet. Dabei entsprechen E der jeweils photometrisch gemessenen Extinktion und ϵ dem molaren Absorptionskoeffizienten von Dopachrom. Dieser liegt bei einer Wellenlänge von 475 nm bei 3600 (Mason 1948). Die Schichtdicke d der Küvette betrug $d=1\text{cm}$. Das Molekulargewicht von DOPA beträgt $197,19\text{g/mol}$.

Lineweaver-Burk

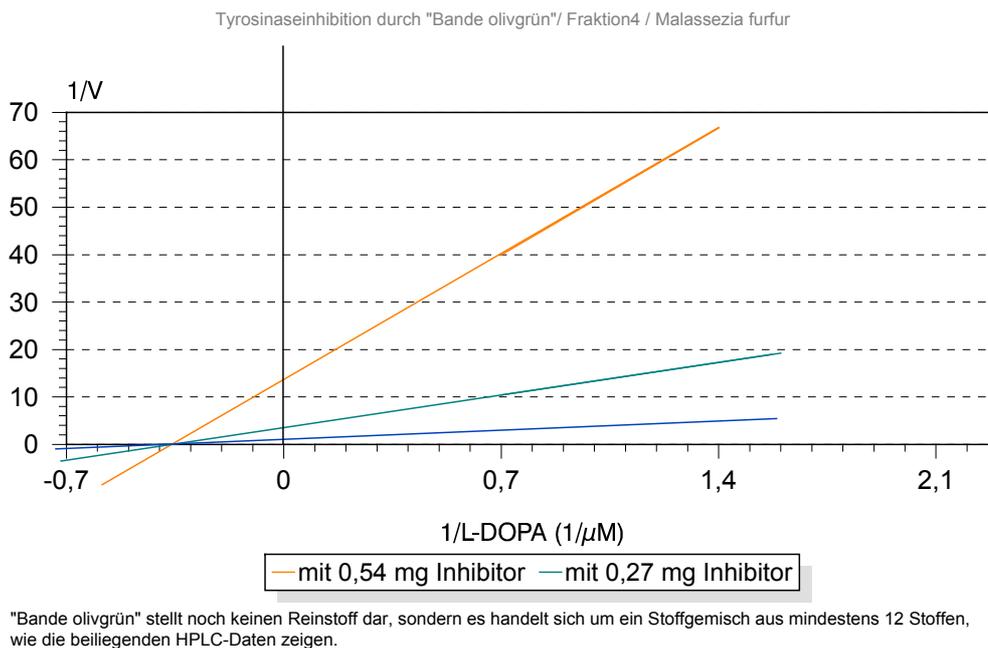


Abb. 8.1: Lineweaver-Burk-Kinetik: orange mit 0,54 mg Substanz, grün mit 0,72 mg Substanz, blau ohne Inhibitor.

Die Graphik zeigt den Typ der nicht-kompetitiven Inhibition (V_{\max} ist in den verschiedenen Kurven unterschiedlich hoch). Aus der Graphik wurde ein K_M zu $2,86\mu\text{M}$ und V_{\max} zu 1 ohne Inhibitor bzw. zu 0,25 mit 0,27 mg Inhibitor und zu $0,083 \Delta\text{OD}_{475}/\text{min}$ mit 0,54 mg Inhibitor ermittelt. Diese Ergebnisse konnten aus Gründen der geringen zur Verfügung stehenden Mengen nicht bestätigt werden. Auch wurden sie nicht mit einem Reinstoff durchgeführt, ein Vorhandensein von verschiedenen Inhibitoren in dem untersuchten Gemisch ist daher nicht auszuschließen.

Summary

Pityriasis versicolor is a common superficial skin disease caused by yeasts of the genus *Malassezia*. The disease is characterised by fine scaling and disturbance of skin pigmentation. Patients show hyperpigmented macules of a broad spectrum of colours with green-yellowish fluorescence under UV-light. Hyperpigmented areas can become depigmented in the course of the disease (pityriasis versicolor alba). The pathogenic mechanism responsible for these changes in skin pigmentation is not known yet.

Malassezia-yeasts can be cultured on a minimal medium consisting of agar, a lipid and a nitrogen source. With tryptophan as single nitrogen source *M. furfur* shows production of a brown pigment with green-yellowish fluorescence.

In the present work a method for isolation of single compounds of the pigment produced by cultures of *M. furfur* has been worked out. It was shown that pigment production goes together with indole formation. By coupling different chromatographic procedures a first metabolite (2,3'-methylenebisindolyl-3-carbaldehyde) was isolated. This hitherto unknown indole derivative shows agonism at the aryl hydrocarbon receptor. By interaction with this receptor this substance is possibly responsible for the typical scaling of the skin lesions.

Thin layer chromatography revealed a variety of differently coloured bands (yellow, red and brown) as well as fluorochromes. The broad spectrum of pigments might explain the different colours of hyperpigmented lesions in pityriasis versicolor. Likewise, the fluorochromes demonstrated can explain the yellow-green fluorescence of pityriasis versicolor under UV-light.

By assay-guided fractionation of the pigment produced by *M. furfur* a thin layer chromatography band was detected that shows inhibition of tyrosinase. Inhibition of this key enzyme in melanin synthesis could be an explanation for the depigmented areas in pityriasis versicolor alba.

Even though a relationship between tryptophan-dependent pigment synthesis of *M. furfur* and the pathogenesis of pityriasis versicolor has not been finally proven, it represents a new concept which can elucidate some clinical features as hyperpigmentation, depigmentation and fluorescence of the skin lesions in pityriasis versicolor.

Danksagung:

Danken möchte ich zunächst Herrn PD Dr. Mayser. Die interessante Themenstellung, seine immer neuen Einfälle und Fragestellungen haben mein Interesse für die Mykologie geweckt. Nicht zuletzt seine gute Betreuung und Bereitschaft, auf Fragen einzugehen, haben die Zeit im Labor lehrreich und interessant gemacht. Vielen Dank!

Die Analyse und Synthese der aufgereinigten Substanz erfolgte am Institut für organische Chemie der LMU-München. Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Steglich, insbesondere Herrn Dr. Wille, für die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank geht auch an das Institut für Umwelttoxikologie und Lebensmittelchemie der Universität Kaiserslautern, dort wurden die Untersuchungen von Malassezin am AHR durchgeführt.

Herrn Dr. Th. Monsees danke ich für die Einweisung in die HPLC. Dank auch an Frau Förste für die stete Versorgung mit Kulturmedien. Danken möchte ich allen Mitdoktoranden und Mitarbeitern im Labor. Der Zusammenhalt und die gute Zusammenarbeit ließen die Laborzeit zu einer schönen Zeit werden, an die ich mich gerne erinnere.

Für die Wegbereitung und Begleitung danke ich meinen Eltern.

Lebenslauf

Name: Wiebke Thoma

Geburtsdatum: 07.09.1974

Geburtsort: Nettetal

Ausbildung:

1981-1985 Grundschole Hohenlimburg

1985- 1994 Gymnasium Hohenlimburg

1994- 2001 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-
Universiät Giessen

Berufstätigkeit

8/2001- 2/2003 Ärztin im Praktikum im Zentrum für Dermatologie und
Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

seit 2/2003 Assistenzärztin im Zentrum für Dermatologie und
Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

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.

Wiebke Thoma

im Januar 2004