

**Untersuchungen zur Regulation des Tryptophan-abhängigen
Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur***

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

vorgelegt von Thorsten Dieter Barchmann
aus Friedberg/ Hessen

Giessen 2009

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. med. M. Goebeler

des Universitätsklinikums Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. P. Mayser

Gutachter: PD Dr. med. H. Jomaa

Tag der Disputation: 12.01.2010

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, einhalten.

Siegen, im Februar 2009

Bisherige Veröffentlichungen:

Barchmann, T., Hort, W., Krämer, H.-J., Mayser, P.: (2005) Untersuchungen zur Regulation des Tryptophan-abhängigen Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 48:307 (Poster)

Barchmann, T., Hort, W., Krämer, H.-J., Mayser, P.: Glycine as a regulator of tryptophan-dependent pigment synthesis in *Malassezia furfur*. *Mycoses*. 2009 Aug 21. [Epub ahead of print] (Artikel)

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut und ihre symbiotische Flora.....	1
1.2 Allgemeine Kennzeichen der <i>Malassezia</i> -Hefen	3
1.3 Epidemiologie	3
1.4 Morphologie.....	4
1.5 Kultur.....	4
1.6 Die Pityriasis versicolor	5
1.6.1 Klinik	5
1.6.2 Prädispositionsfaktoren.....	8
1.6.3 Diagnostik	9
1.6.4 Therapie und Prognose	10
1.6.5 Pathogenese der Pityriasis versicolor.....	10
1.6.6 Pigmentbildung durch <i>Malassezia</i> -Hefen.....	11
1.7 Grundlagen der Spektralphotometrie	12
2 Problemstellung.....	14
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Anzucht und Kultur von <i>M. furfur</i> als Referenzstamm	15
Verwendete Nährmedien	15
3.2 Versuchsaufbau der Untersuchungen	17
3.3 Erstellung von Wachstumskurven (Indirekte Methode zur Bestimmung der Keimzellzahl).....	21
3.4 Photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Pigments	23
3.4.1 Messungen.....	23
3.4.2 Bearbeitung und Auswertung der Spektralphotometermessungen.....	24
3.5 Untersuchung der Mikromorphologie	26
3.6 Methoden der Keimzahlbestimmung und Erstellung von Wachstumskurven	26
3.7 Erstellung von Eichkurven.....	28
3.8 Gewinnung von Rohextrakt und Pigment aus <i>M. furfur</i> und Flüssignährmedium	31
3.9 pH-Wert Messung	33
3.10 Statistische Auswertung	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Probleme	35
4.2 Pigmentsynthese, Biomasse und pH-Wert	41

4.2.1 Vorversuche mit einer Aminosäure	44
4.2.1.1 GLY-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Konzentration.....	44
4.2.1.2 TRP-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Konzentration.....	52
4.2.1.3 TRP-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Zellzahl	62
4.2.1.4 Versuchsreihen mit TRP und GLY in Abhängigkeit von der Konzentration in einem Diagramm	67
4.2.2 Hauptversuche mit zwei Aminosäuren.....	68
4.2.2.1 Versuchsreihen mit zeitgleicher Gabe von TRP und GLY	69
4.2.2.2 Versuchsreihen mit TRP und zeitverzögerter GLY-Gabe.....	80
4.3 Morphologie.....	90
4.4 Pigment	91
5 Diskussion.....	93
5.1 Modell.....	93
5.2 Pigmentbildung.....	94
5.3 On/Off-Phänomene der Pigmentsynthese und des Wachstums und Ihre Auswirkungen auf die Haut	95
5.4 Morphologieänderungen der Hefen.....	98
6 Zusammenfassung.....	100
7 Summary	101
Literaturverzeichnis	102
Abbildungsverzeichnis.....	110
Rohdatenliste	115
Danksagung	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts	12
Tabelle 2: Werte der GLY-Eichkurve von <i>M. furfur</i> (1878)	30
Tabelle 3: Werte der TRP-Eichkurve von <i>M. furfur</i> (1878)	30
Tabelle 4: Einstellung des Linomaten für die analytische DC	33
Tabelle 5: Versuche geordnet nach Aminosäuren	43

Abkürzungsverzeichnis

AH-Rezeptor	Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor
Aq. Dest.	Aqua destilata - Destilliertes Wasser
CBS:	Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, NL
DC:	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GLY:	Glycin
IgA	Immunglobulin A
<i>M. furfur</i> :	<i>Malassezia furfur</i>
Mio.	Million
NaCl-Lösung	Natriumchlorid-Lösung
PV:	Pityriasis versicolor
TRP:	Tryptophan
UV-Licht	Ultraviolett-Licht

1 Einleitung

Die Pityriasis versicolor (PV) gilt als eine der häufigsten superfiziellen Mykosen weltweit (Götz 1962, Hay 1992). Das Krankheitsbild ist durch polychrome („versicolor“) milchkaffeefarbene und schuppene Hautläsionen gekennzeichnet, die im UV-Licht fluoreszieren. Die Makulae können konfluieren und in eine Hypopigmentierung übergehen. 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 (Roberts 1969, Noble 1978). Allerdings tritt die Erkrankung nur bei bestimmten, dafür empfänglichen Personen auf und bei diesen ist sie meist sehr rezidivfreudig. Starkes Schwitzen begünstigt diese Neigung (Razack 1977). In unseren Breitengraden tritt die PV nur bei 0,5-1 % der Bevölkerung auf, in den Tropen findet sie sich dagegen schon bei bis zu 50% der Bevölkerung. So sind auch einzelne Faktoren wie beispielsweise klimatische Einflüsse auf das Auftreten der Erkrankung bekannt (Gupta 2002).

Unter dem Pilzrasen ist die Haut wesentlich heller als die sie umgebende Epidermis. Unter Sonnenbestrahlung bräunt die umgebende Haut stärker als diejenige, die von Pilzen befallen ist (Balus 1982). Mayser und Pape (2002) fanden heraus, dass die Hefen über einen TRP-abhängigen Sekundärmetabolismus potente UV-Filter bilden. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die unter TRP-Gabe zum Nährmedium von *M. furfur* gebildeten Pigmente und Fluorochrome ein braunes Pigment bilden (Mayser und Imkampe 1998). Diese und weitere identifizierte Verbindungen scheinen Einfluss auf die Pathogenese der PV zu nehmen.

Ungeklärt ist aber weiterhin, warum ein Keim der residenten Hautflora bei einem Teil der Menschen die PV auslöst, andere Träger aber von der Erkrankung völlig verschont werden.

Diese Arbeit versucht die Gegebenheiten auf der Haut im Rahmen der PV zu klären, indem die Veränderungen des Stickstoffangebots bei Hyperhidrose, unter der Berücksichtigung der Pigmentsynthese, der Biomasse, des pH-Werts und der Morphologie in vitro untersucht werden.

1.1 Die Haut und ihre symbiontische Flora

Die menschliche Haut ist das Schutz- und Grenzorgan zur mikrobiologischen Umwelt. Dieses Schutzsystem besteht in erster Linie aus der mechanischen Barriere der Hornschicht, die

pathogene Keime in der Regel nicht durchbrechen können, aus der relativen Trockenheit der Hautoberfläche und ihrem niedrigen pH-Wert (etwa 5,5). Hinzu kommt eine Reihe weniger gut differenzierter körpereigener Inhaltsstoffe des Oberflächenfilms mit keimabwehrender Wirkung: Lipide und freie Fettsäuren, Lysozym und Immunglobuline (z.B. sekretorisches IgA aus den Talg- und Schweißdrüsen). Ein sehr wichtiger Faktor ist schließlich die symbiontische Keimflora der Haut, die auf der immerhin ca. 2 m² großen Hautoberfläche verschiedenste Wachstumsräume geboten bekommt. Sie unterteilt sich in die residente Hautflora und die Anflugskeime (Fritsch 1998). *Malassezia*-Hefen bilden zusammen mit den *Staphylokokken* und den *coryneformen* Bakterien eine der drei großen Keimgruppen der residenten Hautbesiedlung.

So ist jede Keimgruppe der residenten Mikroorganismen auf bestimmte Wachstumsbedingungen und Mikroklimata spezialisiert, die die menschliche Hautoberfläche zu bieten hat. Die lipophilen *Malassezia*-Hefen bevorzugen ebenso wie die *coryneformen* Bakterien die talgdrüsen- und lipidreichen Bezirke der Körperoberfläche. Zu finden sind sie daher in besonders dichter Keimzahl in den Talgfollikeln der seborrhoischen Areale wie Kapillitium, Meatus acusticus externus (Randjandiche 1975, Leeming, Notman und Holland 1989), dem Nacken und der oberen Rumpfggend. (Roberts 1969). Die Abbildung 1 zeigt die Verteilung der *Malassezia*-Hefen auf der Hautoberfläche des Menschen.

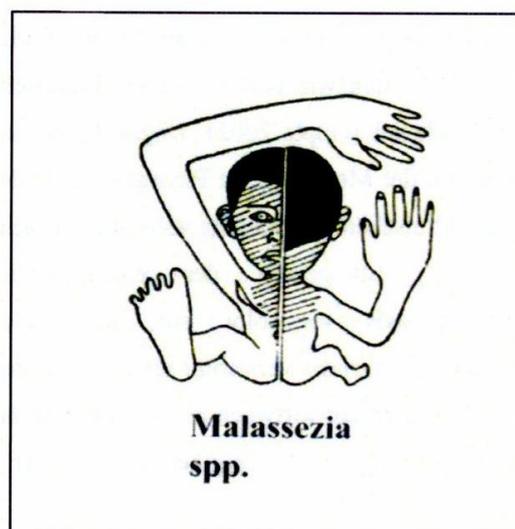


Abbildung 1: Verteilung der *Malassezia*-Hefen auf der Hautoberfläche: Schwarz: sehr dichte Besiedlung, Straffur: dichte Besiedlung (Aus: Fritsch, Dermatologie, 1998)

1.2 Allgemeine Kennzeichen der *Malassezia*-Hefen

Hefen der Gattung *Malassezia*, früher auch unter dem Namen *Pityrosporum* bekannt, gehören zur residenten Flora der menschlichen Haut (Marples 1965, Slooff 1970, Noble 1981, Guého 1996). Sie stellen fruchtkörperlose, als Einzelzeller lebende Pilze dar, die sich durch Sprossung vermehren.

Malassezia-Hefen sind von einer Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren zur Deckung ihres Kohlenstoffbedarfs abhängig (Kwon-Chung 1992, Ingham 1993), eine Ausnahme davon ist *M. pachydermatis*. Sie gehören damit zu den wenigen obligat lipophilen Mikroorganismen. Sie besitzen eine mehrschichtige Struktur ihrer Zellwand (Simmons und Ahearn 1987), des Weiteren die Fähigkeit Harnstoff abzubauen und sind durch Diazoniumblau anfärbbar (Slooff 1970, Hagler und Ahearn 1981). Aufgrund dieser Eigenschaften werden die Hefen zu den *Basidiomyceten* aus der Familie der *Cryptococcaceae* gerechnet (Yarrow und Ahearn 1984).

1.3 Epidemiologie

Das Verteilungsmuster der *Malassezia*-Hefen folgt entsprechend ihrer Lipidabhängigkeit der Dichte der Schweißdrüsen, wobei die seborrhoischen Areale wie die vordere und hintere Schweißrinne an Brust und Rücken besonders dicht besiedelt sind. Hinzu kommt die Besiedelung vom behaarten Kopf, Stirn und Nasolabialrinne, während an den Extremitäten mit Ausnahme der Ellenbeugen kaum *Malassezia*-Hefen zu finden sind (Roberts 1969, Faergmann, Aly und Maibach 1983). Die Dichte der Besiedlung ist nur schwer zu beurteilen. Auf normaler Haut wird die Keimzahl mit 10000 – 35000 Keimen/cm² angegeben, bei der Hauterkrankung PV steigt die Zahl jedoch bis auf 45000 Keime/cm² an (Wolff 1976).

Die Besiedlungsdichte hängt zudem vom Ausmaß der Talgproduktion und der Feuchtigkeit der Hautoberfläche ab. Beides wirkt förderlich auf das Wachstum der Hefen (Marples 1965, Noble 1981). Des Weiteren variiert die Dichte des Auftretens von *Malassezia*-Hefen mit dem Alter und dem veränderten Lipidangebot der Haut. Ist bei Kleinkindern die Keimdichte eher gering, so steigt die Besiedlungsdichte der Haut mit zunehmender Talgdrüsenaktivität in der Pubertät an (Noble und Midgley 1978, Faergemann und Fredriksson 1980). Mit abnehmender Talgproduktion im Alter sind die Keimzahlen rückläufig (Bergebrant und Faergemann 1988).

1.4 Morphologie

Werden die *Malassezia*-Hefen auf lipidhaltigem Dixon-Agar angezüchtet, so sind die Kolonien cremefarben-gelblich. Sie haben einen fruchtig-hefigen Geruch (van Abbe 1964), verursacht vom γ -Decalactone (Labows 1975).

Lichtmikroskopisch zeichnet sich die Gattung *Malassezia* durch einen großen Polymorphismus aus. Sie sind sowohl von runder als auch von ovaler Form. Übergänge zwischen diesen Formen bestehen und können abhängig vom Nährmedium sein (Gordon 1951, Roberts 1969, Slooff 1970, Salkin 1977). Stabile Varianten sind aber genauso zu finden (Roberts 1969, Midgley 1989, Cunningham 1990) wie Hyphenbildner (Guého 1996).

Die Zellhülle der *Malassezia*-Hefen erscheint im Lichtmikroskop doppelt konturiert. Die runden Zellen können etwa 2-3 μm im Durchmesser sein, während die ovalen Zellen bis zu 6 μm lang sind. Die Zellen lagern sich meist zu dichten Zellkonglomeraten zusammen. Diese „Nester“ sind von kurzen Hyphenelementen umgeben.

Die Tochterzellen entstehen durch monopolare (*M. furfur*) oder sympodiale (*M. sympodialis*) Sprossung. Diese Abschnürung der Tochterzelle erfolgt stets an der gleichen Stelle, der Narbe oder „collarete“, der Mutterzelle (Kreger-van Rij 1970, Slooff 1970, Simmons und Guého 1990).

Die besondere Zellhülle der Hefen ist wahrscheinlich für die besondere Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen verantwortlich. Diese Hülle (ca. 0,12 μm) bestehend aus einer Außenlamelle, einer mehrschichtigen, multilamellös untergliederten Wand und einer Plasmamembran, hat einen spiralförmigen Aufbau (Barfatani 1964, Swift 1965, Keddie 1966, Breathnach 1976, Guillot 1995, Mittag 1995 und 1996). Ihr Lipidanteil ist mit 15% besonders hoch (Thompson 1970)*.

1.5 Kultur

In der Vergangenheit waren die *Malassezia*-Hefen besonders schwer anzuzüchten, bis 1939 die obligate Verwendung eines lipidhaltigen Mediums erkannt wurde (Benham 1939). Für eine optimale Anzucht sind weiterhin Wachstumsbedingungen von 32°C und 37°C bei einem pH-Wert von 5,5 – 6,5 notwendig. Als Nährböden sind mit einer Lipidquelle (Olivenöl) überschichtete Basalmedien (z.B. Sabouraud-Dextrose-Agar), Spezialnährböden (Dixon-Agar,

van Abbe 1964; Leeming-Notman-Agar, Leeming 1987) und andere lipidhaltige Medien (Korting 1991, Guého 1996) in Verwendung. Als Fettsäurenquelle sind Kettenlängen von mindestens zwölf Kohlenstoffatomen essentiell.

M. furfur bildet unter den *Malassezia*-Spezies eine Besonderheit, da er auch auf einem Minimalmedium wächst, das nur aus einer Aminosäurequelle und aus Lipidquellen besteht.

Für das Wachstum der Hefen sind Kohlenhydrate, Vitamine, Elektrolyte nicht erforderlich. Unverzweigte Aminosäuren (Alanin, Serin, Glycin, Arginin) werden von *Malassezia*-Hefen sehr gut metabolisiert, verzweigte (Valin, Leucin, Isoleucin), aromatische (Tyrosin, Phenylalanin) und heterozyklische (Tryptophan, Histidin, Prolin) Aminosäuren dagegen weniger gut. *M. furfur* bevorzugt die Verwertung von Serin, Glycin und Alanin. Sie sind wie auch die Stickstoffquellen Kreatinin, Kreatin, Harnstoff und Harnsäure im ekkrinen Schweiß vorhanden. Die Zellmorphologie ist ebenfalls von den verstoffwechselten Aminosäuren abhängig. Es wurden lange, ovale, kettenförmige, monopolare Knospungen, Keimschläuche, Myzelfäden und Hyphen als Wachstumsformen beobachtet. Nach Mayser und Imkampé (1998) treten in vivo aber nur Mischformen auf, da alle Aminosäuren nebeneinander vorhanden sind (Müting 1953).

1.6 Die Pityriasis versicolor

1.6.1 Klinik

Die Pityriasis versicolor, hervorgerufen durch *M. furfur*, ist eine oberflächliche nicht entzündliche chronische Hautmykose mit weltweiter Verbreitung (Hay 1996). Die Erkrankung kann in eine hyperpigmentierte und eine seltenere hypopigmentierte Form, die Pityriasis versicolor alba unterteilt werden.



Abbildung 2: Hyperpigmentierung der Pityriasis versicolor

Bei der hyperpigmentierten Form (Abbildung 2) sind rundliche, teils konfluierende makulöse Hyperpigmentierungen der Haut zu sehen, die besonders in den seborrhoischen Arealen von Brust, Rücken und Gesicht zu finden sind. Die Erkrankung hat ihren Namen „versicolor“ von dem charakteristischen breiten Farbspektrum dieser Hyperpigmentierungen. So wurden gelbe, rötlich-erythematöse und bräunliche bis hin zu schwarzen Hautläsionen beschrieben (Ruete 1928, Gupta et al 2002, Sunenshine 1998). Durch einen Wechsel der Farben finden sich bei Betroffenen gleichzeitig Läsionen verschiedener Farbtöne. Besonders deutlich wird dieses Phänomen auf sonnengebräunter Haut (Jeliffe 1954, Marples 1965).

Bei Hyperpigmentierungen lässt sich durch Bestreichen mit einem Holzspatel das sogenannte „Hobelspanphänomen“ auslösen (Besnier und Balzer 1882). Die hierbei ausgelösten Schuppungen der bräunlichen Maculae geben der Erkrankung ihren Namen – „Pityriasis“ bedeutet „kleieförmige Schuppung“. Im Licht der Wood-Lampe (langwelliges UV-Licht der Wellenlänge 366 nm) ist eine gelb-grünliche Fluoreszenz der Hyperpigmentierung (Abbildung 3) zu sehen, die auch schon bei klinisch kaum erkennbaren Befunden vorhanden ist und zur Beurteilung der Ausdehnung der Erkrankung eingesetzt wird.

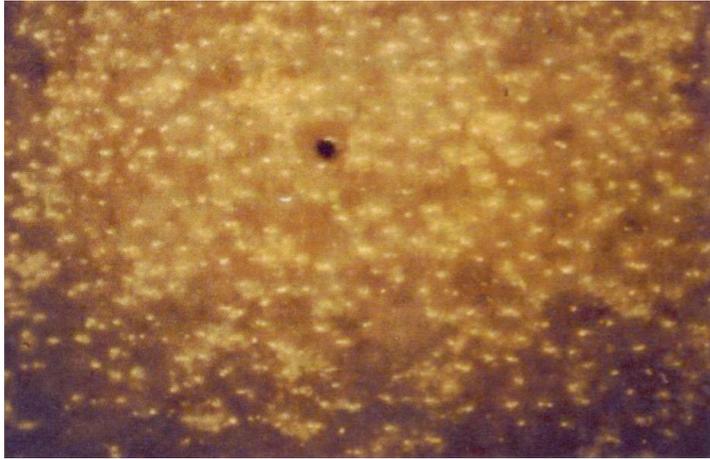


Abbildung 3: Fluoreszenz der Hautveränderungen im UV-Licht

Die hypopigmentierte Form entsteht nach Abheilen der hyperpigmentierten Form der PV (Gudden 1853, Naylor 1866). Diese langanhaltenden Depigmentierungen (Abbildung 4) sind als scharf begrenzte, gleichmäßig hypopigmentierte Makulae unterschiedlichen Durchmessers in den seborrhoischen Hautregionen zu finden. Die pityriasiforme Schuppung kann bei der Pityriasis versicolor alba vollständig fehlen (Thorne 1928, Lockshin 1973). Dieser Übergang von Hyperpigmentierung zu Depigmentierung ist nicht obligat, kann aber besonders unter Bestrahlung mit UV-Licht beobachtet werden (Lutz 1892, Adamson 1949, Lokshin 1973, Moynham 1976, El-Gothamy 1975, Gupta et al 2002). So werden nicht nur Abheilungen ohne Depigmentierung beobachtet (El-Gothamy 1975), sondern auch das zeitgleiche Vorkommen sowohl der hyperpigmentierten als auch der depigmentierten Form ist möglich (Ruete 1933, Throne 1928, Sunenshine 1998).



Abbildung 4: Pityriasis versicolor alba: depigmentierte Areale auf dunkler Haut

Die PV wird von den Erkrankten vor allem als kosmetische Beeinträchtigung (Chetty, Kamalam und Thambiah 1979) betrachtet. Gelegentlich werden auch stärker gerötete entzündliche Formen beschrieben, die mit Juckreiz und Brennen beim Schwitzen einhergehen (Götz 1962, Borelli 1991, Hay 1992), aber zumeist zeigen die betroffenen Hautareale nur geringe Entzündungszeichen (Charles 1973, Gupta 2003).

1.6.2 Prädispositionsfaktoren

Die Kontagiosität der PV ist nicht genau bekannt, wird aber eher als gering eingestuft (Faergemann und Fredriksson 1982, Hay 1996). Beide Geschlechter scheinen etwa gleich häufig zu erkranken, es werden Häufigkeitsgipfel der Erkrankung im Jugendlichen- und jungen Erwachsenenalter (Burke 1961, McAleer 1980) angegeben. Es finden sich Zusammenhänge zwischen der Dichte der Besiedlung durch *Malassezia*-Hefen und den Veränderungen der Hautlipide in der Pubertät ((Roberts 1969). Nach dem 60. Lebensjahr dagegen, wenn die Talgdrüsenaktivität abnimmt, ist die Inzidenz deutlich geringer (Michalowski 1965, Faergemann 1980, Noble 1981). Bei Anwendung lipidhaltiger Externa kann es ebenfalls zu dem Krankheitsbild der PV führen (Marples 1965, Roed-Petersen 1980).

Für das Ausbrechen der Erkrankung sind weitere Prädispositionsfaktoren beschrieben. Eine genetische Disposition wird vermutet (Ashbee 2002, Gupta 2002). Damit sich das gesamte Bild der PV zeigt, scheinen exogene Faktoren wie vor allem ein tropisch-feuchtwarmes Makroklima mit hoher Außentemperatur und Luftfeuchtigkeit, aber auch ein feuchtwarmes Mikroklima eine Rolle zu spielen. Das Mikroklima kann durch das Tragen okklusiver Kleidung (Hay 1992) und durch Beruf und Freizeitverhalten (Stefanovic 1976, Götz 1980) beeinflusst werden. Aber auch endogene Faktoren wie die erblich bedingte Hyperhidrose und vermehrte Schweißbildung im Rahmen einer Erkrankung wie der Hyperthyreose oder der Tuberkulose werden angeführt (Ruete 1928, Razak 1977). Dass dem Schwitzen eine besondere Bedeutung zukommt, wird anhand von Patienten mit Rückenmarkstraumen deutlich, bei denen eine PV nur oberhalb von denervierten Körpersegmenten auftritt (Reed et al. 1961).

Weitere Prädispositionsfaktoren sind Schwangerschaft sowie Einnahme oraler Kontrazeptiva (Roberts 1969), konsumierende Erkrankungen oder Fehlernährung (Burke 1961, Noble 1981) und spontaner oder iatrogener Hyperkortizismus (Canizares 1959, Burke 1961, Boardman

1962, Jung 1963, Roberts 1969). Auch medikamentöse Immunsuppression kann zu einer PV führen (Burke 1961, Roberts 1969).

Die Krankheit begünstigende Faktoren stellen die hohe Durchfeuchtung (Schwitzen, hohe Temperaturen, Okklusion), die sich aufgrund der Durchfeuchtung einstellende Veränderungen des Hautmilieus sowie ein besonderes Lipidangebot der Haut (Pubertät, junges Erwachsenenalter) dar. Bisher konnten Untersuchungen der Fettsäure- und Aminosäuremuster bei gesunder und erkrankter Haut eine veränderte Zusammensetzung der Gesamtlipide und der Aminosäurefraktion zeigen. Als eigentliche Ursache der Erkrankung gilt diese Beobachtung aber als nicht gesichert (Burke 1962).

1.6.3 Diagnostik

Die Diagnose der PV ist häufig eine Blickdiagnose und erfolgt klinisch vor allem durch die typische kleieförmige Schuppung, aber auch die Woodlicht-Untersuchung sowie das Hobelspanphänomen. Die Diagnose kann durch ein KOH-Nativpräparat aus den leicht zu gewinnenden Hautschuppen ergänzt werden. Die mykologische Untersuchung des Nativpräparats aus den betroffenen Hautarealen erfolgt zunächst bei 100facher, dann bei 400facher Vergrößerung. Es zeigen sich runde, 2-4 µm große Sprosszellen. Dazwischen liegen unverzweigte Hyphen mit einer Länge von bis zu 20 µm (Bojanovsky 1979). Dieses Bild wird auch als „Spaghetti mit Fleischklösschen“ bezeichnet (Abbildung 5). Hyphenbildung ist ebenfalls bei gesunder Haut beschrieben, allerdings deutlich seltener als unter der Erkrankung. Die Anlage einer Pilzkultur ist nicht sinnvoll, da *Malassezia*-Hefen zu der residenten Hautflora gehören und sich das Hyphenstadium in der Kultur nicht ausprägt. Pathogenetisch entscheidende Veränderung bei der PV ist die Induktion von Hyphen durch bislang ungeklärte Faktoren (Gordon 1951).

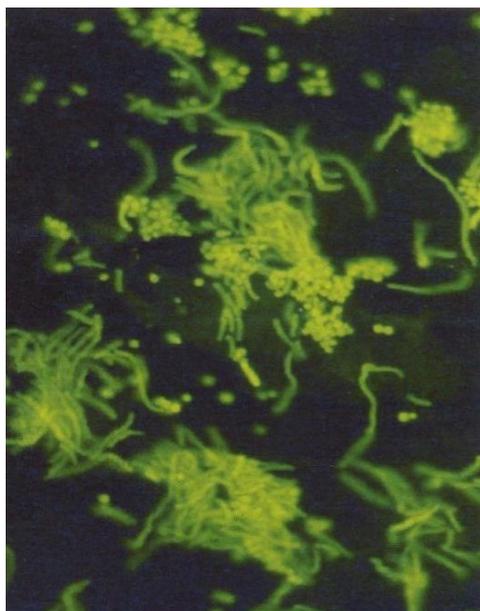


Abbildung 5: Diagnostik der Pityriasis versicolor: im Nativpräparat finden sich Sprosszellen und Hyphen

1.6.4 Therapie und Prognose

Die Therapie erfolgt als eine Intervallbehandlung, die mit der topischen Therapie beginnt. Auch eine Rezidivprophylaxe ist möglich. Antimykotika aus der Gruppe der Azole sind gut wirksam, hierbei muß allerdings der ganze Körper behandelt werden, da das Hyphenstadium auch in klinisch unauffälliger Haut erhöht ist.

Trotz antimykotischer Therapie beträgt die Rezidivrate innerhalb von 1-2 Jahren 60-80 %.

1.6.5 Pathogenese der Pityriasis versicolor

Die Pathogenese der Erkrankung konnte bisher noch nicht komplett geklärt werden. Zurzeit werden biologische Auswirkungen des TRP-abhängigen Sekundärmetabolismus von *M. furfur* in Bezug auf die klinischen Phänomene der PV wie die Fluoreszenz, die Hyper- und die Depigmentierung diskutiert.

So scheinen die Metabolite Pityriacitrin und Pityrialacton durch ihre vor UV-Strahlung schützenden Eigenschaften (Mayser und Pape 1998; Mayser 2002; Machowinski 2006) das Fehlen von Sonnenbrand in depigmentierten Arealen der PV alba zu erklären (Thoma et al. 2005, de Almeida et al. 2006). Das Pityrialacton, das in lipophiler Umgebung Blau und in wässrigem Milieu Gelb fluoresziert, könnte ein Beispiel für eine Substanz sein, die die

vielfarbigen Fluoreszenzen von PV Läsionen erklärt (Mayser 1998b, 2003). Die Pityriarubine A, B, C und Pityrianhydrid, die *M. furfur* synthetisiert, könnten mit verantwortlich für die geringen Entzündungszeichen der PV sein, da sie die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies aus aktivierten Granulozyten unterdrücken (Krämer et al. 2005a). Das ebenfalls produzierte Malassezin (Irlinger et al. 2005) induziert Apoptosevorgänge bei humanen Melanozyten und könnte an der Depigmentierung bei der PV beteiligt sein (Krämer 2005b). Zusätzlich scheint Malassezin durch Interaktion mit dem AH-Rezeptor Veränderungen der Differenzierung und dem Wachstumsverhalten der Keratinozyten zu induzieren, welches für die charakteristische Schuppung verantwortlich sein könnte. Ferner könnten Bestandteile des Pigments mit inhibierender Wirkung auf die Tyrosinase, einem Schlüsselenzym der Melaninsynthese, einen weiteren, ergänzenden Effekt auf den Depigmentierungsmechanismus haben (Dahms et al. 2002).

1.6.6 Pigmentbildung durch *Malassezia*-Hefen

1998 (a, b) wurde durch Mayser et al. ein besonderer Stoffwechselweg in Stickstoffmangelsituationen beschrieben. Es zeigt sich, dass *M. furfur* auf einem Minimalmedium aus einer Lipidquelle, Agar und TRP als alleiniger Stickstoffquelle rötlich-braunes Pigment bildet. Dies so gebildete Pigment fluoresziert im UV-Licht gelblich-grün. Es diffundiert auf den Kulturplatten innerhalb von zwei Wochen durch das klare Basalmedium. So erhält die Platte eine homogene braune Färbung.

Wird das Pigment chromatographisch aufgetrennt, so zeigt es im sichtbaren Licht eine Vielzahl von farbigen Banden mit Fluoreszenz im UV-Licht. Diese umfassen gelbe, rote, orange, grüne, blaue und braune Banden. Wie oben beschrieben handelt es sich bei den zahlreichen Pigmenten und Fluorochromen um Derivate des TRP.

Zuther et al. (2008) konnten anhand von *Ustilago maydis* zeigen, dass die Biosynthese von TRP Derivaten von einer TRP Aminotransferase - Tam 1 - katalysiert wird, die TRP in Indolpyruvat umwandelt. Sie beweisen weiterhin, dass sich diese Indolpigmente spontan aus Indolpyruvat und TRP bilden, ganz ohne Zutun weiterer Enzyme. Dies legt nahe, dass die Verwendung spontan gebildeter metabolischer Nebenprodukte einen wichtigen Schritt in der Entwicklung *M. furfur*-assoziierter Erkrankungen bildet.

1.7 Grundlagen der Spektralphotometrie

Bei der spektralphotometrischen Methode wird die Farbintensität der Lösung indirekt aus der Absorption bzw. Lichtdurchlässigkeit der Lösung bestimmt. Sie ermöglicht die Bestimmung anorganischer als auch organischer Stoffe, die in Spuren und in verschiedensten Materialien vorkommen. Sie beruht auf gezielten Farbreaktionen der Lösung, die durch Lichtschwächung gemessen werden können. Der Messbereich von sichtbarem Licht liegt zwischen 400 und 800 nm. Das uns umgebende Licht ist polychromatisch mit kontinuierlichem Spektrum – seine Farbe ist weiß. Durch geeignete Vorrichtungen, z.B. Filter, kann dieses Mischlicht zerlegt werden, so entsteht farbiges Licht, das einem bestimmten Wellenlängenbereich zugeordnet ist (Tabelle 1).

Farbe	Wellenlänge
Violett	400-450 nm
Blau	450-500 nm
Grün	500-570 nm
Gelb	570-590 nm
Orange	590-620 nm
Rot	620-760 nm

Tabelle 1: Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts

Das Absorptionsspektrum einer Lösung wird z.B. mit einem Spektralphotometer aufgenommen. Hier kann in beliebig gewählten Schritten der Wellenlängenverstellung, z.B. zwischen 400 und 800 nm, die Absorption gegenüber einer Referenzlösung, z.B. einem Lösungsmittel, ermittelt und dann als Diagramm veranschaulicht werden.

Fällt Licht durch eine Küvette mit gefärbter Lösung, so wird ein Teil des Lichts absorbiert, ein Teil durchgelassen, ein Teil an der Küvettenwand reflektiert, die durchgelassene bezeichnet man als Transmissionsgrad.

Das auftreffende Licht trifft nacheinander auf Moleküle des absorbierenden Stoffes, die einen konstanten Anteil des noch vorhandenen Lichts absorbieren. Hieraus ergibt sich eine logarithmische Zuordnung, die Extinktion, oder auch Absorbanz genannt wird:

$$E = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

Die Extinktion ist eine dimensionslose Größe. Wird mit monochromatischem Licht und stark verdünnten Lösungen gemessen, so gilt das Bouguer-Lambert-Beer-Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion; ε = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration; d = Schichtdicke

Zwischen der Extinktion und der Konzentration und der Extinktion und der Schichtdicke besteht also direkte Proportionalität (Lange und Vejdělek 1980).

2 Problemstellung

Ziel dieser Untersuchung ist die Erforschung des Sekundärmetabolismus der *Malassezia*-Hefen stellvertretend am Referenzstamm 1878. Vor dem oben beschriebenen Hintergrund interessieren vor allem die quantitative Pigmentsynthese unter dem Angebot zweier verschiedener Aminosäuren, sowie das Wachstum der Hefe unter diesen Bedingungen.

Die Morphologie von *M. furfur* im Hinblick auf eine Hyphenbildung soll weiterhin untersucht werden.

Als Kontrolle dienen Pilze, die unter denselben Bedingungen angezchtet wurden, bei denen aber keine Aminosäuren oder nur eingeschränkt GLY oder TRP zugesetzt wurden.

Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragen geklärt werden:

- Ist der untersuchte Referenzstamm in der Lage, aus GLY oder TRP Pigment zu bilden?
- Wie verhält sich das Wachstum der Hefe unter den verschiedenen Versuchsbedingungen?
- Ist die Pigmentsynthese quantitativ im Photometer bestimmbar?
- Verändert sich die Morphologie unter veränderten Versuchsbedingungen?
- Sind On/Off-Phänomene im Hinblick auf die Pigmentsynthese zu erkennen?
- Ist das Pigment, welches bei Kombination der beiden Aminosäuren synthetisiert wird, identisch mit dem Pigment, welches als UV-Filter dient?
- Ergeben sich aus den Ergebnissen mögliche Rückschlüsse auf den Pathogenitätsmechanismus der PV und besteht eine klinische Relevanz?

3 Material und Methoden

3.1 Anzucht und Kultur von *M. furfur* als Referenzstamm

Verwendete Nährmedien

Die Dauerkultur des Stammes erfolgte auf Dixon-Agar (Gueho 1996; Guillot). Einmal wöchentlich wurden die Hefen auf frisch zubereitetem Agar weiterverimpft.

Dixon-Agar

Dieses Kulturmedium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

	für 250 ml	
3,6% Malzextrakt	9g	Merck, Darmstadt, FRG
0,6% Pepton (Casein)	1,5g	Pepton aus Casein, Merck, Deutschland
2% Ochsen-galle	5g	Difco, Detroit, USA
1% Tween 40	2,5 ml	Tween 40 Atlas, Sigma St. Louis USA
0,4% Olivenöl	1 ml	kalt, sterilisiert
1,2% Agar	5g	Agar Agar reinst, Merck, Deutschland
(Aq. dest. auf 100%)		
0,04% Cycloheximid	0,1g	Sigma-Aldrich, Steinheim, FRG
0,005% Chloramphenicol	0,0125g**	auf Merck, Darmstadt, FRG

250 ml mit Aq. Dest aufgefüllt

** Die Stammlösung besteht aus: 6,25 mg Chloramphenicol / 1 ml H₂O und wurde steril filtriert, abgefüllt und bei -20°C gelagert; 2 ml der Stammlösung wurden zugegeben.

Aus Kostengründen wurde dem hier verwendeten Dixon-Agar 0,4% Olivenöl statt Glycerol und Ölsäure zugesetzt. Zur Verringerung des Kontaminationsrisikos wurden Chloramphenicol und Cycloheximid hinzugefügt. Die einzelnen Lösungen wurden steril filtriert und dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C zugesetzt, da beide Substanzen

temperaturempfindlich sind (Merck Index 1996). Autoklavieren erfolgte mit dem Melag Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG) bei 1 bar über 30 min.

Jeweils 10 ml des Mediums wurden unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank (Uniflow UUUB 1200, Biohazard) in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

Pilz-Agar nach Kimming (Merck, Darmstadt, FRG)

Zusammensetzung für 1l: Glucose 19,0 g, Pepton e carne 15,0 g, NaCl 1,0 g, Glycerin 5,0 ml, Agar-Agar 15,0 g.

Kimming-Agar wurde zum Ausschluß einer Kontamination der lipophilen *Malassezia*-Hefen mit Bakterien eingesetzt.

Am Ende eines jeden Versuchs wurden Zellen aus den Kolben entnommen und auf Kimming-Platten ausgestrichen. Danach wurden die Platten für 4 Tage bei 36°C inkubiert und anschließend unter einem Mikroskop bei 120- und 480facher Vergrößerung beurteilt.

Minimal-Flüssignährmedium

Für die Durchführung der Versuche wurde ein Flüssignährmedium verwendet, das von Gohla (2008) speziell für die Pigmentinduktion von *M. furfur* entwickelt wurde, bestehend aus:

Aq. dest. 100 ml

Chloramphenicol 0,7 ml

KH₂PO₄ 0,1 g

MgSO₄ 0,05 g

Tween 80 3,0 ml

TRP und/ oder GLY verschiedene Konz.

Zunächst wurden die Ansätze mit Aq. dest, Chloramphenicol und den Salzen in Erlenmeyerkolben im Autoklaven bei 1 bar für 30 min. sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 40°C wurden das Tween 80 und die Aminosäuren hinzugefügt.

Die Ansätze mit den zugefügten Hefen wurden mit Parafilm und Aluminiumfolie unter sterilen Bedingungen dicht verschlossen und auf Magnetrührern mit Heizplatte bei 32°C inkubiert.

In einer Studie von T. Murai (2002) wurde zur Unterscheidung von *M. furfur* und *M. sympodialis* mittels Glycin-Verwertung ein modifizierter Dixon-Agar benutzt, der mit Glycin versetzt wurde. In der hier vorliegenden Versuchsreihe wurde nur ein flüssiges Minimal-Nährmedium verwendet, um die Einflüsse des modifizierten Dixon-Agars auf das Wachstum der Hefen auszuschließen und um der Situation auf der Haut Rechnung zu tragen und eine Umspülung der Hefen zu ermöglichen.

3.2 Versuchsaufbau der Untersuchungen

Zur Versuchsvorbereitung wurden am Vortag alle Apparaturen gereinigt und die Gerätschaften im Autoklaven sterilisiert. Hierzu zählen Reagenzgläser (Firma: Assistent; Durchmesser: 75x12 mm; Nr: 2775/6; starkwandig), Erlenmeyerkolben (Firma: Schott; 500 ml und kleinere), Pipettenspitzen (weiß: 0,5 – 10 µl; Art-Nr: 9260.1; gelb: 1 – 200 µl; Art-Nr: 2395.1; blau: 100 – 1000 µl; Art-Nr: 2679.1) und Pasteurpipetten (Firma: Mainz WU; Art-Nr: 197734145).

Die Reagenzgläser wurden danach mit einem Filzmarker mit fortlaufenden Nummern beschriftet. Zur späteren Gewichtsbestimmung der Hefen wurden die Reagenzgläser auf der Analysenwaage (Firma: Sartorius research; Typ: R 180 D – 'D₁) gewogen und die ermittelten Gewichte niedergeschrieben.

Der Referenzstamm CBS 1878 von *M. furfur* wurde auf Dixon-Agar vier Tage lang bei 32°C angezüchtet.

Ansetzen des Flüssignährmediums

Die Hefezellen wurden von den Agarplatten mit einem sterilen Watteträger schonend abgeerntet, um ein mögliches Abtragen von Nährboden zu verhindern.

Anschließend wurden die Hefekonglomerate im Mörser mit einem Pistill steril zerkleinert und mit 0,9%iger NaCl-Lösung zweimalig gewaschen. Dies erfolgte in der Zentrifuge (Firma: Hettich Rotanta / RP; Rotor: 154 mm Radius) bei Programm 7 (20°C; 3000 U/min; 3 min). Der Überstand wurde mittels einer Vakuumpumpe (Pumpe....) abgesaugt und verworfen.

Schließlich wurden die Hefen wieder resuspendiert, um eine Bestimmung der Zellzahl zu ermöglichen. Dies erfolgte mit 0,9%iger NaCl-Lösung bis zu einem vorher festgelegten Volumen mit Hilfe eines Reagenzglassrüttlers (Firma: Vortex Genie 2TM).

Nun wurde die Suspension wieder mit NaCl-Lösung verdünnt. Hierzu wurden 10 µl der Lösung mit weiteren 90 µl NaCl-Lösung in ein steriles Reagenzglas pipettiert und wiederum 10 µl daraus entnommen und mit weiteren 90 µl NaCl verdünnt. Die Lösung ist nun 100 fach verdünnt.

Das Bestimmen der Zellzahl erfolgte nun in der Neubauer-Zählkammer. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden entnommen und im Lichtmikroskop (Lichtmikroskop Dialux; Firma: Ernst Leitz, Wetzlar; Service: Leica; 40er Objektiv) unter 40-facher Vergrößerung betrachtet. Ausgezählt wurden fünf große Quadrate und hierbei alle innerhalb der Gruppenquadrate liegenden Zellen sowie die auf den jeweiligen linken und unteren Begrenzungslinien liegenden Zellen (Pschyrembel).

Die Bestimmung der tatsächlichen Zellzahl in der Suspension erfolgt nach der Formel:

Gezählte Zellen * 50 * 100 * (Volumen der Lösung – 10 µl) = Anzahl der Zellen in der Suspension.

Das Einstellen der Lösung auf die gewünschte Konzentration erfolgte nun durch Entnehmen einer entsprechenden Menge Suspension, die wiederum bei Programm 7 (20°C; 3000 U; 3 min.) gewaschen wurde.

Das verbleibende Hefe-Pellet wurde nun, mit dem gewünschten Flüssignährmedium versetzt, auf dem Reagenzglasschüttler resuspendiert. Die Flüssignährmedium-Hefen-Suspension wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit einem sterilen Rührmagneten versehen und danach auf einem Magnetrührer (Abbildung 6) inkubiert. Die Temperatur des beheizbaren Magnetrührers betrug 32°C und die Umdrehungszahl 250 U/min.



Abbildung 6: Versuchsanordnung der Kolben mit beheizbaren Magnetrührern (hier ohne Lichtschutz)

Die Inkubation erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurde der Erlenmeyerkolben durch Parafilm M (Firma: American National CAN T_m; Greenwich, CT. 06836; Art – Nr.: 280131012) dicht verschlossen. Zusätzlich wurde das Gefäß nochmals mit Aluminiumfolie dicht und lichtgeschützt umhüllt.

Um regelmäßig Proben entnehmen zu können, wurde ein Wecker gestellt.

Die Kontrollansätze wurden mit den Versuchsansätzen mitgeführt. Hierbei wurde das Nährmedium ohne Pilze, aber mit den entsprechenden Aminosäuren versehen. Die Probenentnahmen erfolgten genauso wie bei den Ansätzen mit Hefen.

Probenentnahme

Aus allen Ansätzen, auch den Kontrollansätzen, wurde zum Zeitpunkt Null, also direkt nach dem Zusammenfügen und Vermischen von Hefe und Nährmedium und dem Plazieren des Kolbens auf dem Magnetrührer eine Probe entnommen, um einen Nullwert zu erhalten.

Die Probeentnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zwei Milliliter der Suspension wurden hierbei entnommen und in die vorbereiteten, mit Nummern markierten Reagenzgläser gegeben. Diese Proben wurden 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um ein Pilzpellet und einen Überstand zu erhalten.

Eine weitere Probe von 1 ml für die Untersuchung der Morphologie unter dem Lichtmikroskop wurde ebenfalls entnommen.

Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und in Eppendorfgläser überführt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (Firma: WTW, Weilheim, pH 526) entsprechend der Gebrauchsanweisung gemessen und das Ergebnis im Versuchsprotokoll notiert.

Der gewonnene Überstand wurde anschließend nochmals filtriert, um letzte Verunreinigungen zu entfernen. Hierbei kam ein Vakuumfiltersystem (Firma: Macherey-Nagel) (Abbildung 7) mit PTFE-Filtern (Firma: J.T. Baker; PTFE-Frits; Porengröße 20 µm) zur Anwendung. Der Vorteil dieses PTFE-Filters ist die komplette Extraktion von Zellresten und von auftretenden Stearinkristallen. Unter dem Woodlicht konnte nachgewiesen werden, dass das gelöste Pigment nicht durch den Filter aufgenommen wurde.



Abbildung 7: Vakuumfiltersystem mit PTFE-Filter und Probe

Der Überstand wurde bei 4°C im Kühlschrank in Eppendorfgläsern verschlossen aufbewahrt, um nach Beendigung der Versuchsreihe die kompletten Proben in einem Durchgang messen zu können.

3.3 Erstellung von Wachstumskurven (Indirekte Methode zur Bestimmung der Keimzellzahl)

Die Wachstumskurven wurden indirekt durch Bestimmung des Trockengewichtes des Pilzes erstellt (Mayser und Pape 1998).

Die anfänglich durchgeführte Methode zur Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer wurde durch Konglomeratbildung der Zellen unmöglich gemacht. Auch vorheriges Zerkleinern der Zellhaufen im Mörser war nicht praktikabel, da es hierbei zu einem Substanzverlust kam.

Das Ausgangsgewicht der trockenen Reagenzgläser war im Rahmen der Versuchsvorbereitungen mit einer Analysenwaage bestimmt worden.

Das durch die Entnahme des Überstandes erhaltene Pellet wurde in einem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2™) mit Aqua dest. aufgeschüttelt, nochmals gewaschen und die überstehende Flüssigkeit vollständig abgesaugt. Hierbei darf kein Zellmaterial aufgesaugt werden.



Abbildung 8: Verbleibende Pilzpellets der Proben

Das Zellmaterial in den Glasröhrchen (Abbildung 8) wurde in einem Techne DRI-Block DB3 (Thermo Dux, Heidelberg) über 24 h bei 65°C getrocknet, die sich nach Pape (2001) als die ideale Temperatur erwies.

Die getrockneten Glasröhrchen wurden nun ein weiteres Mal auf der Analysenwaage gewogen.

Die Differenz zwischen Endgewicht und Ausgangsgewicht der Glasröhrchen entspricht dem Gewicht der entnommenen Pilze.

Um die erhaltenen Daten auszuwerten, wurden sie digitalisiert. Durch Eingabe der Gewichte in eine Microsoft® Excel-Tabelle konnten sie den Zeitpunkten der Probenentnahme zugeordnet und so in ein Diagramm überführt werden.

Für die Versuche sind nicht so sehr die tatsächlichen Zellzahlen von Bedeutung, sondern vielmehr die Wachstumsrate der Hefen. Daher wurde für die Auswertung nur die Gewichtsveränderung der Biomasse festgehalten. Die Gewichtsveränderung steht für die Wachstumsrate der Hefen und wird in % angegeben.

3.4 Photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Pigments

3.4.1 Messungen

Nach Beendigung der Versuchsreihe wurden die gefilterten und im Kühlschrank aufbewahrten Überstände spektralphotometrisch analysiert.

Die Proben wurden vor dem Messen auf Zimmertemperatur erwärmt. Zur Messung wurden ½ Mikro-Küvetten (Firma: ratiolab GmbH, Dreieich; Art.-Nr.: 2712120) verwendet und danach verworfen.

Die Konzentration und die Schichtdicke mussten so gewählt werden, dass sie unter 1,0 E blieben.

Das zur Messung genutzte Spektralphotometer (Firma: Beckman; Modell DU 640), ist in Abbildung 9 zu sehen. Der besondere Vorteil dieses Gerätes ist die Möglichkeit der Speicherung der gewonnenen Daten in digitalisierter Form auf einem externen Diskettenlaufwerk.



Abbildung 9: Das verwendete Spektralphotometer der Firma Beckman Modell DU 640

Zur Messung wird bei dem Gerät der Modus „Wavelengthscan“ gewählt.

Die Parameter der Messung sind:

Bereich der Messung: 400 – 800 nm

Intervall: 0,5 nm

Geschwindigkeit: 400 nm/min

Zunächst wird der Ansatz ohne Hefen gemessen und als Referenzwert verwendet. Gegen diese Referenzlösung müssen nun die folgenden Proben nach Entfernung der Hefen spektralphotometrisch bestimmt werden.

3.4.2 Bearbeitung und Auswertung der Spektralphotometermessungen

Zur Speicherung der Daten ist das „automatische Speichern“ verwendet worden, welches die gewonnenen Ergebnisse auf der Festplatte zwischenspeichert. Hierzu muss das Festplattenlaufwerk zum Speichern ausgewählt und der Datei-Name eingegeben werden. Das Programm speichert nun unter dem angegebenen Laufwerk mit dem ausgewählten Dateinamen, wobei die Daten der Reihenfolge der Messung nach automatisch sortiert und nummeriert werden.

Zur Bearbeitung der Daten ist es wichtig, diese in das Format Ascii umzuwandeln, das mit Microsoft Word bearbeitet werden kann.

Zur Umwandlung werden die Daten auf der Festplatte markiert und über „Convert“ in das, nun im erscheinenden Fenster auswählbare Format, Ascii, überführt. Gleichzeitig ist es mit diesem Schritt möglich, die erhaltenen Ascii-Daten auf dem Diskettenlaufwerk zu speichern.

Die weitere Bearbeitung der Daten beginnt mit dem Öffnen der Ascii-Ordner auf der Diskette. Jede Messung hat nun eine eigene Datei zugeordnet. Zunächst müssen die Ergebnisse so umgewandelt werden, dass sie auf der deutschen Microsoft Word Version bearbeitet werden können. Hierzu ist das Ändern des englischen Dezimalzeichens, „.“ in das deutsche Dezimalzeichen „.“ notwendig. Die Ascii-Dateien wird in Word geöffnet, im Fenster

„Bearbeiten“ „Alles Markieren“ ausgewählt, danach die Funktion „Ersetzen“. Im geöffneten Datensatz wird nun das Zeichen „.“ (Punkt) durch „，“ (Komma) ersetzt werden.

Unter „Suchen nach:“ einen Punkt, und unter „Ersetzen durch:“ ein Komma eingeben. Drücken der Taste „Alle ersetzen“. Beantworten der beiden folgenden Meldungen durch Drücken der OK-Taste.

Als nächstes entfernt man die ersten sieben Zeilen, die die Parameter der Messung enthalten, indem sie mit der rechten Maustaste markiert und mit der Taste „Entf“ gelöscht werden.

Nun wird im nächsten Schritt die Textdatei in eine Tabelle umgewandelt. Wieder muss der komplette Text markiert werden (Bearbeiten > Alles markieren). Zum Umwandeln wählt man in der Wordsymbolleiste die „Tabelle“ und hier unter der Funktion „Umwandeln“ „Text in Tabelle“. Im folgenden Fenster „Text in Tabelle umwandeln“ wird die Formatierung mit der Enter-Taste bestätigt.

Nun stehen die Ergebnisse in Tabellenform zur Verfügung. Wichtig für die Auswertung ist aber nur die Spalte mit den Messergebnissen - Spalte B. Hierzu Aufheben der kompletten Markierung durch Betätigen der linken Maustaste. Markieren dieser kompletten Spalte B mit der rechten Maustaste und „Kopieren“ der Markierung.

Nun wird die Datei in Microsoft Excel überführt. Hierzu muss das Programm Microsoft Excel gestartet werden. Markieren der Spalte A, und durch Betätigen der Funktion „Einfügen“ in der Symbolleiste wird der Datensatz in das Excel-Format überführt.

Die nun folgende Meldung über das erfolgte Einfügen des markierten Bereichs wird mit „OK“ bestätigt.

Das sich bei der spektralphotometrischen Messung ergebende Extinktionsspektrum wird schließlich integriert. Dies geschieht durch Addition aller Messpunkte einer Messung. Diese Messpunkte wurden vom Photometer im Intervall von 0,5 nm bestimmt. Die Summe der ausgewählten Spalten wird von Excel in der unteren Symbolleiste angegeben.

Diesen kompletten Vorgang wiederholt man nun mit jeder der Ascii-Dateien.

Durch das Integrieren der Extinktionskurve ist es möglich, einem Zeitpunkt einen einzelnen Zahlenwert zuzuordnen. Dieser Wert ist, entsprechend des Bouguer-Lambert-Beer-Gesetzes, direkt proportional zur Konzentration des Pigments in dem flüssigen Nährmedium. Das Nährmedium wird hier als Lösungsmittel genutzt. Die sich daraus ergebenden Zahlenwerte wurden in ein x/y-Diagramm eingetragen, wobei die Y-Achse die Zeit der Probenentnahme angibt, die X-Achse die entsprechend integrierten Werte der Spektralphotometermessung.

3.5 Untersuchung der Mikromorphologie

Die Zellmorphologie der Pilze wurde mit einem Phasenkontrast-Mikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar, Germany) bei 120facher, und dann bei 480facher Vergrößerung beurteilt. Hierzu wurde die 1 ml Probe genutzt. Nach jeder Probenentnahme erfolgte die Beurteilung der Morphologie. Hierzu wurden die Pilze mit einer Öse möglichst dünn auf einem Objektträger ausgestrichen.

Für die Erkennung und Beurteilung der *Malassezia*-Sprosszellen wurden optische Aufheller (Uvitex 2B = Fungiquil, Dr. Reinehr, Kandern, Germany) verwendet, die die Sensitivität des Nativpräparates deutlich verbessern (Maysen et Gründer 1992). Der Aufheller tritt vor allem mit dem Chitin der Pilzzelle in Wechselwirkung (Koch et Pimsler 1987). Bei der Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar, Germany; Anregungswellenlänge 490 nm) zeigen sich leuchtend grün-gelbe Fluoreszenzen.

3.6 Methoden der Keimzahlbestimmung und Erstellung von Wachstumskurven

Für die quantitative Bestimmung von Wachstumszeiten wurde eine von Pape 2001 entwickelte Methode benutzt. Bei dieser Methode war das Verklumpen der Pilzzellen, welches bei der bisherigen Zellzählung ein großes Problem darstellte, unerheblich. Wie im Folgenden beschrieben, wurde nur das Gewicht der Biomasse bestimmt. Zur Ermittlung der Ausgangskonzentration musste allerdings weiterhin die direkte Methode der Keimzahlbestimmung genutzt werden.

Keimzahlbestimmung (direkte Methode)

Das Arbeiten mit sterilen Materialien war Voraussetzung, um Verunreinigungen zu vermeiden. Mit einem sterilen Watteträger wurden die Pilze vorsichtig vom Agar abgelöst, mit einem sterilen Mörser und Pistill zerkleinert und mit ca. 1 ml NaCl-Lösung (Firma: Braun-Melsungen AG) vermischt. Bei der ursprünglich benutzten ausgeglühten Platinöse, kam es hierbei zur Aufnahme von Agar, der dann die Versuche empfindlich störte. Mit Watteträgern konnte dieser Fehler ausgeschaltet werden. In einem sterilen Glasröhrchen (Firma: Assistent, Hannover, FRG) wurde dann die Pilzsuspension zur Waschung bei 1500 g drei Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge der Firma: Hettich, Typ: Rotanta / RP), der NaCl-Überstand abgesaugt und das Gefäß mit frischer physiologischer NaCl-Lösung gefüllt. Der Reagenzglasschüttler (Firma: Vortex Genie 2TM) vermischt die Sprosszellen schließlich gründlich mit NaCl-Lösung.

Die Pilze wurden wie Erythrozyten in einer Neubauer Zählkammer (5 Gruppenquadrate) gezählt. Die Suspension musste so lange mit NaCl verdünnt werden, bis die gewollte Anzahl Pilze in einem ul enthalten waren. Die Zellzahl wurde nach der Formel: $\text{Zellzahl} = S \times 50 \times f / \text{ul}$ berechnet.

S = Summe der ausgezählten Zellen in 5 Gruppenquadraten

f = Verdünnungsfaktor.

Verdünnt wurde maximal 100fach bei hohen Zellkonzentrationen. Dies entspricht in etwa einer Konzentration von 6×10^6 Zellen / ul. Höher konzentrierte Suspensionen waren nicht mehr zählbar, da der Fehler zu groß wurde.

Erstellung von Wachstumskurven (indirekte Methode zur Keimzahlbestimmung)

Die Wachstumskurven wurden indirekt durch Bestimmung des Trockengewichtes des Pilzes erstellt (Mayser und Pape 1998).

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte in einem Minimalflüssigmedium mit GLY, TPR oder einer Kombination der beiden. 2 ml wurden aus einem Kolben entnommen und in ein steriles Röhrchen gegeben. Das Ausgangsgewicht des trockenen Röhrchens war zuvor mit einer elektronischen Halbmikrowaage (Sartorius, Modell r 180 D, Ablesebereich 0,01-0,1 mg, Göttingen) bestimmt worden. Anschließend wurde die Suspension bei 1500 g über drei

Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entnommen und in ein steriles Eppendorfgläschen gegeben. Es durfte dabei kein Zellmaterial aufgenommen werden. Anschließend wurde das Pellet in einem Reagenzglasrüttler (Vortex Genie 2™) mit frischer NaCl-Lösung aufgeschüttelt, nochmals gewaschen und die überstehende Flüssigkeit vollständig abgesaugt. Jedoch durfte kein Zellmaterial abgesaugt werden.

Das anschließende Trocknen des Zellmaterials in den Glasröhrchen erfolgte in einem Wärmeblock (Thermo Dux, DRI-Block DB3, Heidelberg) über 24 h bei 65°C, nach Untersuchungen von Pape (2001) die ideale Temperatur.

Die Differenz zwischen Endgewicht und Ausgangsgewicht der Glasröhrchen entsprach dem Gewicht der abgeernteten Pilze, also der Biomasse.

Diese Messergebnisse werden in einer x/y-Graphik dargestellt. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Probenentnahmen in (h) eingetragen. Auf der dazu senkrecht stehenden y-Achse sind die bei den entsprechenden Zeitpunkten bestimmten Biomassenveränderungen (in %) eingetragen. Das Gewicht zum Zeitpunkt Null entspricht 0% Wachstum.

Es konnten nur die Veränderungen der Biomasse bestimmt werden, da aufgrund der Verwendung mehrerer Stickstoffquellen die Erstellung von Eichkurven zwecklos wurde. Gerade die Verwendung beider Aminosäuren macht die Bestimmung der Zellzahl nach der indirekten Methode aufgrund der unterschiedlichen Zellmorphologie unmöglich.

3.7 Erstellung von Eichkurven

Aus einer 10^6 CFU / ul eingestellten Pilzsuspension wurden bekannte Zellmengen abgenommen und in Reagenzgläsern abgefüllt, deren Leergewicht zuvor bestimmt worden war. Die Gläsern wurden fünf Minuten lang bei 2750 g zentrifugiert und im Heizblock 24 Stunden bei 65°C getrocknet. Die Differenz zwischen Endgewicht und Leergewicht wurde in ein Diagramm eingetragen, wobei die X-Achse die Zellzahlen angab, und auf der Y-Achse die entsprechenden Gewichte abgetragen wurden. Für jede Aminosäure und für jede Zellzahl wurden zumindest drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Die nachfolgenden Abbildungen 10 und 11 zeigen die Eichkurven, die Tabellen 2 und 3 die entsprechenden Messergebnisse, die sich, entsprechend den untersuchten Aminosäuren, ergaben.

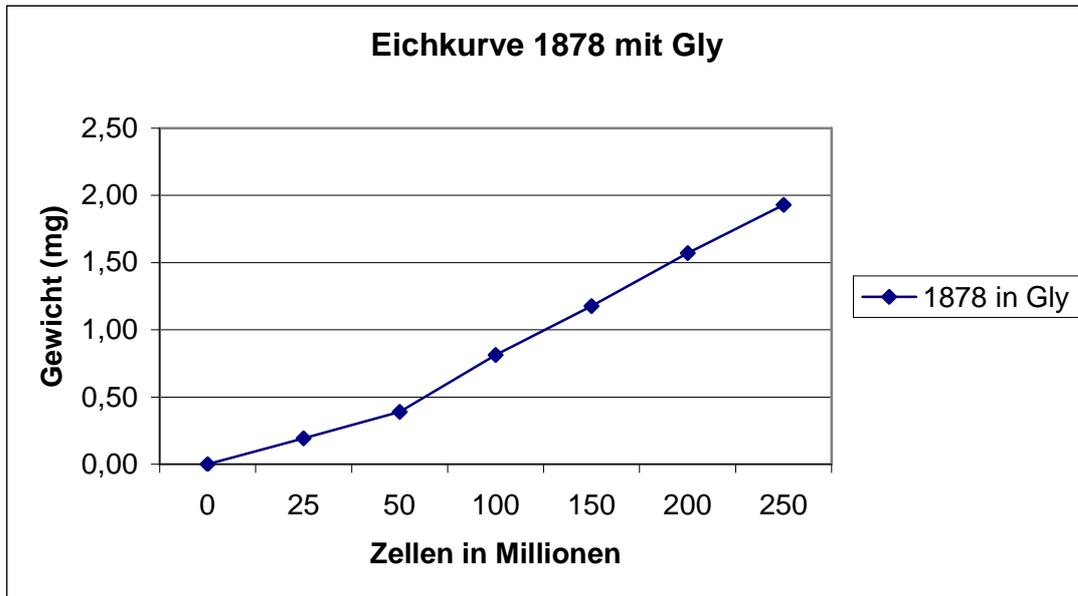


Abbildung 10: Eichkurve mit GLY (1878)

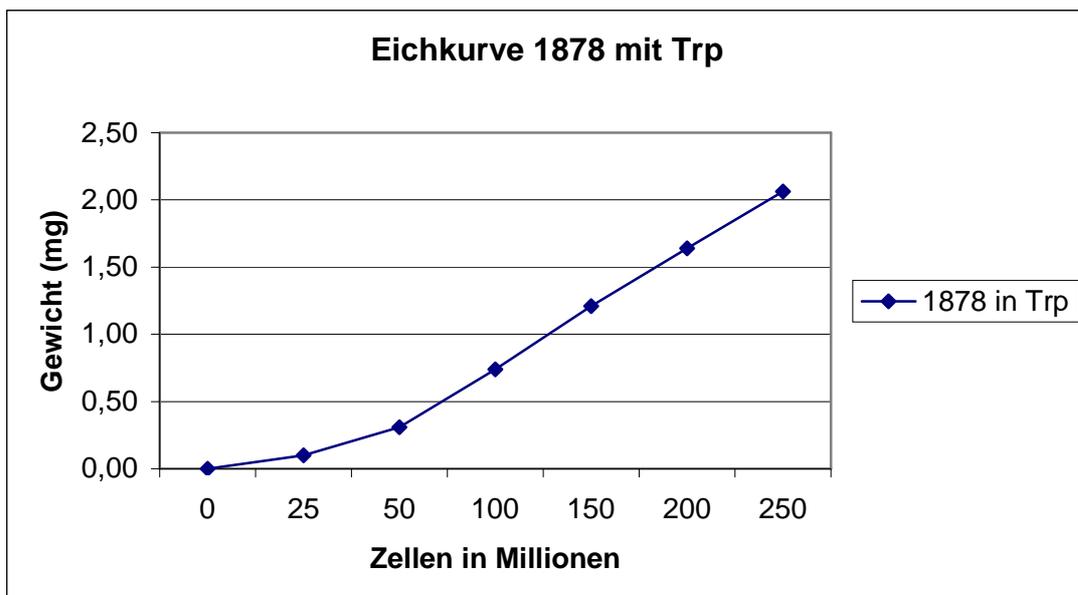


Abbildung 11: Eichkurve mit TRP (1878)

Aminosäure	Zellzahl (Mio.)	Gewicht (mg)
Glycin	0	0,00
	25	0,19
	50	0,39
	100	0,81
	150	1,18
	200	1,57
	250	1,93

Tabelle 2: Mittelwerte der GLY-Eichkurve von *M. furfur* (1878)

Tryptophan	0	0,00
	25	0,1
	50	0,31
	100	0,74
	150	1,21
	200	1,64
	250	2,06

Tabelle 3: Mittelwerte der TRP-Eichkurve von *M. furfur* (1878)

Die obigen Eichkurven konnten allerdings aufgrund der zeitgleichen Verwendung mehrerer Stickstoffquellen nicht verwendet werden. Für die Beurteilung des Wachstums der Zellen wurde stattdessen die Biomasse der Hefen herangezogen.

3.8 Gewinnung von Rohextrakt und Pigment aus *M. furfur* und Flüssignährmedium

Zur Gewinnung des Pigments wurde am Ende der Versuchsreihen das verbliebene Flüssignährmedium im Kolben samt Zellen mit Ethylacetat (Firma: Merck) versetzt und über 24 h 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 durchgemischt. Die dabei entstehenden drei Phasen (Wasserphase, schaumige Phase mit Tween, Ethylacetatphase mit Pigment) wurden im Scheidetrichter voneinander getrennt, die pigmenthaltige Ethylacetatphase 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. Die Trennung des so erhaltenen Rohextrakts erfolgte durch Säulenchromatographie. Diesem Verfahren liegt das Prinzip der Gelpermeations- und Ausschlußchromatographie zugrunde. Moleküle unterschiedlicher Größe werden in einer flüssigen (mobilen) Phase durch eine feste (stationäre) Phase geführt. Infolge des 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. Pfeuffeer, 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 erfolgt 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 der 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 in Glasgefäßen aufgefangen, mittels Rotationsverdampfer getrocknet und in Ethanol gelöst in 5 ml-Probenröhrchen (Autosamplerröhrchen mit Teflon-Dichtung, Neolap, 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.

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

Dazu wurden jeweils 10 µl der Säulenfraktion (in 10%igem Ethanol gelöst) mittels Linomat IV (Camag, Muttenz, Switzerland) und einer 100 µl Hamilton Spritze (Linomat-Spritze, Camag) punktförmig auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, 20x20, Merck) aufgetragen. Folgende Einstellungen des Linomaten wurden für die analytische Dünnschichtchromatographie gewählt:

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

Tabelle 4: 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.

Anschließend wurden die so erhaltenen Banden der Platten aus den TRP-Versuchen mit denen bereits vorhandener TRP-Versuche verglichen.

3.9 pH-Wert Messung

Die pH-Wert Messung erfolgte nach jeder Probenentnahme mit den bereits zentrifugierten und gefilterten Proben. Auf diese Weise konnte eine Verschmutzung der Sonde mit Zellen verhindert werden.

Bei einer Temperatur der Probe von 32°C wurde die Sonde des pH-Meters so lange in die Probe eingetaucht, bis sich der angezeigte Wert nicht mehr veränderte. Wichtig war das Säubern der Sonden gemäß der Bedienungsanleitung nach jeder Messung mit Alkohol, um einer Verschmutzung mit Fetten vorzubeugen. Diese so gewonnenen Werte wurden im Versuchsprotokoll festgehalten.

Die Messergebnisse werden in einer x/y-Graphik eingetragen. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Probenentnahmen in (h) eingetragen, auf der dazu senkrecht stehenden Y-Achse die zu den entsprechenden Zeitpunkten ermittelten pH-Werte.

3.10 Statistische Auswertung

Die Erfassung der Daten sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Microsoft Excel XP. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe von Mittelwerten und Standardabweichung beschrieben und graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung der Größenunterschiede der Biomasse und der Absorption zwischen GLY und TRP gefütterten Zellen wurde mit einem parametrischen Test (students t test für unverbundene Stichproben) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen zweiseitigen p-Wert $<0,05$ gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2008).

4 Ergebnisse

4.1 Probleme

Abernten der Zellen

Bei den Versuchen allein mit Tryptophan kam es anfangs nicht zu einer sofortigen Pigmentsynthese.

Während dieser Phase der Versuchsdurchführung wurde beim Abernten der Pilze von den Dixon-Agar-Platten eine Platinöse genutzt, hierbei aber auch immer ein Teil des weichen Agars mit aufgenommen. Bei der späteren Verarbeitung der Pilzkonglomerate im Mörser wurden diese Agarteile fein zermörsert und führten so zur Verunreinigung der Pilzsuspension.

Besonders deutlich ist dies im Versuch in Abbildung 12 zu sehen, bei dem neben verschiedenen Zellzahlen 15 mM TRP zugesetzt wurden. Hier wurde mit einer Platinöse gearbeitet und vermehrt Nährboden mit aufgenommen. Im Diagramm kann man deutlich die Verzögerung der Pigmentsynthese aufgrund der Verunreinigung beobachten.

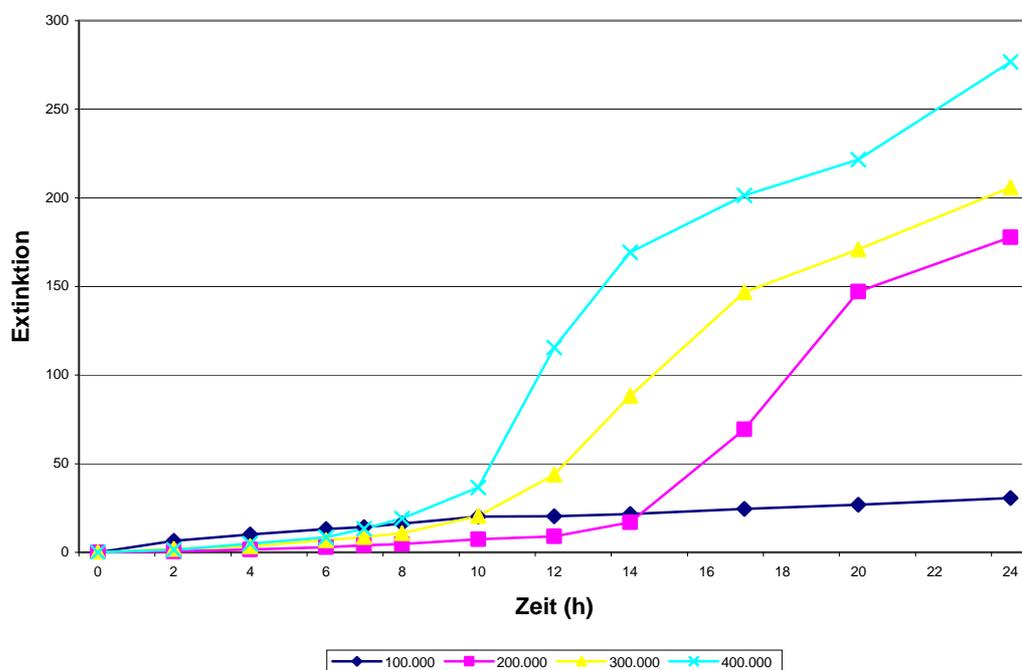


Abbildung 12: Extinktionskurve bei Verunreinigung mit Dixon-Agar

Erst mit 10 Stunden Inkubationszeit beginnt die Synthese des Pigments. Hier ist wiederum besonders zu beobachten, dass zuerst die Synthese im Ansatz mit 400.000 Zellen, also dem Ansatz mit der größten Zellmenge, beginnt. Dann folgen die weiteren Ansätze in absteigender Zellzahl. Ebenso ist die produzierte Pigmentmenge bei hohen Zellzahlen größer als bei kleinen.

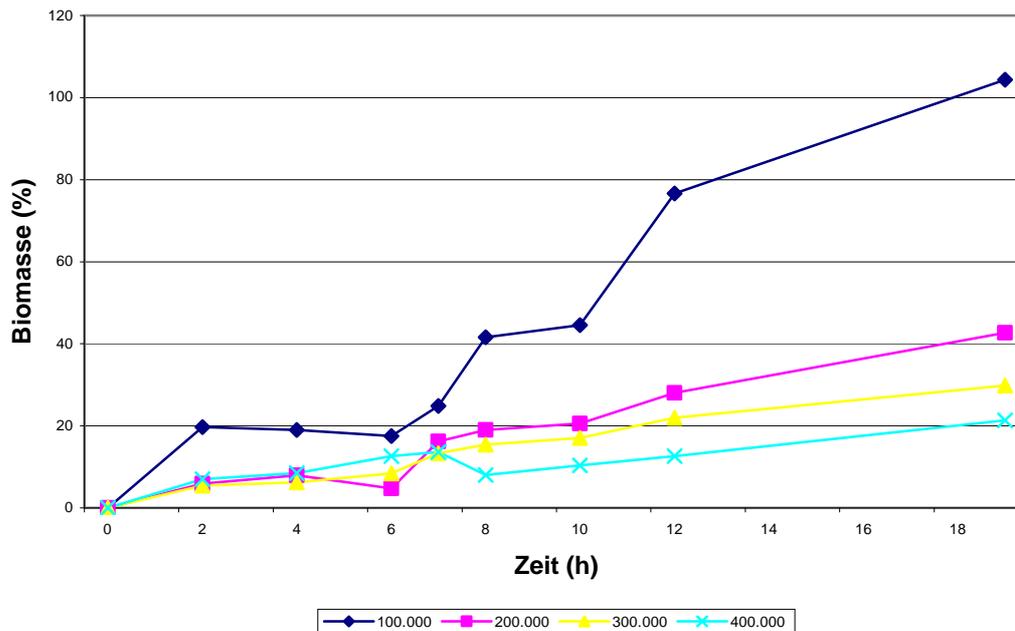


Abbildung 13: Biomassenzunahme bei Verunreinigung mit Dixon-Agar

Bei der Betrachtung der Abbildung 13 zeigt sich bei der Biomasse ein fast linearer Anstieg, hier sind es im Gegensatz zur Pigmentsynthese besonders die Ansätze mit den niedrigen Zellzahlen, die stärker wachsen.

Die Methode des Aberntens der Pilze wurde so verändert, dass kaum Nährboden mit aufgenommen werden konnte. Anstelle der Platinöse hat sich hier die Nutzung eines sterilen Watteträgers bewährt.

Bei der Wiederholung des Versuchs mit 15 mM TRP und 100.000/200.000/300.000 und 400.000 Zellen zeigte sich bei der Auswertung der spektralphotometrischen Messungen eine deutliche Veränderung des Extinktionsdiagramms. Der Beginn der Pigmentsynthese war nun spektralphotometrisch als auch makroskopisch deutlich früher zu beobachten.

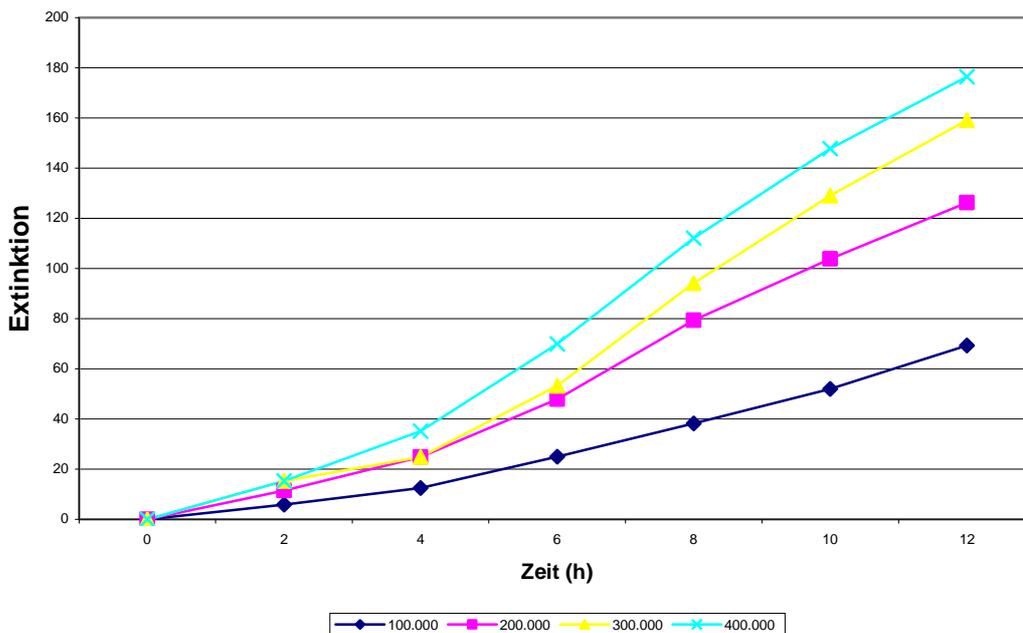


Abbildung 14: Extinktion ohne Verunreinigung und unter Verwendung eines Watteträgers

Auch in Abbildung 14 lässt sich die Beobachtung wiederholen, dass die Pigmentsynthese bei den Ansätzen mit einer hohen Zellmenge deutlich stärker ist, als dies bei den Ansätzen mit wenigen Zellen der Fall ist.

Die Graphik zeigt, dass es zu keiner beeinträchtigenden Verunreinigung des flüssigen Nährmediums mit Dixon-Agar gekommen ist. Die Pigmentsynthese beginnt direkt nach dem Starten des Versuchs, eine Verzögerung ist nicht zu beobachten.

Anzucht von *M. furfur* in flüssiger Dixon-Nährlösung

Ein Ansatz zur Vermeidung der Kontamination der geernteten Pilze mit festen Bestandteilen des Dixon-Agars und einem geringeren zeitlichen Aufwand der Versuchsvorbereitung bestand in der Anzucht der Hefen in flüssigem Dixon-Medium. Hierbei wurde bei der Herstellung des Dixon-Nährbodens auf den Agar-Anteil verzichtet. Nach dem Autoklavieren des nun flüssigen Dixon-Nährmediums wurden die Hefen wie bei den Versuchen mit dem Minimalnährmedium zugefügt und unter gleichen Rahmenbedingungen auf einem beheizbaren Magnetrührer inkubiert. Die Hefen verblieben 7 Tage in der Lösung.

Das Ergebnis dieses Ansatzes war durch Konglomeratbildung der Hefen mit dem zugesetzten Olivenöl allerdings sehr unbefriedigend. Eine Auftrennung der Olivenöl-Hefenkonglomerate war nicht möglich und so wurde diese Möglichkeit der Anzucht verworfen.

Schwebeteilchen

Bei der makroskopischen Beobachtung der Versuche fiel eine Trübung der GLY-Versuche auf. Diese Trübung betraf besonders den Zeitraum des ersten Tages nach Beginn der Versuche. Diese Trübung verschwand danach bis auf einen geringen Rückstand. Bei den Teilchen handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ausgefallene Stearinkristalle, die bei der Spaltung von Tween 80 entstehen.

Da sich die Ergebnisse der Spektralphotometrie durch diese Streuung verfälschten, wurde die Vorgehensweise so geändert, dass die Filtration der Proben vor dem Messen erfolgte. Für diesen Zweck wurde eine Vakuumpumpe mit PTFE-Filter (Porengröße 20 µm) verwendet. Hierdurch konnte die Qualität der Proben verbessert werden (Abbildung 15).

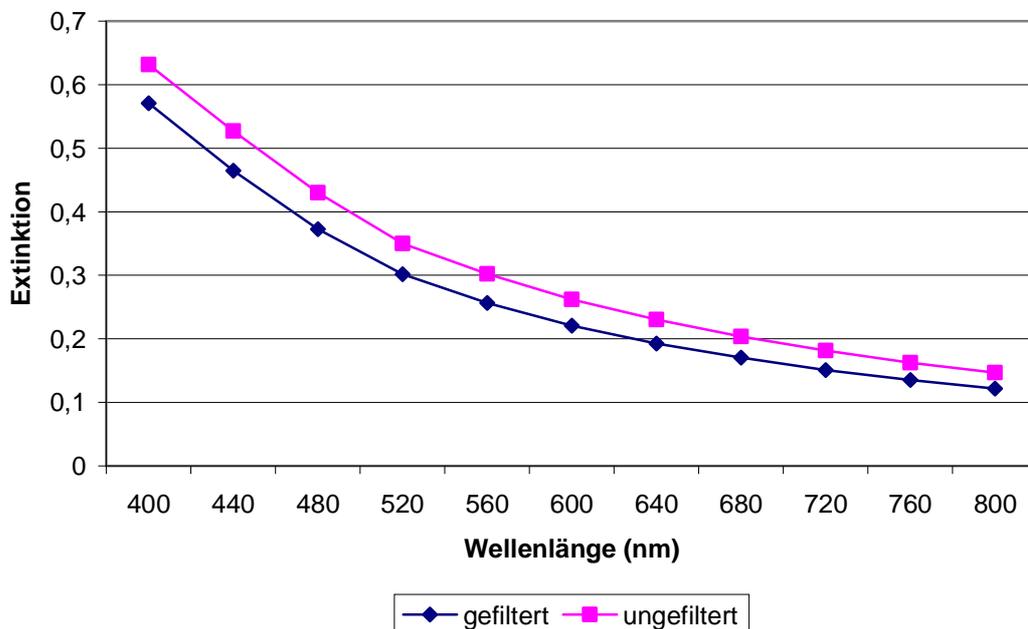


Abbildung 15: Vergleich der Extinktionskurven einer gefilterten und einer ungefilterten Probe

Zellzahlbestimmung

Zu Beginn der Versuche wurden die Zellzahlen mit Hilfe der Neubauerzählkammer nach der direkten Methode der Zellzahlbestimmung bestimmt. Für die Bestimmung der anfänglichen Zellmenge war diese Methode durchaus praktikabel, für eine Zählung der Zellen im Verlauf war sie nicht geeignet. *M. furfur* neigt im wässrigen Milieu zu Konglomeratbildung, das Zählen der einzelnen Zellen ist deshalb kaum möglich. Zudem war das Zählen in der Neubauerkammer sehr zeitaufwendig, so dass die zwei Stunden zwischen den Probenentnahmen für die Durchführung dieser und aller weiteren nötigen Untersuchungen nicht ausreichend waren (Abbildung 16)

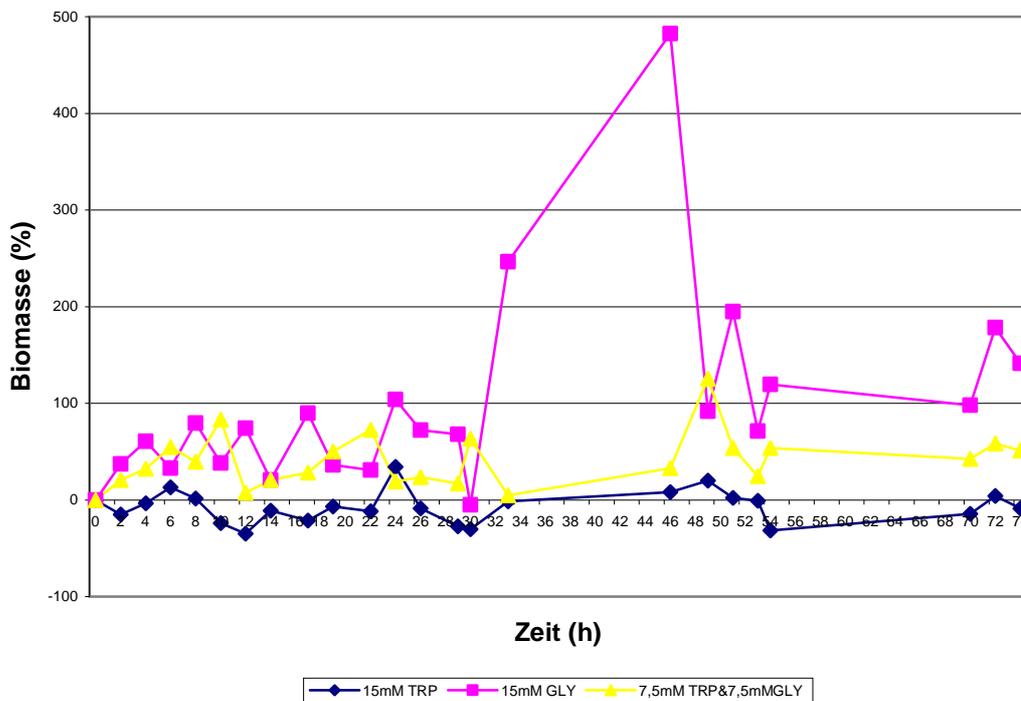


Abbildung 16: Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer

Die Umstellung auf die indirekte Methode (Abbildung 17) zur Bestimmung der Zellzahlen (Trockenmethode) war deutlich genauer, einfacher zu handhaben und weniger zeitintensiv.

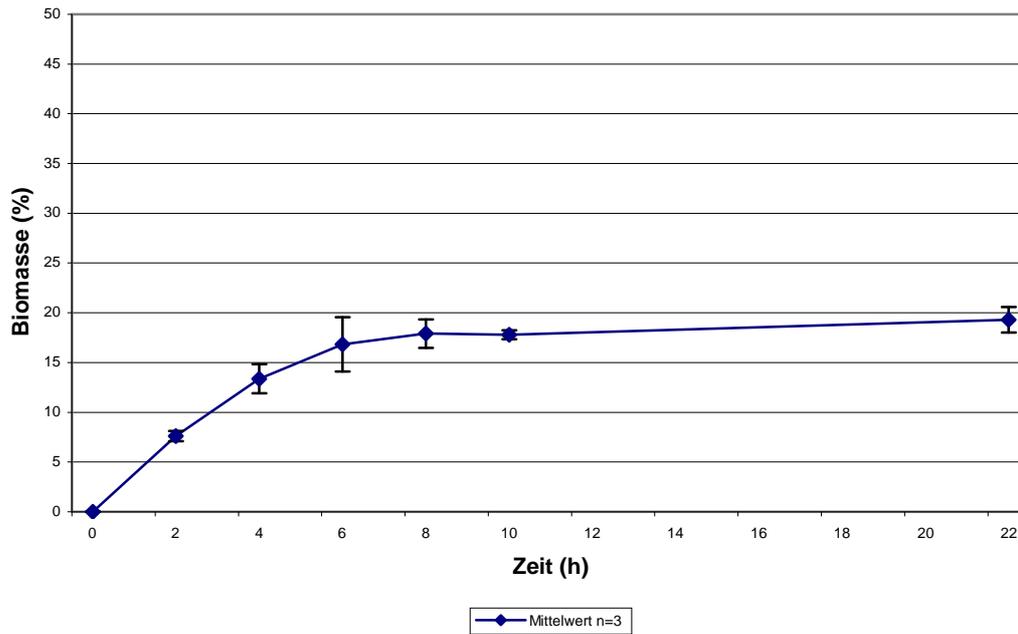


Abbildung 17: Zellzahlbestimmung nach der indirekten Methode (Trockengewichtbestimmung)

Leider konnte nicht vollständig auf die direkte Methode der Zellzahlbestimmung verzichtet werden, da sie zur Bestimmung der Zellzahlkonzentration in der Versuchsvorbereitung notwendig war. So schlich sich schon in einer frühen Phase ein Fehler ein, der allerdings systematisch bei allen Versuchen vorkommt. Auf diese Weise ist aber auch eine genaue Angabe der Biomasse schwer möglich, so dass im Ergebnisteil nur Veränderungen der Biomasse nach dem Starten der Versuche aufgeführt werden.

Ein weiteres Problem bei der Bestimmung der Zellzahlen war die im Vorhinein nur schwer abschätzbare Pilzausbeute beim Abernten der Agar-Platten. So kommt es, dass bei den Versuchen die Zellzahlen teilweise variierten, da sie an die vorhandenen geernteten Pilzmengen angepasst werden mussten. Eine Verringerung der Anzahl der Probeentnahmen kam nicht in Frage, da sonst wichtige Veränderungen, wie beispielsweise bei der Pigmentsynthese, nur unzureichend beurteilbar gewesen wären. So wurde in Kauf genommen, dass nicht immer die gleichen Zellzahlen verwendet wurden, aber zumindest die Proben über einen angemessenen Zeitraum genommen werden konnten.

Spektralphotometrische Pigmentbestimmung

Die spektralphotometrische Bestimmung der Pigmentsynthese wurde zu Beginn der Versuchsreihe an einem analogen Spektralphotometer durchgeführt. Zur Auswertung der Versuche erwies sich dieses Gerät allerdings als unbrauchbar, da es nur in der Lage war, die Ergebnisse der Messungen auf Papier zu übertragen. Zur Überführung der Ergebnisse in eine graphische Darstellung war das Integrieren jeder einzelnen Kurve nötig, um jedem Zeitpunkt einen Zahlenwert zuzuordnen, eine derartige Auswertung der gedruckten Kurven allerdings unmöglich. Schließlich aber konnte im Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität ein Spektralphotometer mit Speichermöglichkeit der Daten auf Diskette genutzt werden.

4.2 Pigmentsynthese, Biomasse und pH-Wert

Rein makroskopisch sind die Ansätze mit erfolgreicher Pigmentsynthese an der rötlich-braunen Verfärbung des Flüssignährmediums zu erkennen, wohingegen bei den Ansätzen ohne Pigmentsynthese die Farbe im hellgelben Farbbereich einzuordnen ist. Zur quantitativen Beurteilung der Pigmentsynthese werden die Messungen im Photometer vorgenommen. Hier wird der Bereich des sichtbaren Lichtes gewählt, von 400 nm bis 800 nm.

Die Messergebnisse der Pigmentsynthese, aber auch das Wachstum und der pH-Wert werden in einer x/y-Graphik dargestellt. Bei allen drei Ergebnissen ist auf der x-Achse die Zeit eingetragen. Auf der dazu senkrecht stehenden y-Achse sind bei der Pigmentsynthese die integrierten Messwerte der Extinktionen, der zu diesem Zeitpunkt entnommenen Proben, abgetragen. Die y-Achse gibt bei den Wachstumsgraphiken die Wachstumsrate der Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt in (%) an. Bei den Graphiken des pH-Werts sind auf der y-Achse die, dem entsprechenden Zeitpunkt zugeordneten, pH-Werte eingetragen.

Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln, wie oben bereits erläutert, in Diagrammform dargestellt. Um die Übersicht über die verwendeten Zellzahlen, Aminosäurenkonzentrationen und die zahlreichen Diagramme zu erleichtern, folgt eine Aufzählung aller Vorversuche und Hauptversuche in Tabellenform (Tabelle 5) mit der zugehörigen Seitenzahl.

Vorversuche mit einer Aminosäure

GLY-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Konzentration		
Aminosäurekonzentrationen	Zellzahlen	Seite
2,5 mM GLY	1 Mio.	44
15 mM GLY	1 Mio.	47
45 mM GLY	1 Mio.	49

TRP-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Konzentration		
Aminosäurekonzentrationen	Zellzahlen	Seite
15 mM TRP	1 Mio.	52
30 mM TRP	1 Mio.	54
30 mM TRP	250.000	57
45 mM TRP	500.000	60

TRP-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Zellzahl		
Aminosäurekonzentrationen	Zellzahlen	Seite
15 mM TRP	100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio.	63
15 mM TRP	100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio.	65

Versuchsreihe mit TRP / GLY in Abhängigkeit von der Konzentration		
Aminosäurekonzentrationen	Zellzahlen	Seite
15 mM TRP / 15 mM GLY	1 Mio.	67

Hauptversuche mit zwei Aminosäuren

Versuchsreihen mit zeitgleicher Gabe von TRP und GLY		
Aminosäurekonzentrationen	Zellzahlen	Seite
15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM GLY + TRP	500.000	69
15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM GLY + TRP	200.000	71
15 mM TRP + 15 mM GLY	1 Mio.	74

Versuchsreihen mit TRP und zeitverzögerter GLY-Gabe		
Aminosäurekonzentrationen	Zellzahlen	Seite
7,5 mM TRP + 7,5 mM GLY nach 12 h 7,5 mM TRP	250.000	81
7,5 mM TRP + 7,5 mM GLY nach 8 h 7,5 mM TRP	250.000	85
15 mM TRP + 3 mM GLY nach 9 h und 15 h 15 mM TRP	1 Mio.	86

Tabelle 5: Versuche geordnet nach Aminosäuren

4.2.1 Vorversuche mit einer Aminosäure

4.2.1.1 GLY-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Konzentration

Die Vorversuche mit GLY als alleiniger Stickstoffquelle zeigen makroskopisch und auch bei den Messungen im Spektralphotometer keine Pigmentsynthese. Auch durch Variation der Konzentrationen des GLYs lassen sich keine Veränderungen der Pigmentsynthese induzieren. Allerdings kommt es zu einer starken Zunahme der Biomasse.

Eine Trübung mit weißen Schwebeteilchen - Stearin-Kristallen – wurde herausfiltriert.

2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen

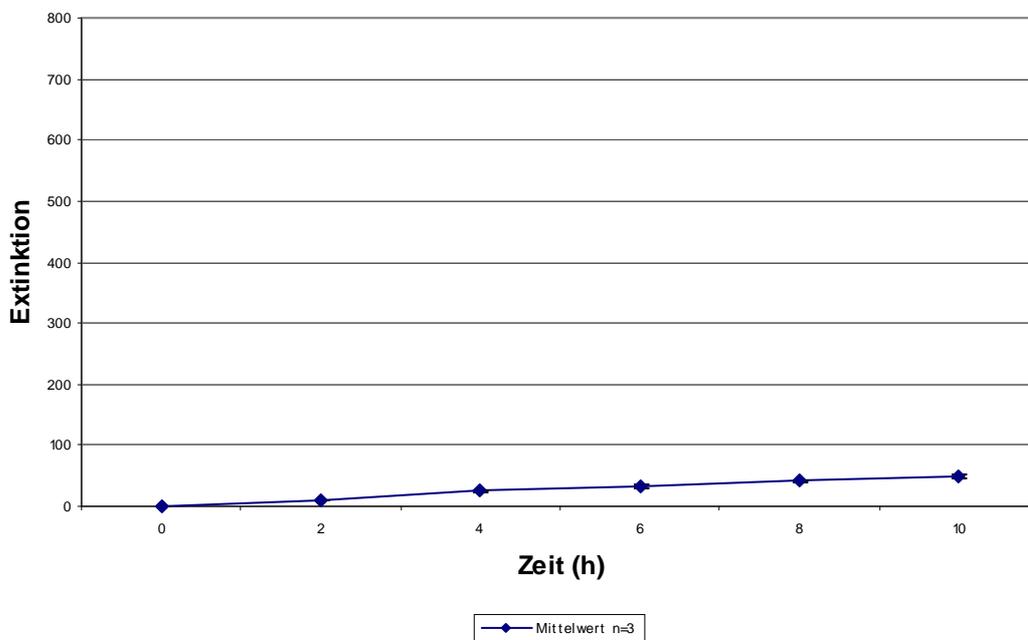


Abbildung 18: Extinktion bei Verwendung von 2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Die Abbildung 18 zeigt, dass es bei einer Zellzahl von 1 Mio. und der Zugabe von 2,5 mM GLY nur einen geringen Anstieg der Extinktionswerte gibt. Makroskopisch ist keine Pigmentbildung zu beobachten.

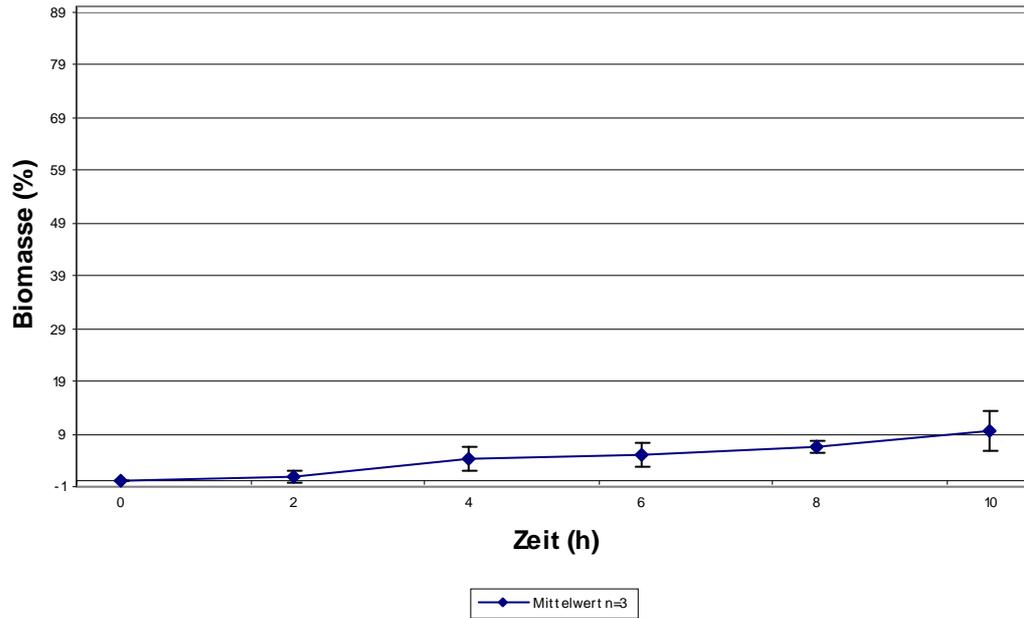


Abbildung 19: Biomassenveränderung bei Verwendung von 2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Die Abbildung 19 zeigt, dass bei Zugabe von 1 Mio. Zellen und Verwendung von 2,5 mM GLY die Biomasse der Hefen trotz der geringen Stickstoffmenge ansteigt.

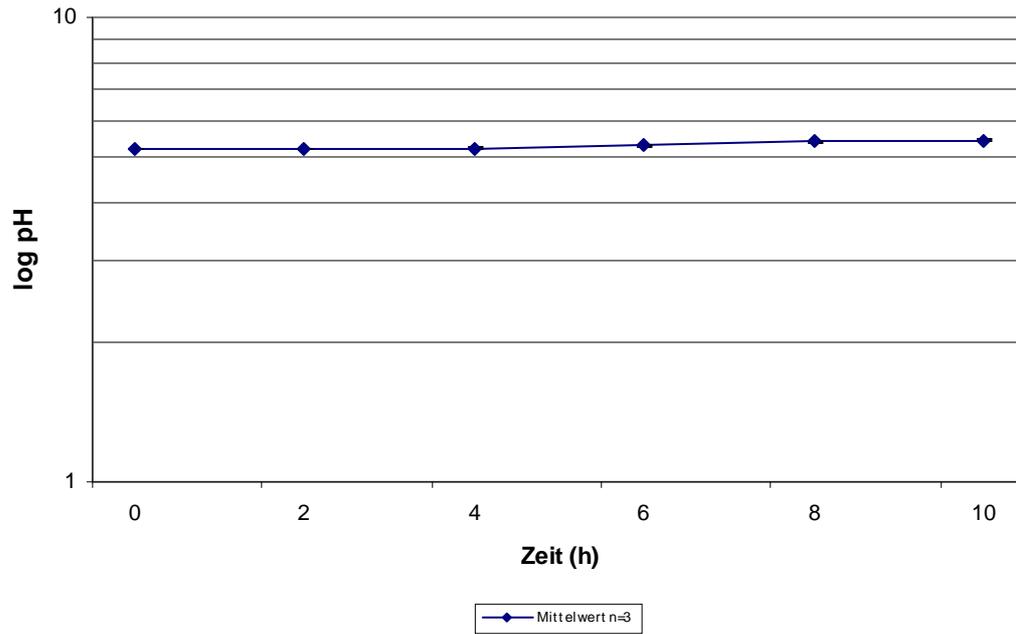


Abbildung 20: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Die Abbildung 20 zeigt den sehr geringen Anstieg der pH-Werte in allen drei Versuchsansätzen.

15 mM GLY und 1 Mio. Zellen

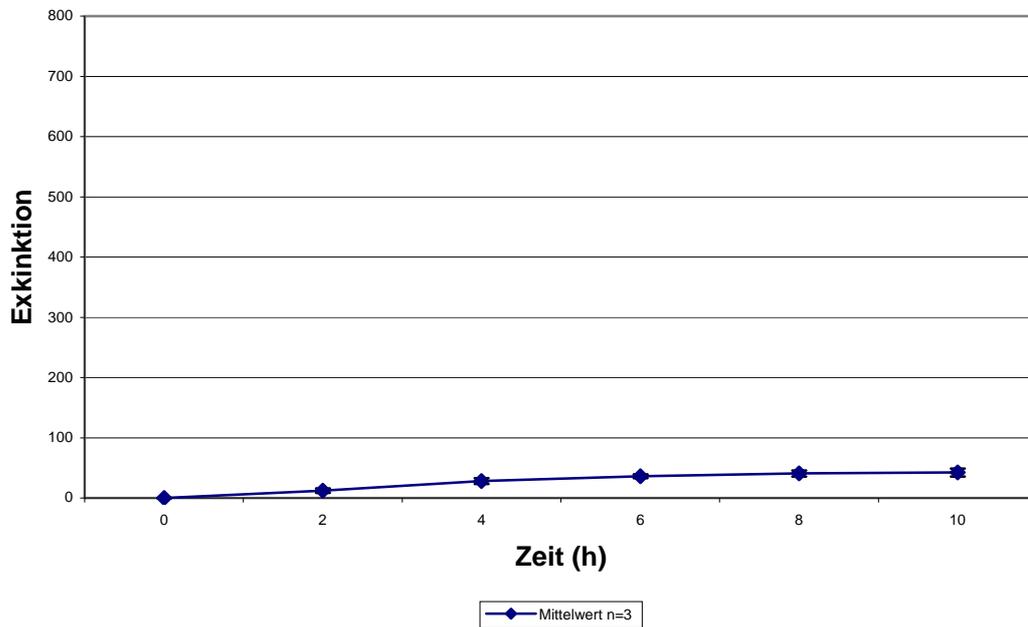


Abbildung 21: Extinktion bei Verwendung von 15 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Die Abbildung 21 zeigt, dass bei Zugabe von 15 mM GLY und einer Zellmenge von 1 Mio. die Werte der Extinktion nur gering ansteigen. Makroskopisch zeigt sich keine bräunliche Verfärbung.

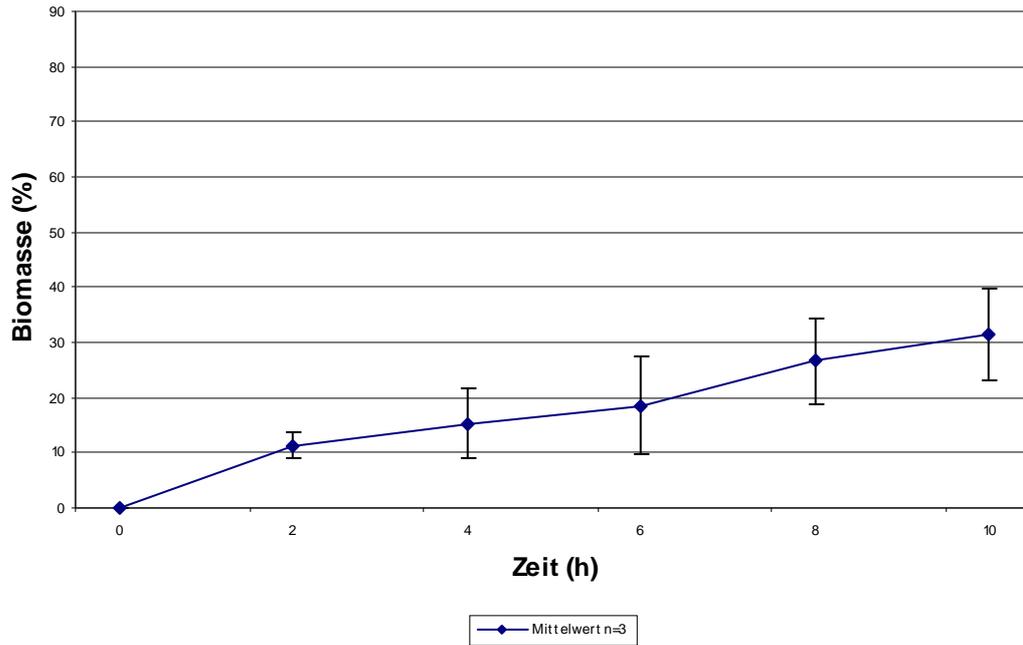


Abbildung 22: Biomassenzunahme bei Verwendung von 15 mM GLY und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 22 ist ein deutlicher Anstieg der Biomasse zu beobachten. Allerdings zeigt sich bei diesem Versuch kein gleichmäßiges Wachstum der Ansätze trotz identischer Zellzahlen.

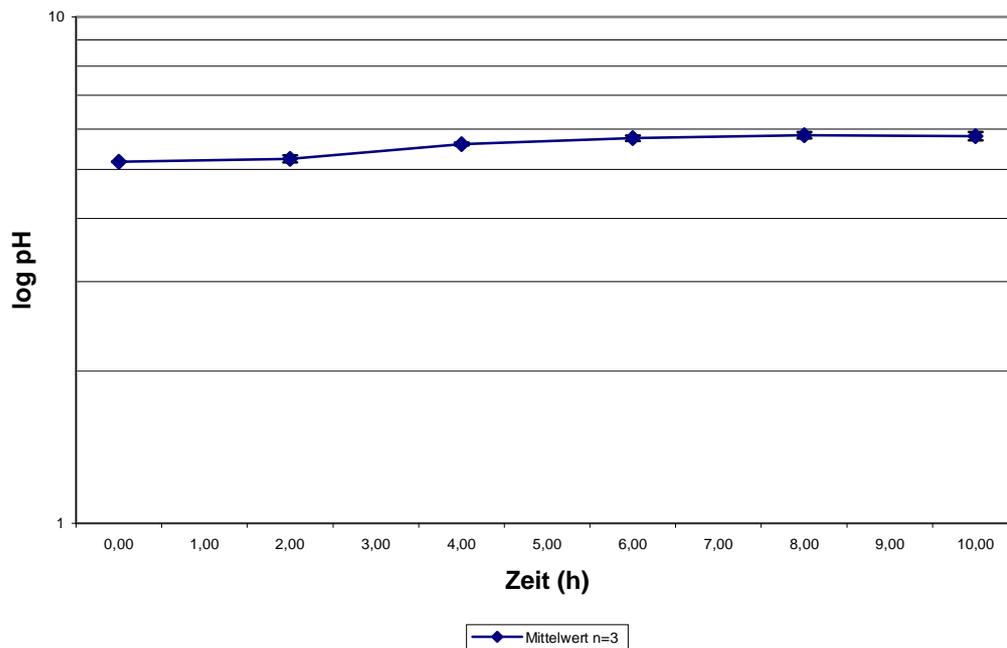


Abbildung 23: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Abbildung 23 zeigt die graphische Darstellung des pH-Wertverlaufs. Es kommt zu einem geringen Anstieg der pH-Werte aller drei Ansätze.

45mM GLY und 1 Mio. Zellen

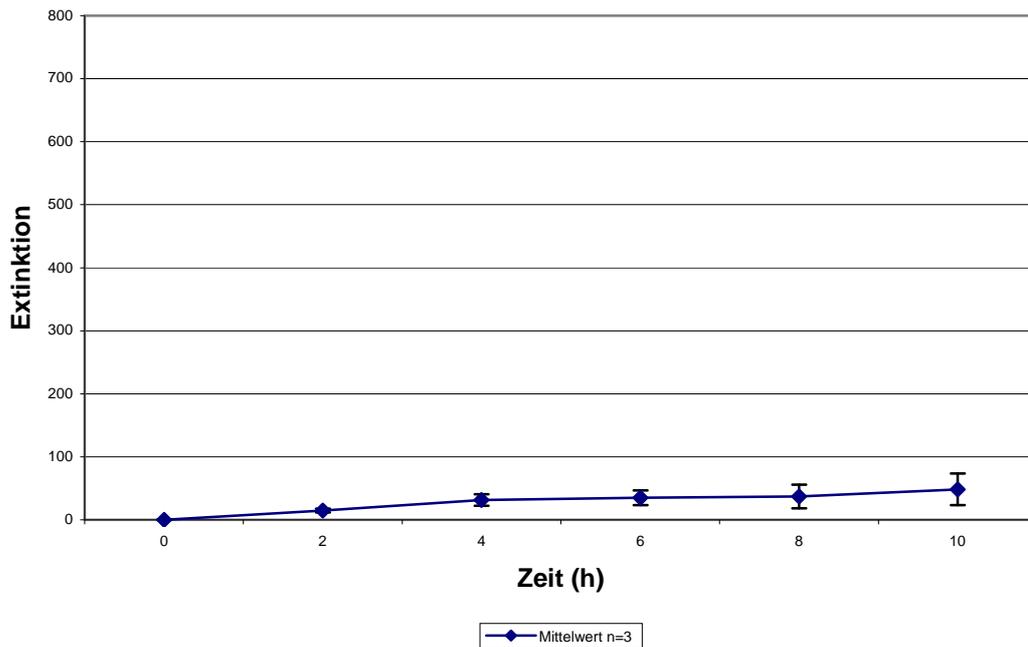


Abbildung 24: Extinktion bei Verwendung von 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Das Extinktionsdiagramm in der Abbildung 24 lässt keine makroskopische Pigmentsynthese erkennen. Die Extinktionswerte steigen nur sehr gering an

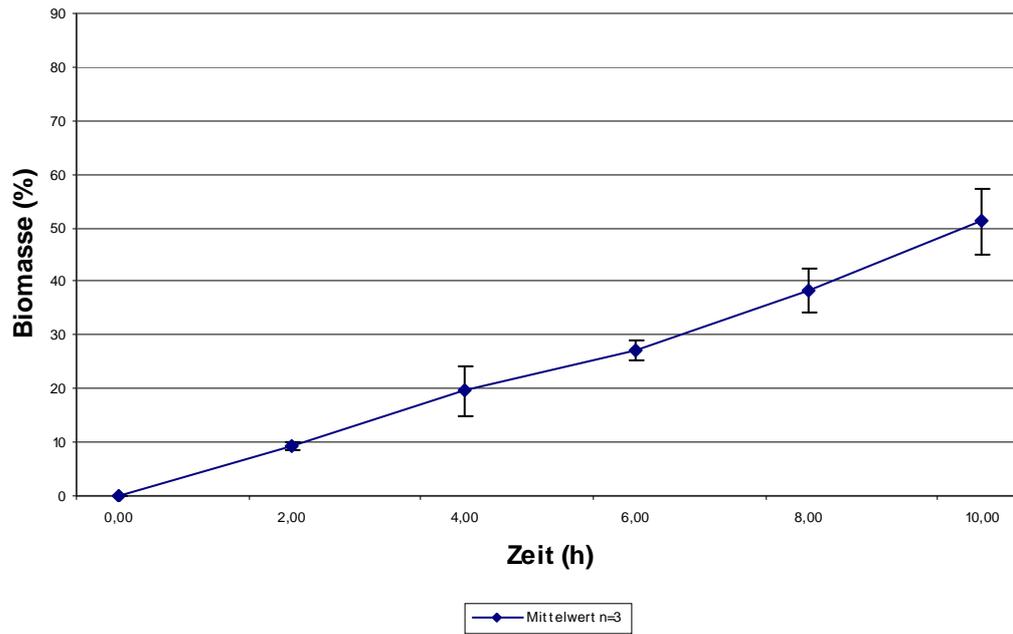


Abbildung 25: Biomassenveränderung bei Verwendung von 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Bei dem Versuch in Abbildung 25, bei dem 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen verwendet wurden, lässt sich eine lineare Zunahme der Biomasse erkennen.

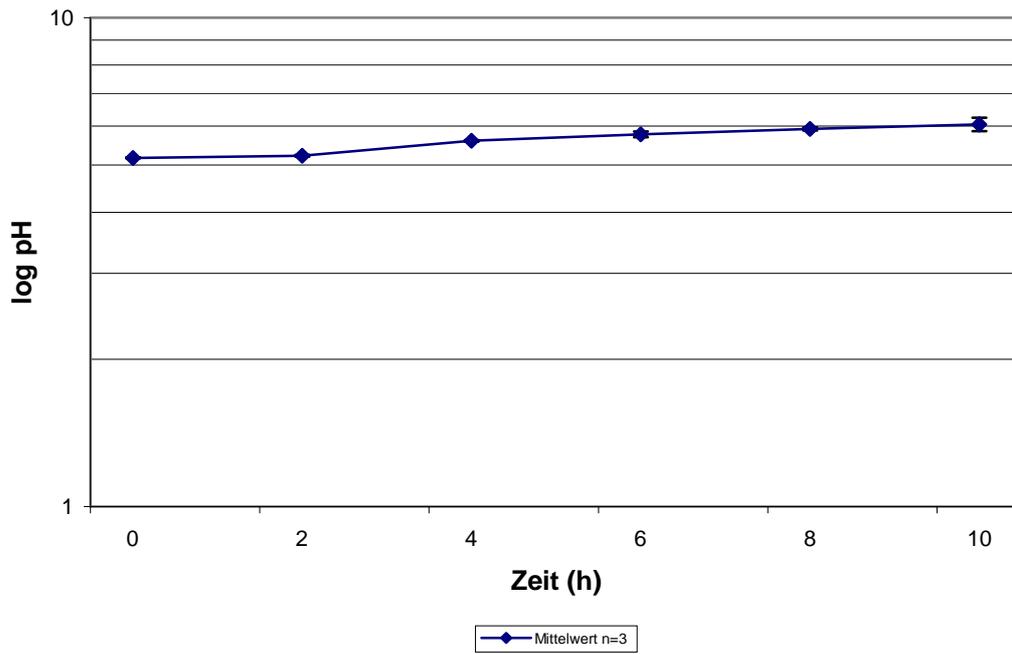


Abbildung 26: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen

In der Abbildung 26 ist der für die GLY-Versuche charakteristische geringe pH-Wertanstieg in allen drei Ansätzen zu beobachten.

4.2.1.2 TRP-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Konzentration

15 mM TRP und 1 Mio. Zellen

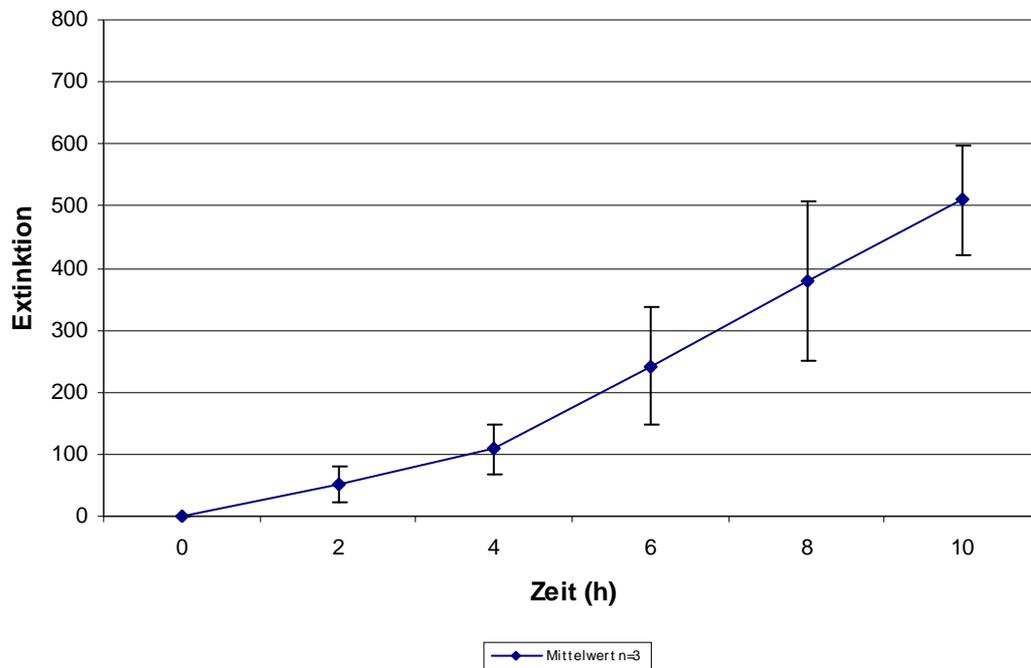


Abbildung 27: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 27 sind beinahe exponentiell verlaufende Extinktionskurven bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen zu sehen. Bei diesem Versuch fällt die intensive Pigmentbildung auf, die auch makroskopisch zu beobachten ist.

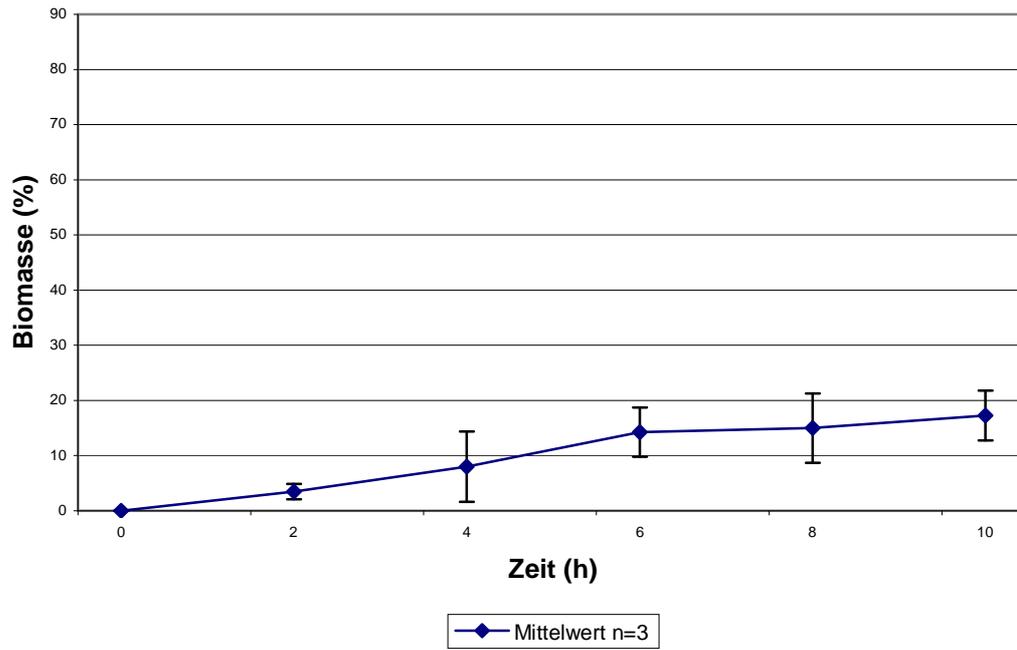


Abbildung 28: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 28 ist ein Anstieg der Biomasse zu erkennen, der für den Versuch mit TRP überraschend stark ist.

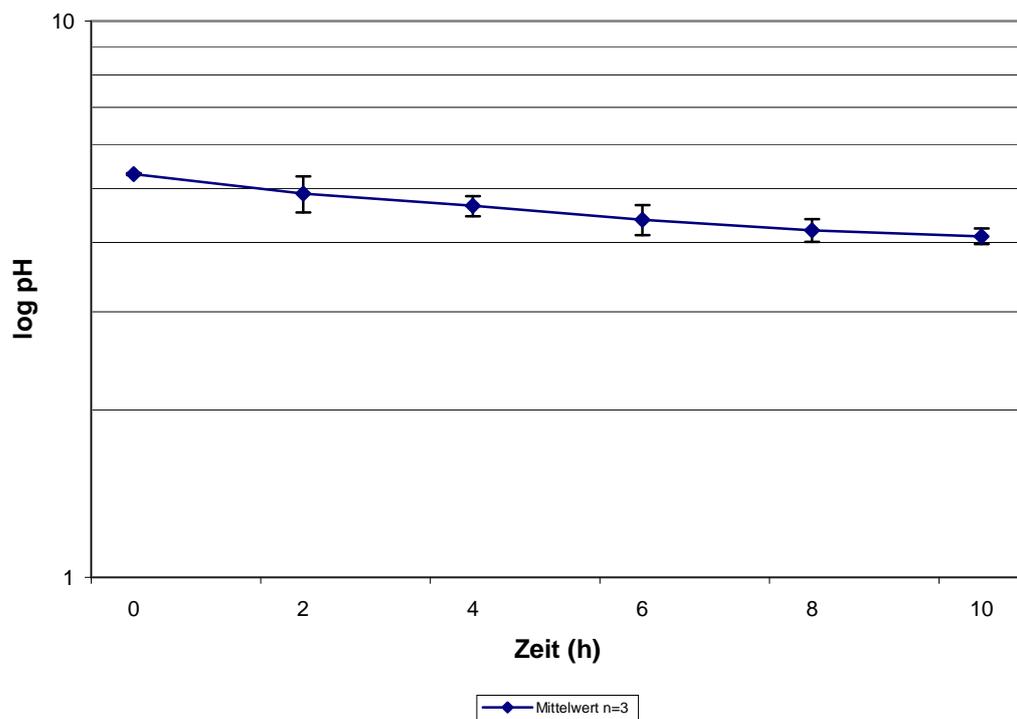


Abbildung 29: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen

In der Abbildung 29 ist der Verlauf des pH-Wertes gezeigt. Zu erkennen ist ein beinahe linearer Abfall fast aller Kurven, der mit der Pigmentbildung einhergeht.

30 mM TRP und 1 Mio. Zellen

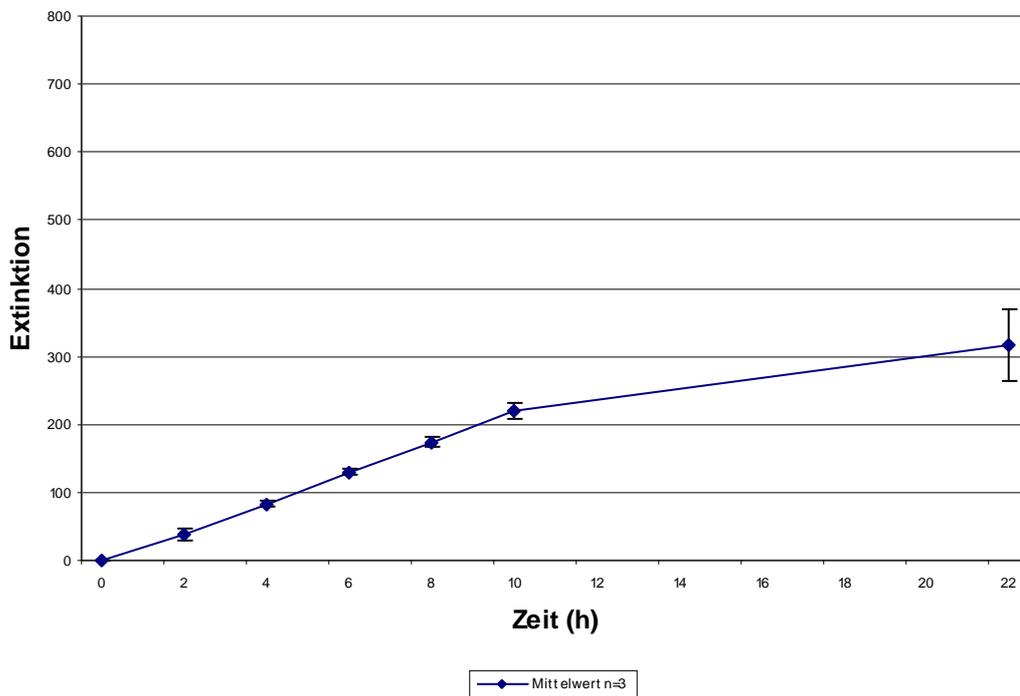


Abbildung 30: Extinktion bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen

Abbildung 30 zeigt, dass bei der Zugabe von 1 Mio. Zellen und 30 mM TRP ein deutlicher Anstieg der Extinktion zu beobachten ist. Zudem ist eine deutliche Pigmentsynthese makroskopisch zu erkennen (Abbildung 31).



Abbildung 31: Makroskopischer Verlauf der Pigmentsynthese bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen

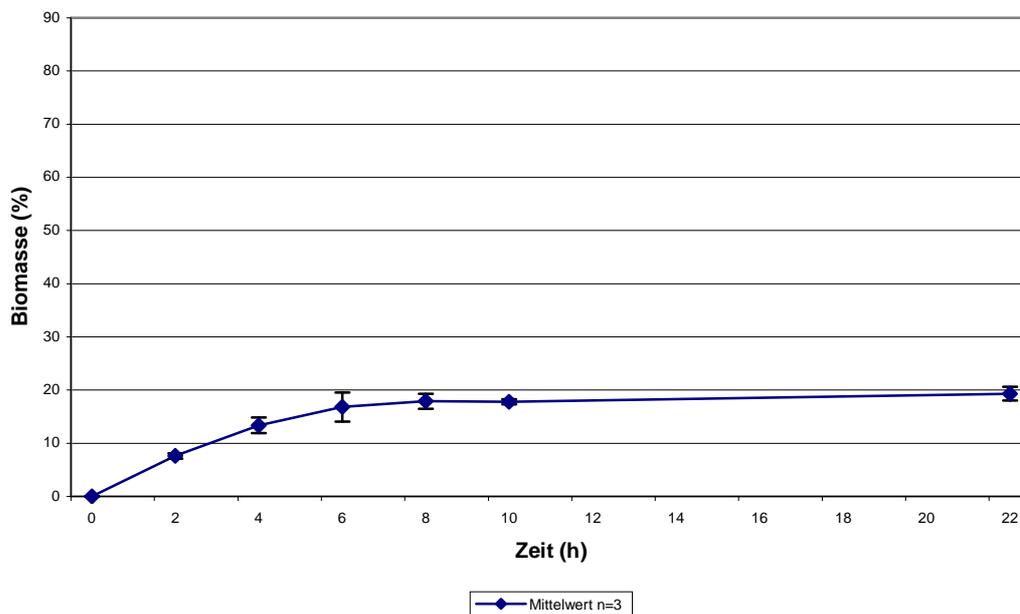


Abbildung 32: Biomassenveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 32 ist ein regressives Wachstum von *M. furfur* zu erkennen. Nach 8 h kommt es zu keiner Veränderung der Wachstumsrate mehr, ein Wachstumsplateau ist erreicht.

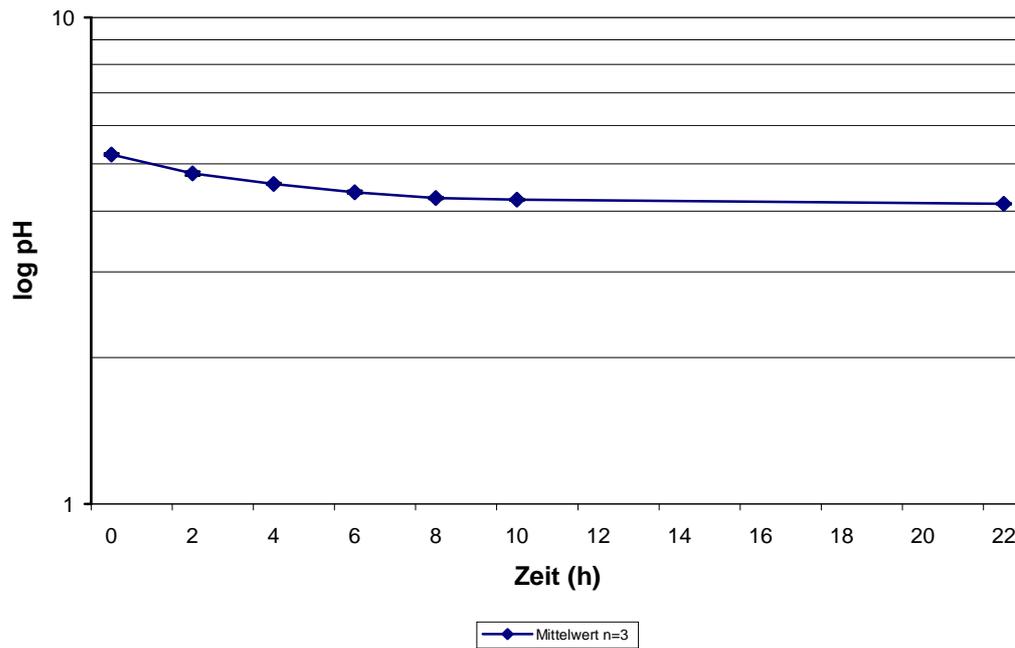


Abbildung 33: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen

In der Abbildung 33 ist die graphische Darstellung der Veränderungen des pH-Werts bei Verwendung von 1 Mio. Zellen und 30 mM TRP zu sehen. Zu erkennen ist der Abfall des pH-Werts, wie er typisch für die Versuche mit TRP bei Pigmentbildung ist.

30 mM TRP und 250.000 Zellen

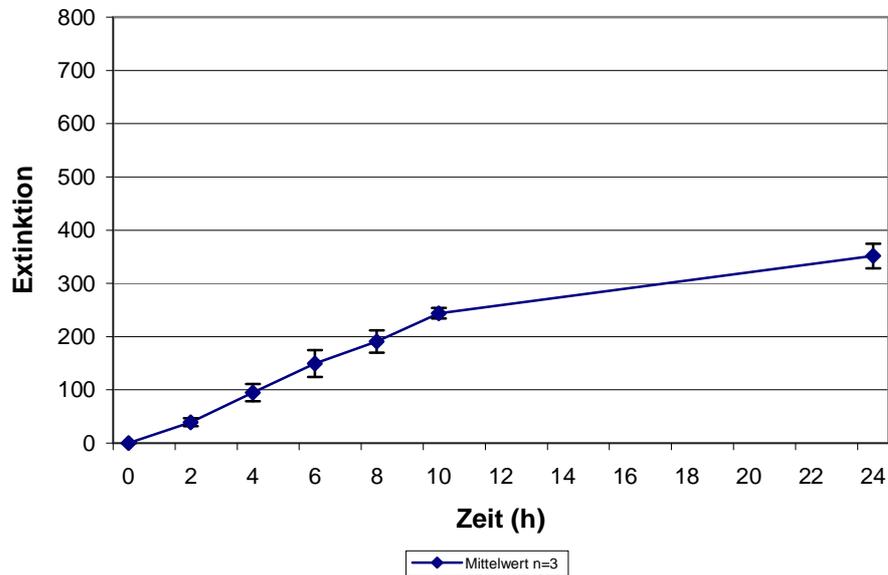


Abbildung 34: Extinktion bei Verwendung von 30 mM TRP und 250.000 Zellen

In Abbildung 34 ist bei Zugabe von 30 mM TRP und 250.000 Zellen ein linearer Anstieg der Extinktionskurven sichtbar, der ab der 10. Stunde abflacht. Makroskopisch ist eine rotbräunliche Verfärbung der Ansätze zu sehen.

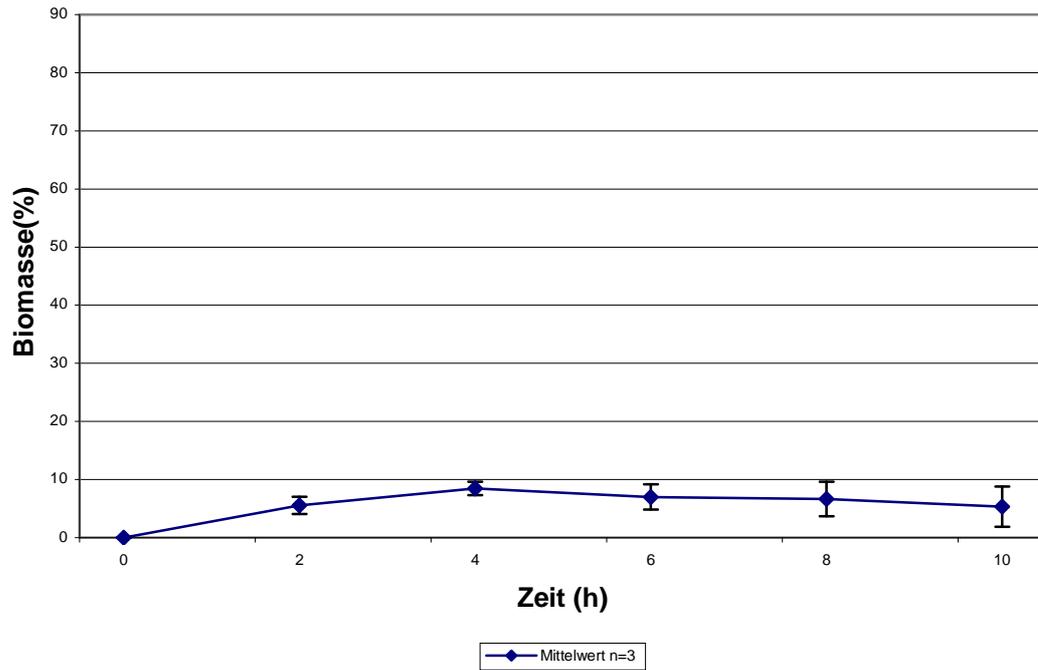


Abbildung 35: Biomassenveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 250.000 Zellen

In der Abbildung 35 zeigt die Wachstumskurve einen geringen Anstieg in den ersten vier Stunden, der dann aber stagniert und sogar teilweise rückläufig ist. Es besteht nur ein schwaches Wachstum der Hefen.

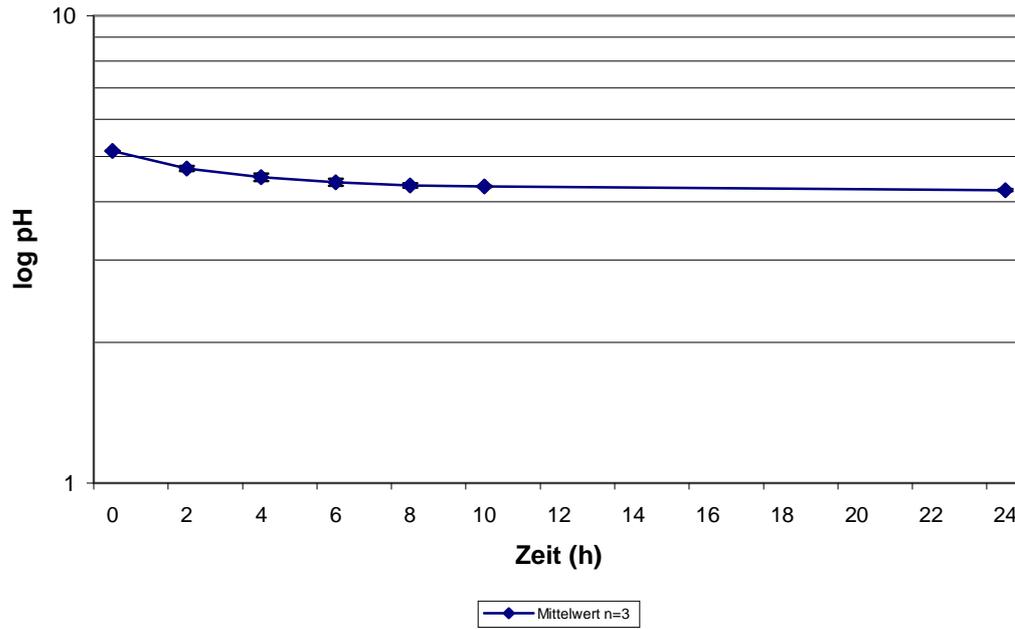


Abbildung 36: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 250.000 Zellen

In der Abbildung 36 ist der zeitliche Verlauf des pH-Werts bei Verwendung von 250.000 Zellen und 30 mM TRP zu sehen. Es kommt zu einem deutlichen Abfall der Kurven. Dieser Abfall geht einher mit der Bildung von Pigment in allen drei Ansätzen.

45 mM TRP und 500.000 Zellen

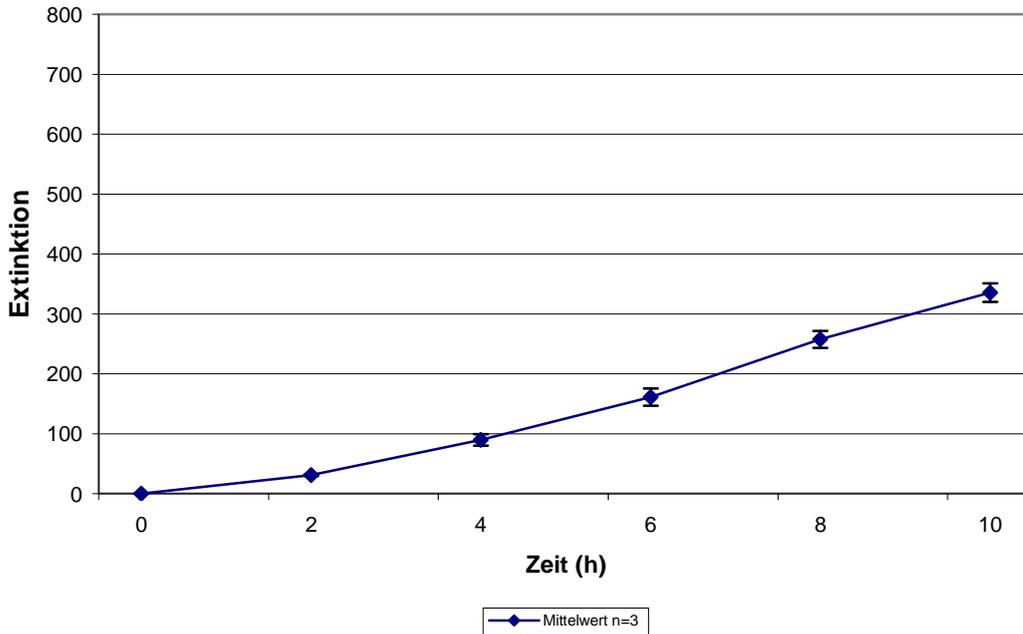


Abbildung 37: Extinktion bei Verwendung von 45 mM TRP und 500.000 Zellen

Die Abbildung 37 zeigt den Versuch mit 45 mM TRP und 500.000 Zellen. Zu sehen ist ein fast exponentieller Anstieg der Mittelwerte der Extinktionen. Makroskopisch lässt sich die Zunahme der Extinktion anhand der ansteigenden rötlich-braunen Verfärbung aller Ansätze nachvollziehen.

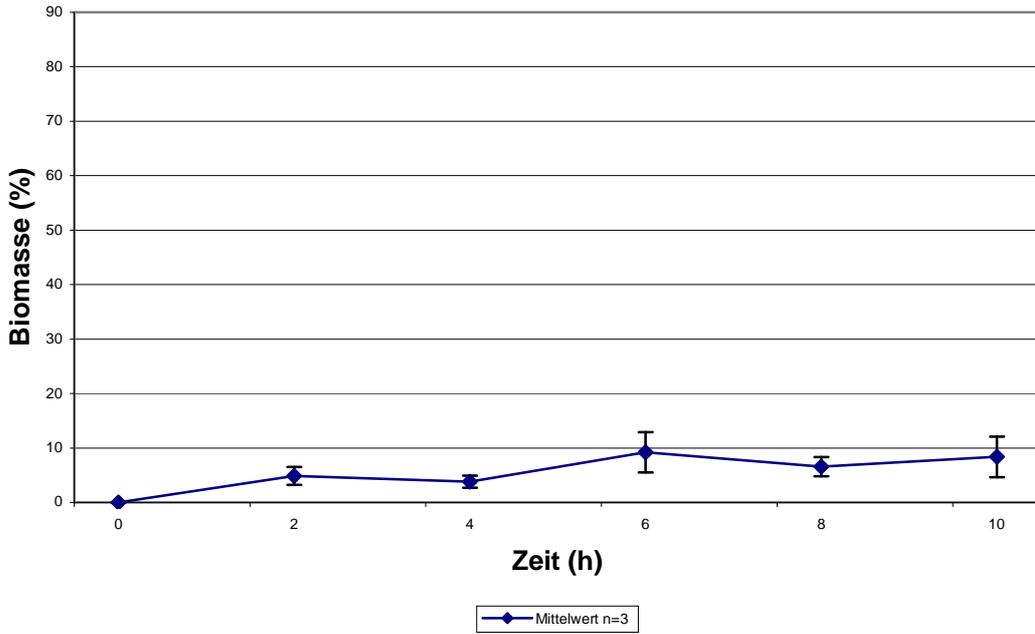


Abbildung 38: Biomassenveränderungen bei Verwendung von 45 mM TRP und 500.000 Zellen

Abbildung 38 zeigt die Wachstumskurve. Hierbei ist nur eine geringe Zunahme der Biomasse, also nur ein schwaches Wachstum zu beobachten.

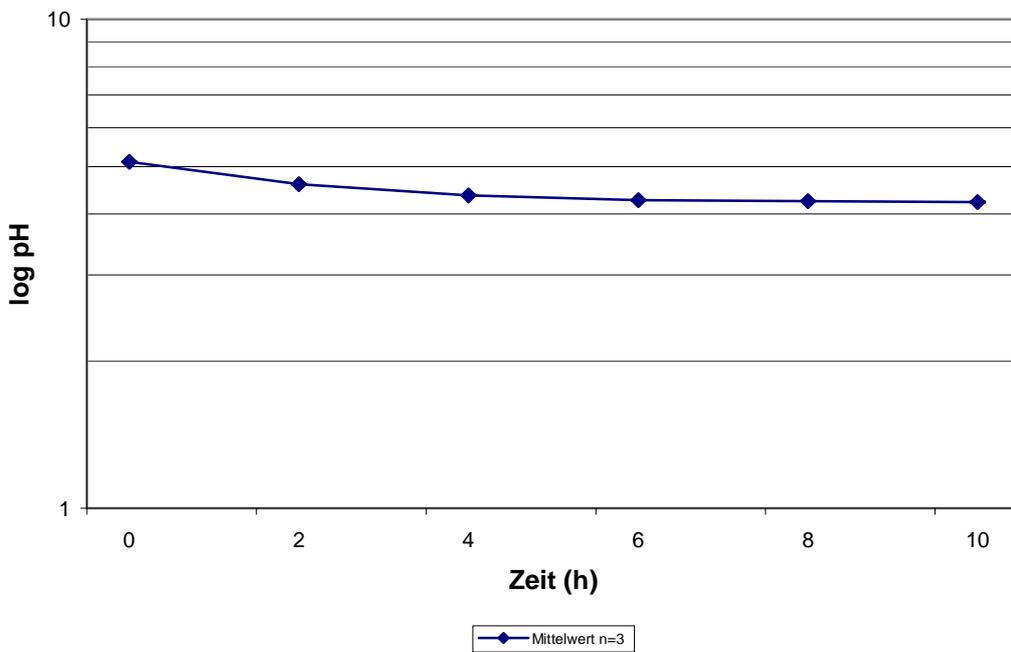


Abbildung 39: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 45 mM TRP und 500.000 Zellen

In der Abbildung 39 ist der charakteristische Abfall des pH-Werts zu erkennen, der mit der Pigmentsynthese einhergeht.

4.2.1.3 TRP-Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Zellzahl

Die Versuche mit TRP als alleinige Stickstoffquelle zeigen schon nach kurzer Zeit makroskopisch, aber auch bei den Messungen im Spektralphotometer, eine deutliche Pigmentsynthese. Durch Variation der TRP-Konzentration und der Zellmenge kann im gewissen Rahmen eine Vermehrung der Pigmentbildung erreicht werden.

Ein starkes Zellwachstum wie bei der alleinigen Gabe von GLY kann nicht beobachtet werden.

Bei den Messungen im Spektralphotometer, die Werte über 1,0 E ergeben, werden die Proben ausreichend verdünnt, bis die Messergebnisse unter diesem Wert liegen. Die Ergebnisse der entsprechenden integrierten Kurven werden schließlich mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

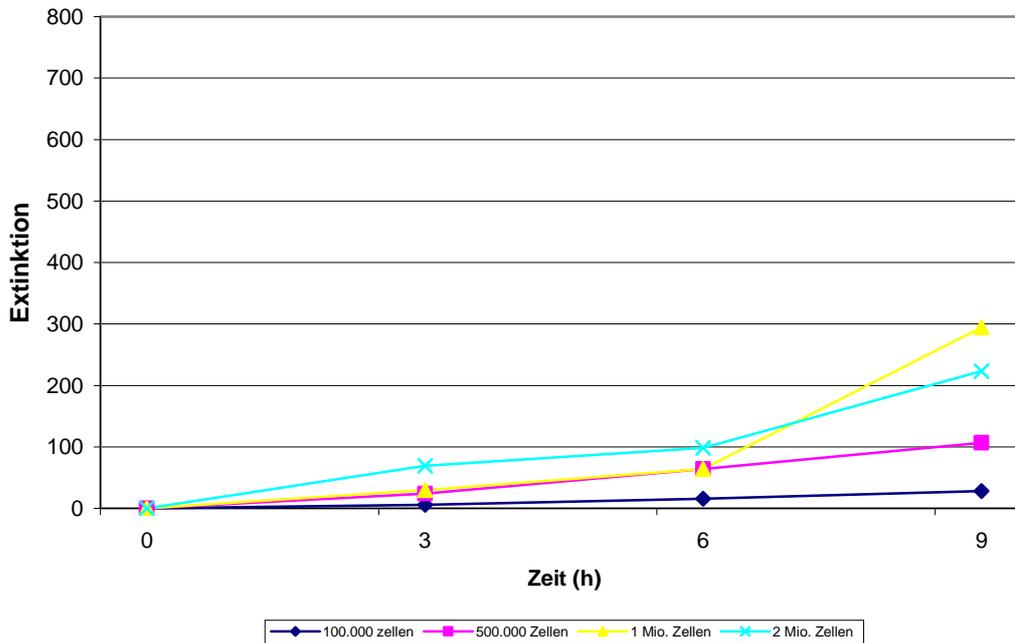


Abbildung 40: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

In der Abbildung 40 ist die Extinktionsgraphik eines Versuchs zu sehen, bei dem 15 mM TRP und 100.000/500.000/1 Mio./2 Mio. Zellen verwendet wurden. Die Pigmentbildung war sowohl spektralphotometrisch als auch makroskopisch zu beobachten. In diesem Versuch, der nur 9 h lief und die Probenentnahmen nur alle 3 h stattfanden, ist zu erkennen, dass besonders der Ansatz mit 1 Mio. Zellen hohe Extinktionswerte bzw. eine starke Pigmentbildung aufweist, gefolgt vom Ansatz mit 2 Mio. Zellen, mit 500.000 Zellen und 100.000 Zellen.

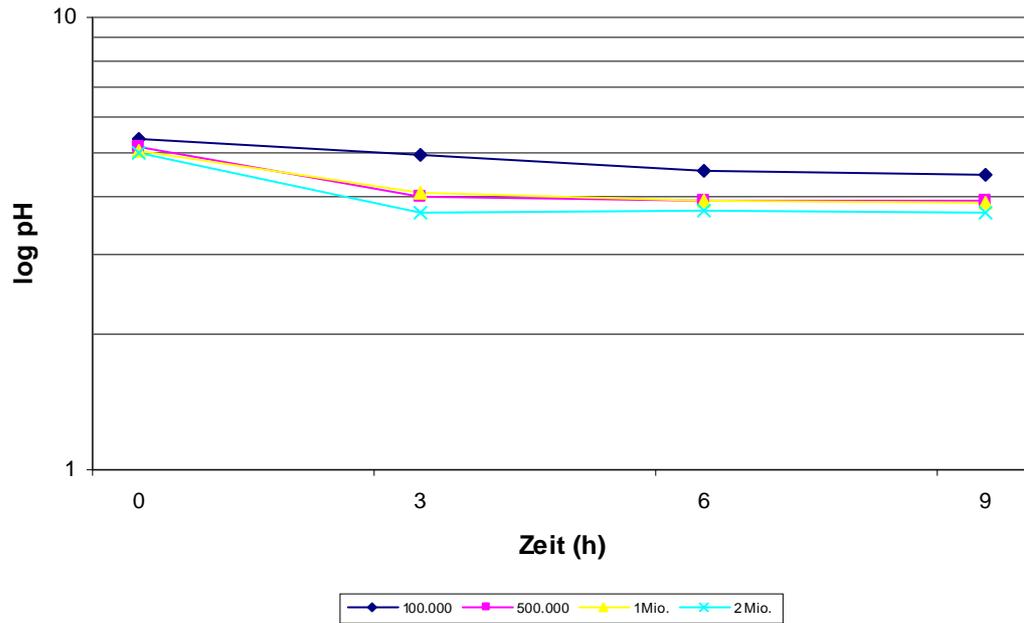


Abbildung 41: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

Bei der Abbildung 41 erkennt man ein Absinken der pH-Werte aller vier Ansätze, wobei der pH-Wert der Ansätze mit der deutlichsten Pigmentsynthese auch am stärksten abfällt.

15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

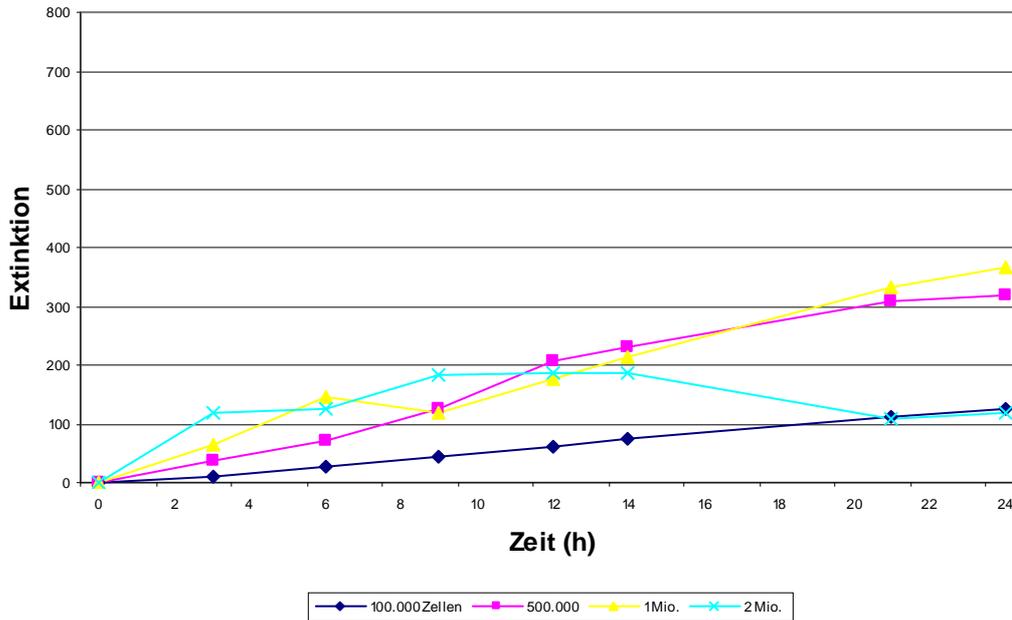


Abbildung 42: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

In Abbildung 42 ist das Diagramm der Extinktionen bei Verwendung von 15 mM Trp und verschiedenen Zellzahlen zu sehen. Die Zellzahlen der einzelnen Ansätze betragen 100.000, 500.000, 1 Mio. und 2 Mio. Zellen. Zu erkennen ist besonders der Anstieg der Pigmentbildung in den Versuchskolben mit 500.000 und 1 Mio. Zellen, aber auch mit 2 Mio. Zellen bis zur 10. Stunde. Bei Verwendung von 2 Mio. Zellen kommt es hier nach 14 h sogar zu einem Abfall der Extinktionswerte. Die Extinktion des Ansatzes mit 500.000 Zellen liegt nach 24 h sogar über der des Ansatzes mit 1 Mio. Zellen. Bei Verwendung von 100.000 Zellen steigt zwar die Kurve linear an, bleibt aber deutlich hinter den höheren Zellzahlen zurück.

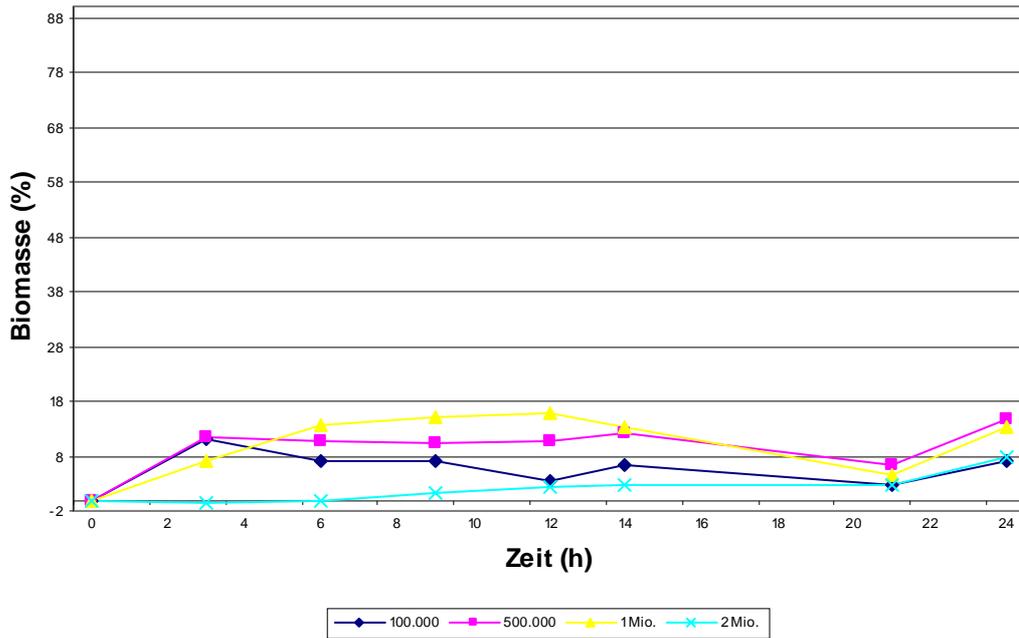


Abbildung 43: Biomassenveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

Die Wachstumskurven in Abbildung 43 zeigen leichte Zunahmen der Biomassen, wobei aber vor allem der Ansatz mit 2 Mio. Zellen kaum Wachstum zu verzeichnen hat.

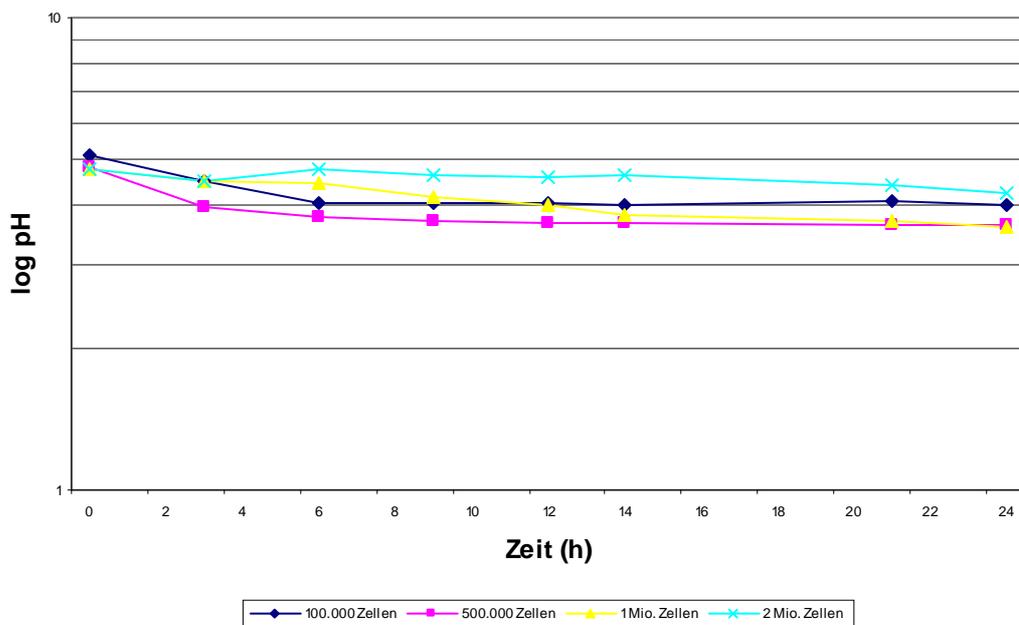


Abbildung 44: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

Abbildung 44 zeigt den 24h-Verlauf der pH-Werte. Ein Abfallen der Kurve ist bei allen vier Ansätzen zu sehen. Der pH-Wert des Ansatzes mit 2 Mio. Zellen fällt allerdings nur sehr gering ab. Bei den Ansätzen mit der höchsten Extinktion, also der stärksten Pigmentbildung, kommt es auch zum stärksten Abfall.

4.2.1.4 Versuchsreihen mit TRP und GLY in Abhängigkeit von der Konzentration in einem Diagramm

15 mM TRP / GLY und 1Mio. Zellen

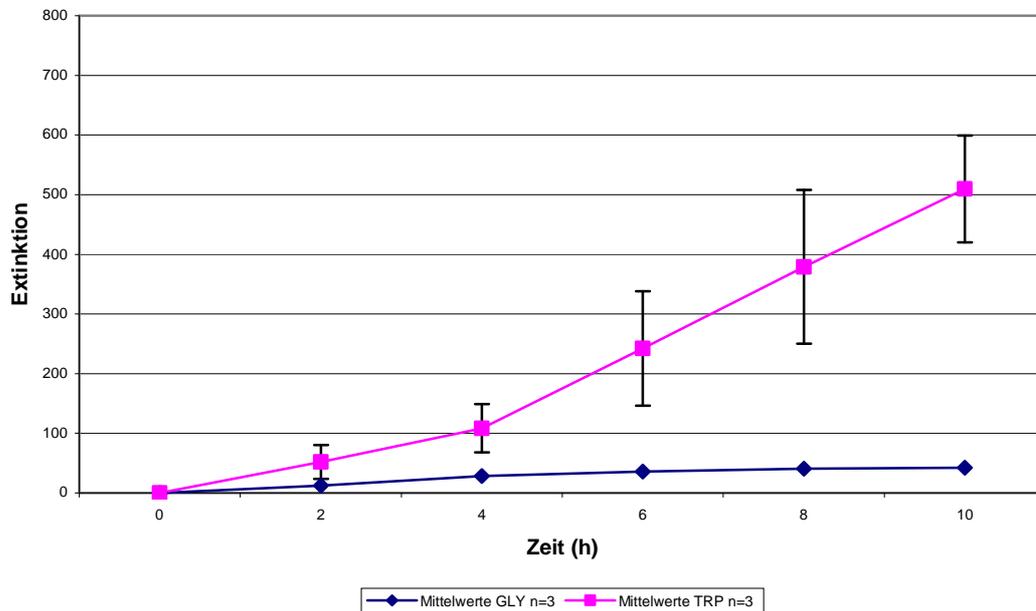


Abbildung 45: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen

Die Abbildung 45 zeigt die Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen. Ab der 8. Stunde ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Extinktion bei Verwendung von TRP und GLY nach 10 h zu erkennen ($p < 0,05$). Bei dem Versuch mit TRP ist ein deutlicher Anstieg der Extinktion als Hinweis auf Pigmentbildung zu sehen.

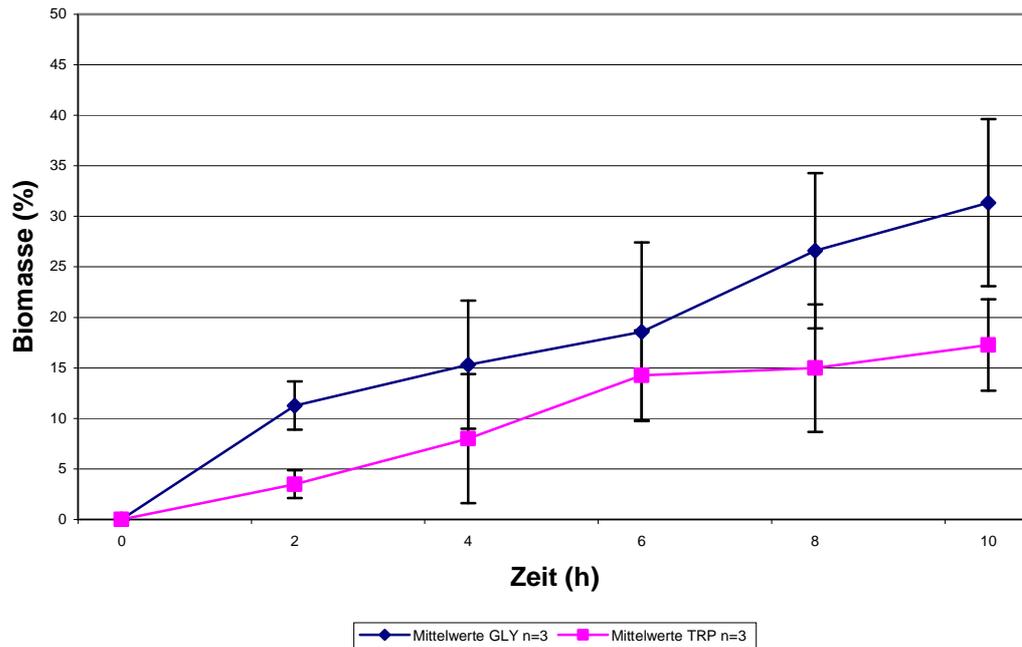


Abbildung 46: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen

Abbildung 46 zeigt die Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen. Nach 6 h ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem Biomassen zu erkennen ($p < 0,05$). Die Versuchsreihe mit GLY zeigt im Vergleich zu TRP eine stärkere Biomassenzunahme.

4.2.2 Hauptversuche mit zwei Aminosäuren

Die Vorversuche mit GLY beziehungsweise TRP als alleiniger Stickstoffquelle zeigen, dass es nur bei Verwendung von TRP zu einer makroskopisch und spektralphotometrisch nachweisbaren Bildung von Pigmenten kommt. Andererseits ist eine reduzierte Wachstumsrate bei TRP-Gabe im Vergleich zur GLY-Gabe zu erkennen. Für die weiteren Versuche scheinen vor allem Aminosäurekonzentrationen von 15 mM, beziehungsweise 30 mM interessant zu sein. Zellzahlen von 1 Mio. / μl sind für die Pigmentbildung und das Wachstum besonders geeignet, allerdings konnten, auf Grund der schwer vorher abschätzbaren Zellzahlgewinnung beim Abernten der Agar-Platten, diese Zahlen nicht immer eingehalten werden.

In den Hauptversuchen mit Kombinationen aus beiden Aminosäuren, GLY und TRP, soll nun die Situation auf der Haut nachgeahmt werden.

4.2.2.1 Versuchsreihen mit zeitgleicher Gabe von TRP und GLY

15 mM TRP, 15 mM GLY und je 7,5 mM GLY und TRP und je 500.000 Zellen

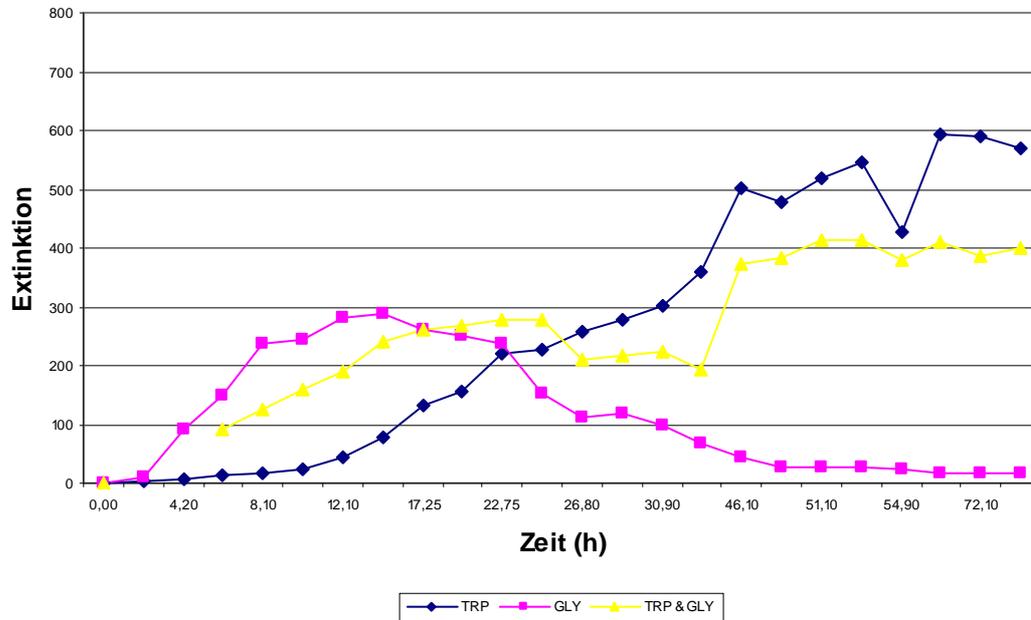


Abbildung 47: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP und GLY und je 500.000 Zellen

Die Abbildung 47 zeigt die Extinktion bei Verwendung von 500.000 Zellen sowie 15 mM TRP, 15 mM GLY und je 7,5 mM TRP und GLY. Der Versuch erfolgte, ohne Filtration der Proben und ohne Verwendung eines Watteträgers, zu einem frühen Stadium der Entwicklung eines geeigneten Versuchsaufbaus. Die Bildung der Stearinkristalle und das eventuelle Abtragen von Dixon-Agar sind hier also nicht berücksichtigt. So zeigt die graphische Darstellung der Pigmentsynthese einen starken anfänglichen Anstieg der Extinktion der Ansätze mit GLY, während der Ansatz nur mit TRP, erst nach 10 Stunden einen Anstieg aufweist. Etwa ab der 22. Stunde übersteigt die Extinktion in den Ansätzen mit TRP die des Ansatzes nur mit GLY. Zum Ende des Versuchs ist die Kurve nur mit GLY stark abgesunken, während die Kurven mit TRP deutlich stärker verfärbt sind.

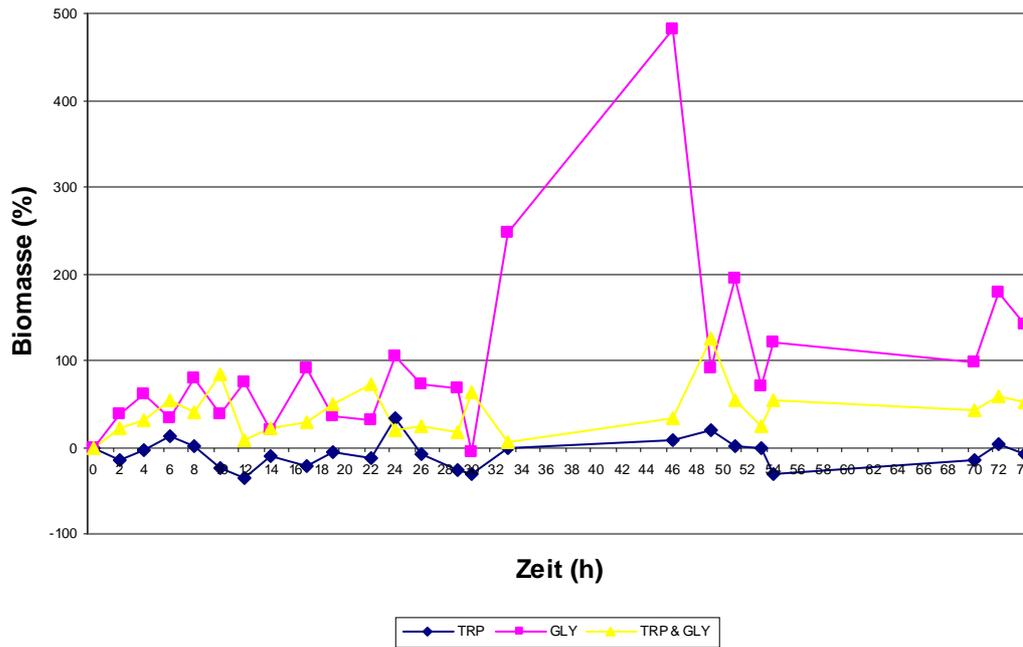


Abbildung 48: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP und GLY und 500.000 Zellen

Die Abbildung 48 zeigt den Zellzuwachs in den drei Ansätzen. Hier wurde das Zellgewicht noch in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zu erkennen ist ansatzweise ein Trend. So zeichnet sich ab, dass der Biomassenzuwachs bei alleiniger Verwendung von GLY am höchsten ist, gefolgt vom Ansatz mit TRP und GLY. Im Ansatz allein mit TRP ist dagegen keine Biomassenzunahme zu sehen.

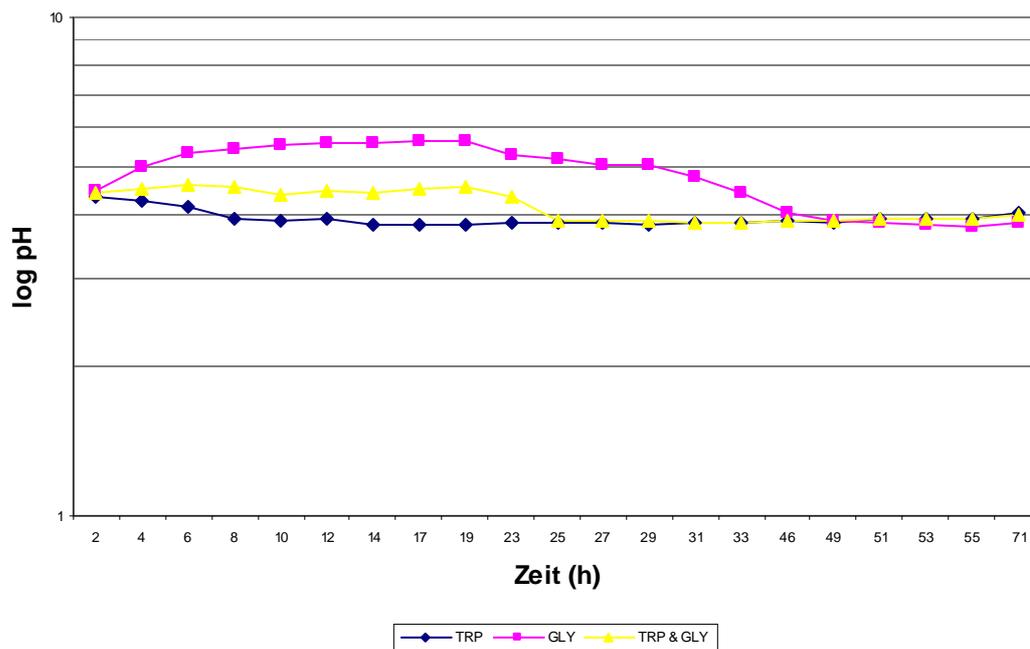


Abbildung 49: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP und GLY und je 500.000 Zellen

Die graphische Darstellung des pH-Wertverlaufs in Abbildung 49 zeigt einen schnellen Abfall im Ansatz nur mit TRP. Der Ansatz mit beiden Aminosäuren bleibt anfänglich stabil, fällt aber ab etwa der 23. Stunde ebenfalls ab. Beim Ansatz mit GLY steigt der pH-Wert sogar zu Beginn, erreicht aber zur 46. Stunde das Niveau der beiden anderen Ansätze.

15 mM TRP / 15 mM GLY / 7,5 mM TRP und 7,5 mM GLY und 200.000 Zellen

Für diesen Versuch, einer Wiederholung des vorherigen Versuchs, stand leider nur eine sehr kleine Menge an Zellen zur Verfügung, so dass für diese Versuchsreihe nur eine Konzentration von 200.000 Zellen / μl verwendet wurde. Allerdings wurden im Vergleich zum vorherigen Versuch die Proben gefiltert, die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte allerdings immer noch in der Neubauer-Zählkammer.

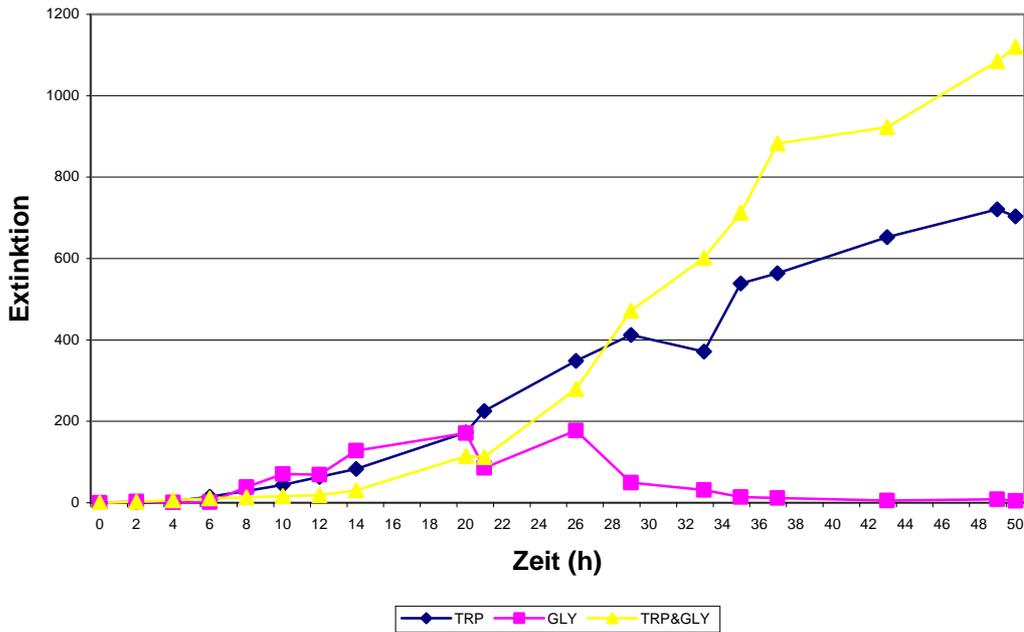


Abbildung 50: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / 7,5 mM TRP und 7,5 mM GLY und 200.000 Zellen (Formatierung der y-Achse geändert, Maximum liegt bei 1200)

In Abbildung 50 ist die Extinktion bei Verwendung von 200.000 Zellen sowie 15 mM TRP, 15 mM GLY und je 7,5 mM TRP und GLY zu sehen. Bei diesem Versuch zeigte sich makroskopisch eine Pigmentbildung in den Ansätzen mit TRP, wobei der Ansatz mit TRP alleine zu Beginn stärker verfärbt war als der mit beiden Aminosäuren. Dies kehrte sich aber etwa ab der 28. Stunde um. Der Anstieg der Extinktionskurve nur mit TRP ist beinahe linear, der mit beiden Aminosäuren fast exponentiell. Beim Ansatz nur mit GLY ist vor allem in den ersten 28 Stunden eine leichte Trübung durch weiße Stearinkristalle zu beobachten. Spektralphotometrisch ist bei diesem Ansatz allerdings kein bedeutender Anstieg festzustellen.

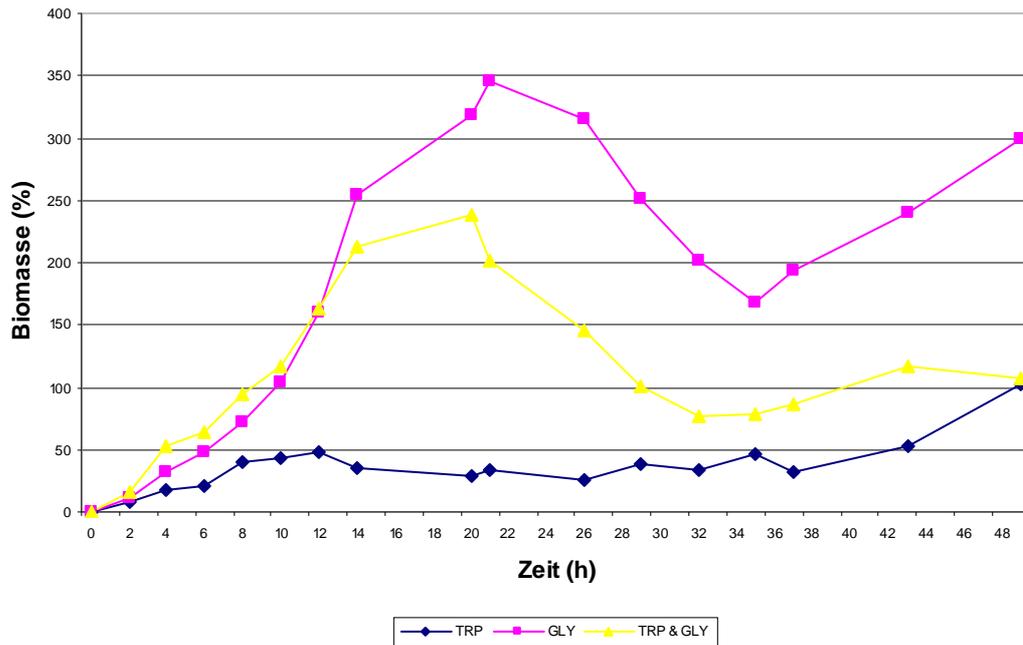


Abbildung 51: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / sowie 7,5 mM TRP und GLY und je 200.000 Zellen (extrapoliert / gleitender Mittelwert)

Die Zellzahlen wurden in der vorliegenden Abbildung 51 in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Methode erwies sich allerdings bei der Probenentnahme und dem enormen Zeitaufwand als nicht praktikabel und wurde so, auch aufgrund der Ungenauigkeit der Ergebnisse, durch die indirekte Methode der Keimzahlbestimmung ersetzt. Das vorliegende Diagramm wurde mit extrapolierten Werten dargestellt. Die Wachstumskurven vom Ansatz mit TRP weisen auf keine großen Veränderungen der Biomasse hin. Anders sieht es dagegen bei den Ansätzen mit GLY-Zugabe aus. Die Biomassen dieser Ansätze steigen stark an, wobei der Ansatz mit 15 mM GLY höhere Zahlen erreicht als der Ansatz mit 7,5 mM GLY und 7,5 mM TRP. Zu beobachten ist weiterhin ein überraschender Abfall dieser beiden Kurven mit einem Tiefpunkt zur 36. Stunde.

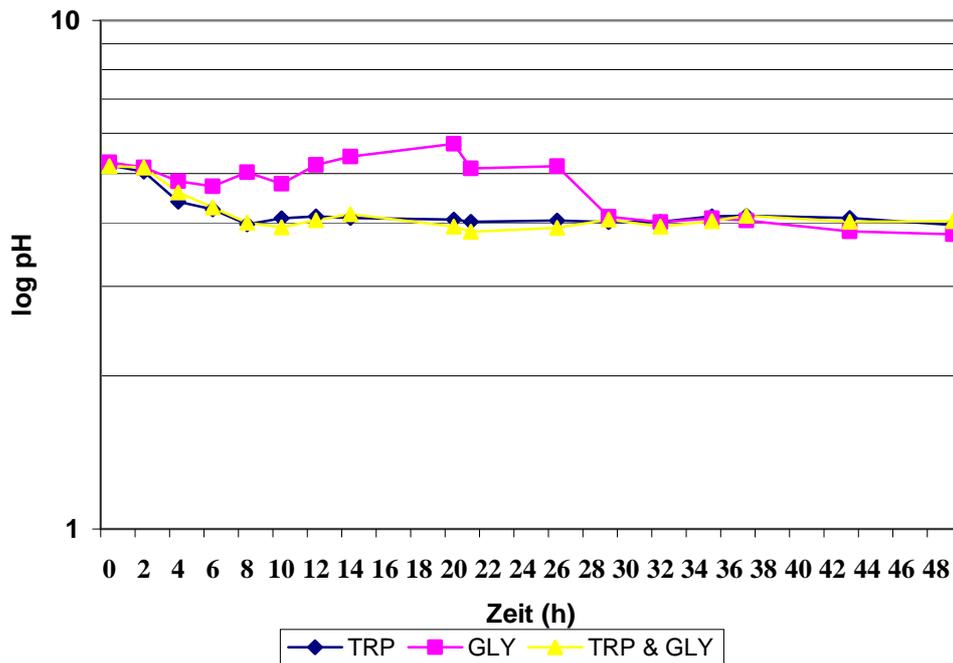


Abbildung 52: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP & GLY und 200.000 Zellen

Auf der Abbildung 52 ist das Verlaufdiagramm der pH-Werte zu sehen. Die pH-Werte der Ansatz mit 15 mM TRP und mit je 7,5 mM GLY und TRP, fallen zu Beginn des Versuchs ab. Beim Ansatz mit 15 mM GLY steigt der pH-Wert im Verlauf zunächst an, sinkt dann ab der 28. Stunde etwa auf das Niveau der beiden anderen Ansätze.

15 mM TRP und 15 mM GLY mit 1 Mio. Zellen

Um die Beobachtungen der vorherigen Versuche zu bestätigen wurde nun eine höhere Menge an Stickstoffquellen verwendet und zur Bestimmung der Biomasse die Methode der indirekten Zellzahlbestimmung gewählt.

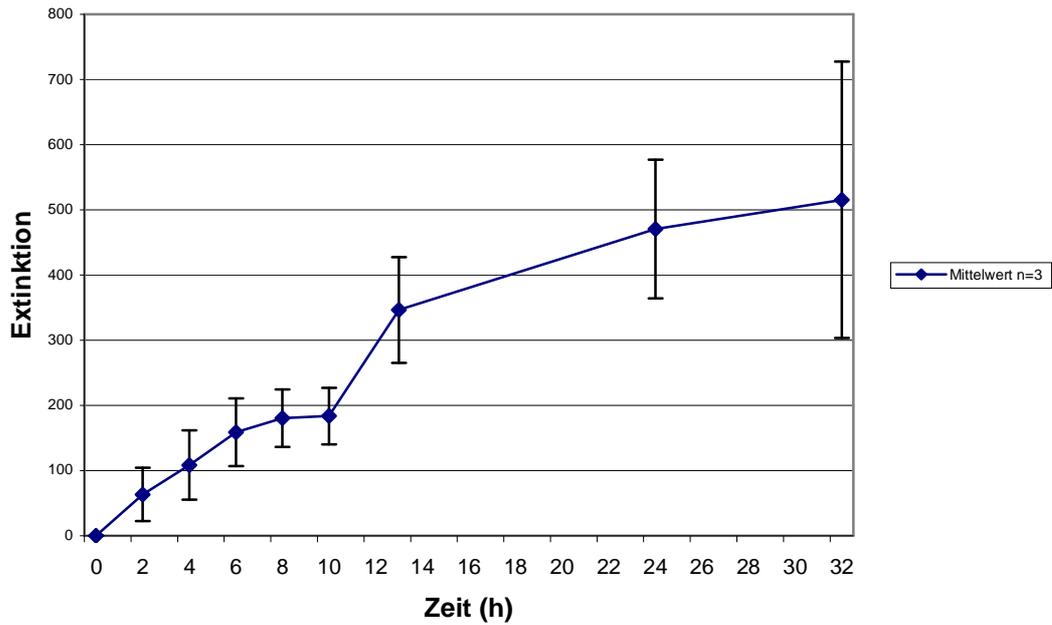


Abbildung 53: Extinktion bei Verwendung von je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen

In der Abbildung 53 sind die Extinktionen bei zeitgleicher Gabe von 15 mM TRP und 15 mM GLY zusammen mit 1 Mio. Zellen zu sehen. Die Gabe der beiden Aminosäuren erfolgt zum Zeitpunkt Null. Auf dem Diagramm ist ein zum späteren Zeitpunkt abgebremster Anstieg der Extinktion bis zur 10. Stunde zu sehen, gefolgt von einem weiteren abgebremsten Anstieg der Kurven. Makroskopisch ist eine deutliche zweite Phase der Pigmentbildung ab der 10. Stunde zu beobachten (Abbildung 54).



Abbildung 54: Pigmentsynthese im makroskopischen Verlauf (ohne Probe der 32. Stunde) bei Gabe von je 15 mM TRP & GLY und 1 Mio. Zellen

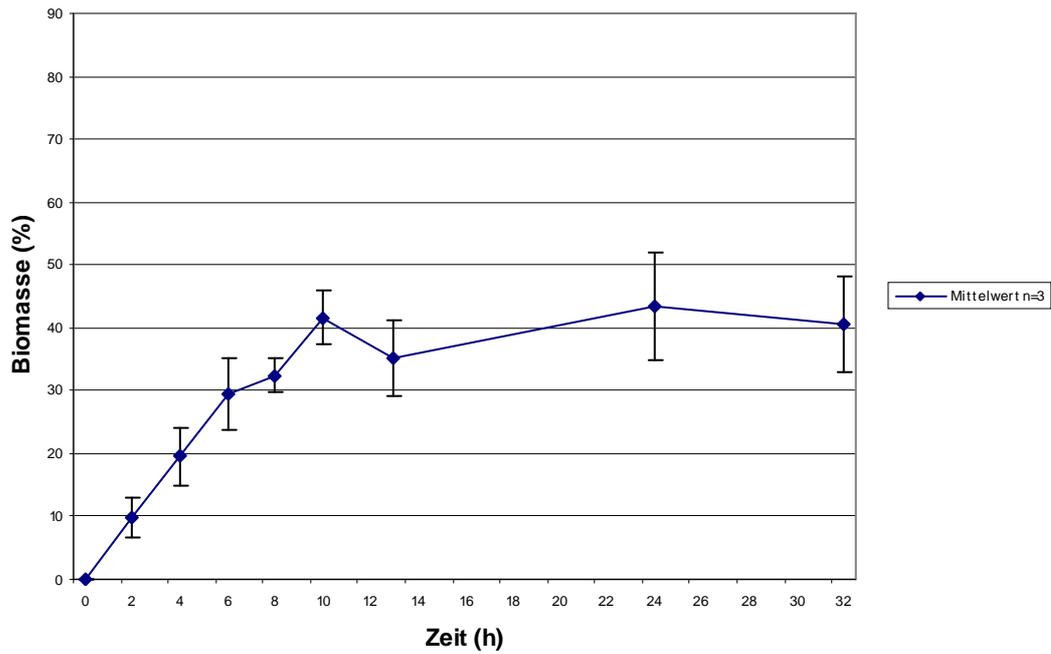


Abbildung 55: Biomassenveränderung bei Verwendung von je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen

Auf der Abbildung 55 ist das Wachstumsdiagramm zu sehen. Ein linearer Anstieg der Biomasse ist bis zur 10. Stunde zu erkennen, danach erreichte die Kurve ein Wachstums-Plateau. Zu diesem Zeitpunkt nimmt auch die Pigmentsynthese im Extinktionsdiagramm zu.

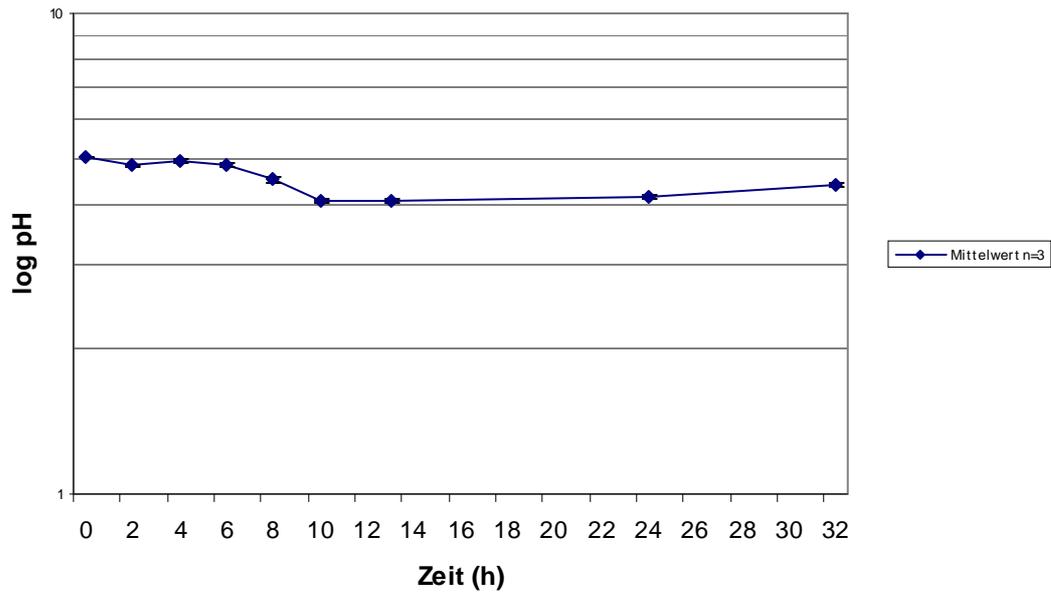


Abbildung 56: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 56 ist das Diagramm der pH-Werte zu sehen. Innerhalb der ersten 10 Stunden fällt der pH-Wert nur langsam ab. Ab der 10. Stunde ist er auf dem tiefsten Wert angelangt. Dieser Zeitpunkt korreliert mit dem Anstieg der Extinktionskurven und dem Stagnieren des Wachstums wie in Abbildung 57 nochmals dargestellt..

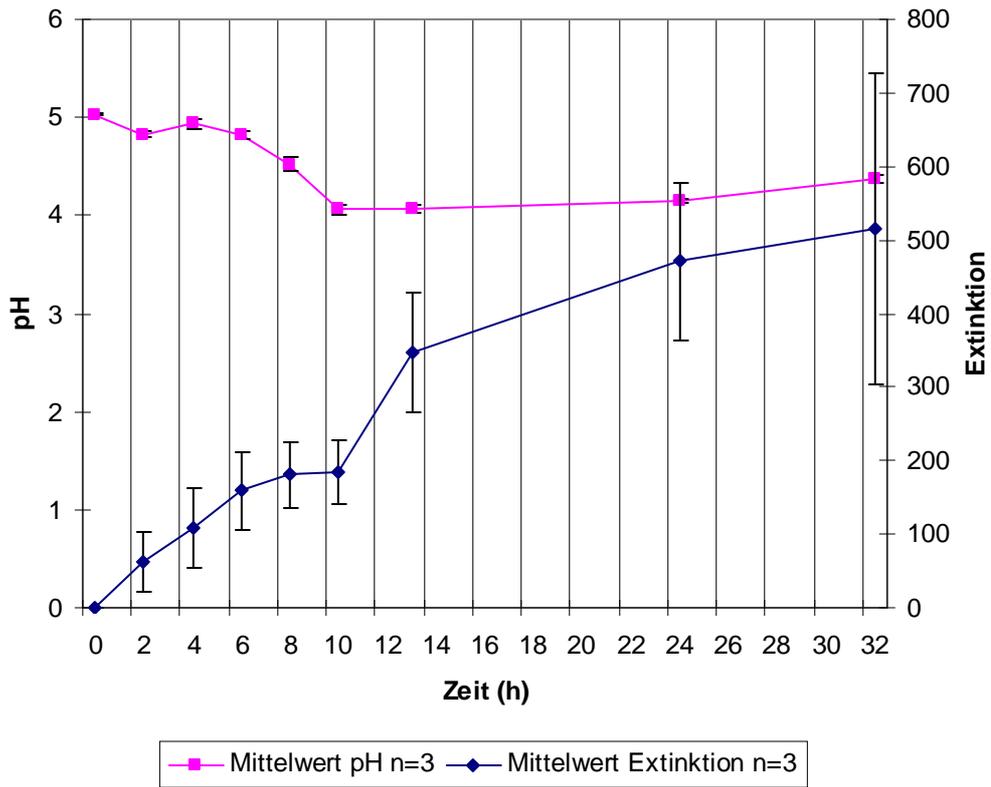


Abbildung 57: pH-Wert und Extinktion mit je 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen

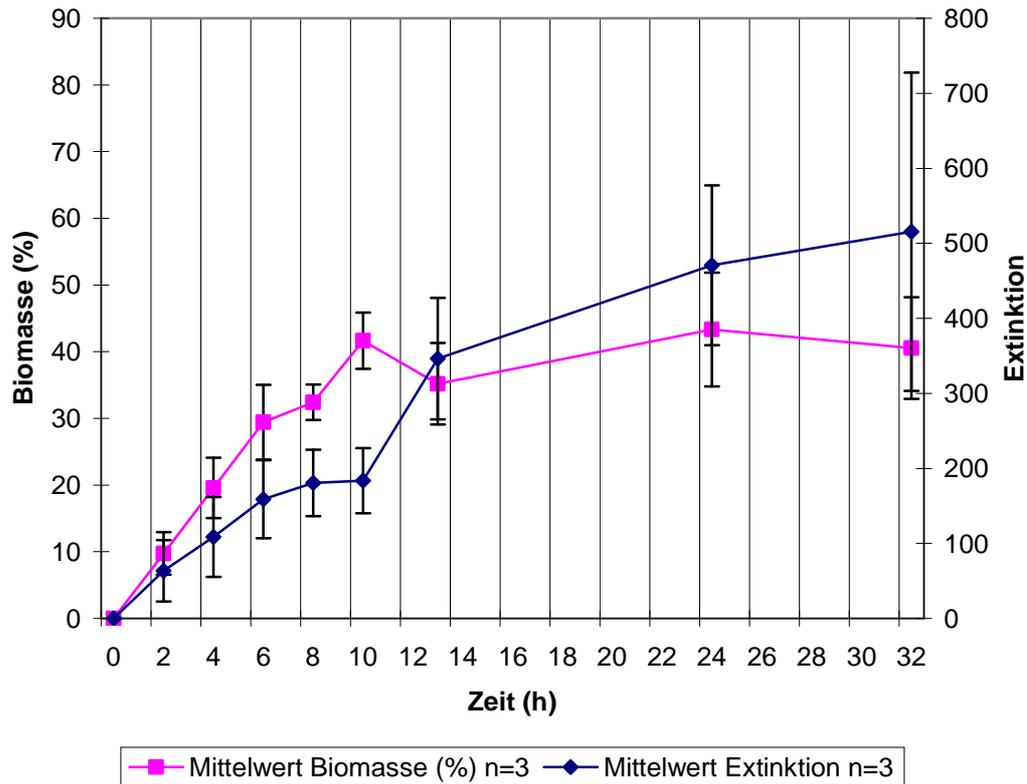


Abbildung 58: Extinktion und Biomassenveränderung bei je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 58 werden gleichzeitig die Mittelwerte der Biomassen und der Extinktionen dargestellt. Auch hier ist ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Abnahme der Wachstumsrate und der Zunahme der Pigmentsynthese zu erkennen. Beide Kurvenänderungen finden in der 10. Stunde nach Versuchsbeginn statt. In diesen Zeitraum fällt auch der Tiefpunkt des pH-Wertabfalls, der in Abbildung 56 zu sehen ist.

4.2.2.2 Versuchsreihen mit TRP und zeitverzögerter GLY-Gabe

Diese Versuchsreihen sollen die Beobachtungen der zeitgleichen Gabe von GLY und TRP bestätigen. Hierfür erfolgte eine zeitverzögerte Zugabe von GLY zu den mit TRP gestarteten Ansätzen, um den Einfluss auf die Parameter – Extinktion, Biomasse und pH-Wert - zu beobachten. Dies erfolgt zu unterschiedlich gewählten Zeitpunkten.

7,5 mM TRP mit 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen

Auch in diesem Versuch konnte die angestrebte Zellzahl von 1 Mio. Zellen auf Grund der geringen Ausbeute beim Abernten der Platten nicht erreicht werden.

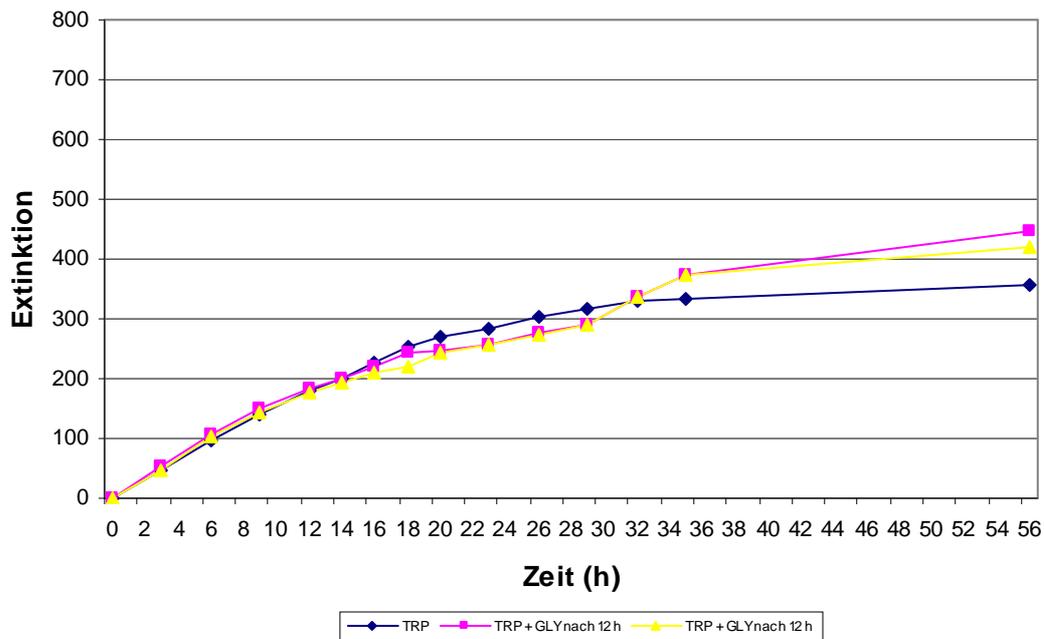


Abbildung 59: Extinktion bei Verwendung von 7,5 mM TRP mit 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen

Abbildung 59 zeigt das Extinktionsdiagramm des Versuchs mit 250.000 Zellen und 7,5 mM TRP, wobei in zwei Ansätze nach 12 Stunden weitere 7,5 mM GLY zugesetzt wurden. Der Anstieg der Kurve sowie die makroskopischen Beobachtungen zeigen eine Pigmentsynthese. Bei den Ansätzen mit zwei Aminosäuren flachen die Kurven ab dem Zeitpunkt der Zugabe von GLY, nach 12 Stunden, leicht ab. Nach 29 Stunden kommt es abermals zu einem Anstieg der Pigmentsynthese dieser beiden Ansätze. Dieser Anstieg verläuft innerhalb von 3 Stunden so stark, dass zur 32. Stunde die Extinktionswerte bereits über dem Ansatz nur mit TRP liegen.

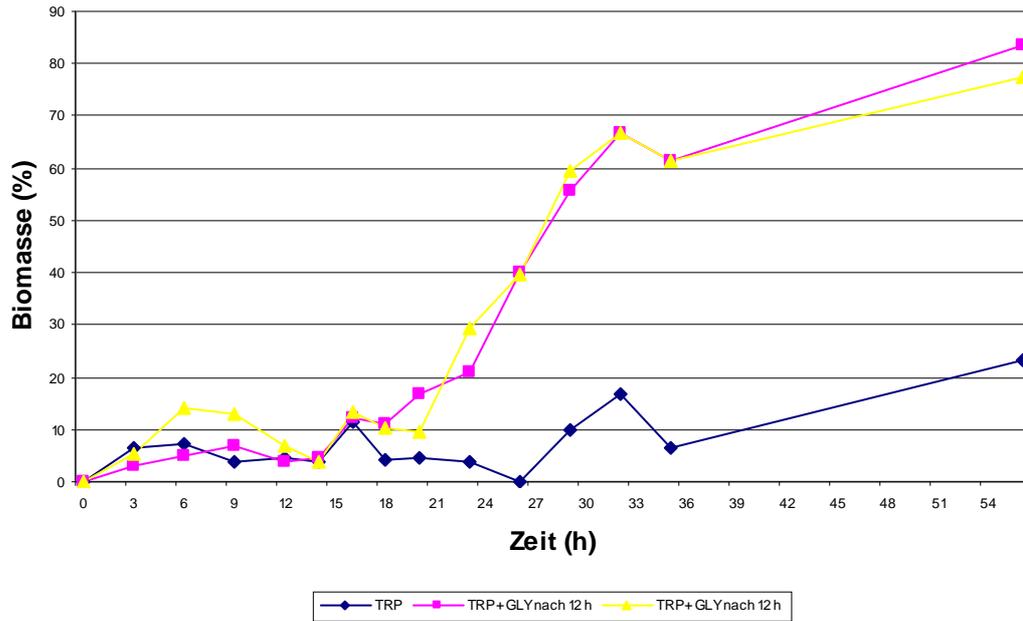


Abbildung 60: Biomassenveränderungen bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen

In der Abbildung 60 ist die Wachstumsrate der Biomasse zu beobachten. Etwa ab der 18. Stunde steigen die Kurven der Ansätze mit zeitverzögerter GLY-Gabe beinahe linear an, während die Kurve allein mit TRP kaum eine Zunahme der Biomasse zeigt. Die Ansätze mit GLY erreichen schließlich zum Ende des Versuchs, im Vergleich zum Ansatz nur mit TRP, einen deutlich höheren Biomassenzuwachs.

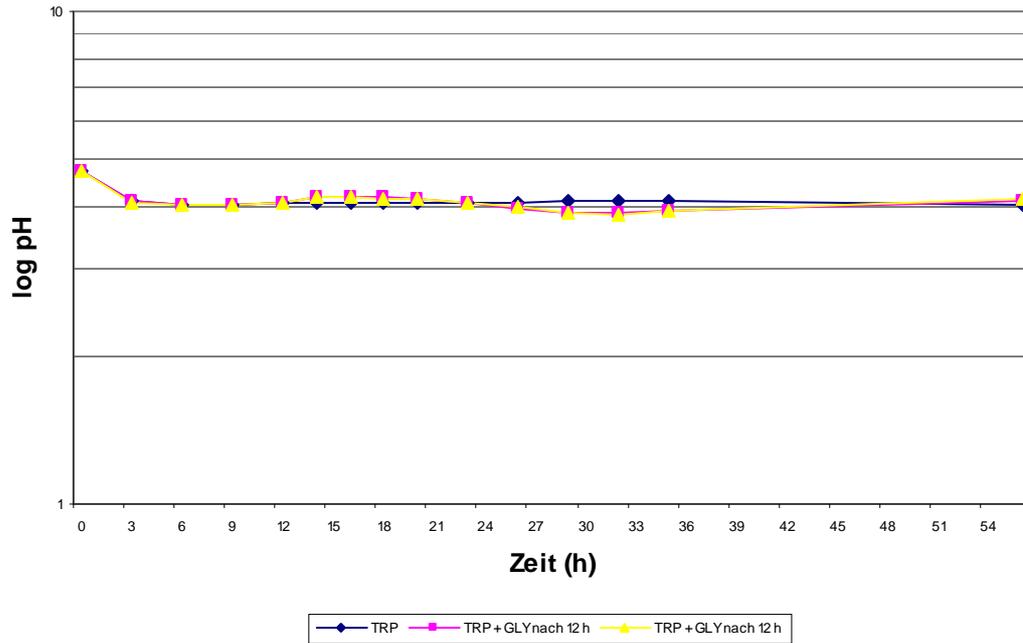


Abbildung 61: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen

Auf der Abbildung 61 ist der charakteristische Abfall des pH-Wertes aller drei Ansätze zu beobachten, der mit der Pigmentsynthese einhergeht. Zum Zeitpunkt der GLY-Gabe, zur 12. Stunde, steigt in diesen Kolben allerdings die pH-Werte an, fallen aber etwa ab der 18. Stunde wieder leicht ab. Ungefähr zu diesem Zeitpunkt beginnt der Zellzuwachs in diesen Ansätzen. Im Ansatz nur mit TRP kommt es nach dem anfänglichen Abfall zu keinen weiteren größeren pH-Wertveränderungen. Zur 56. Stunde haben sich die pH-Werte aller Ansätze wieder weitestgehend angeglichen

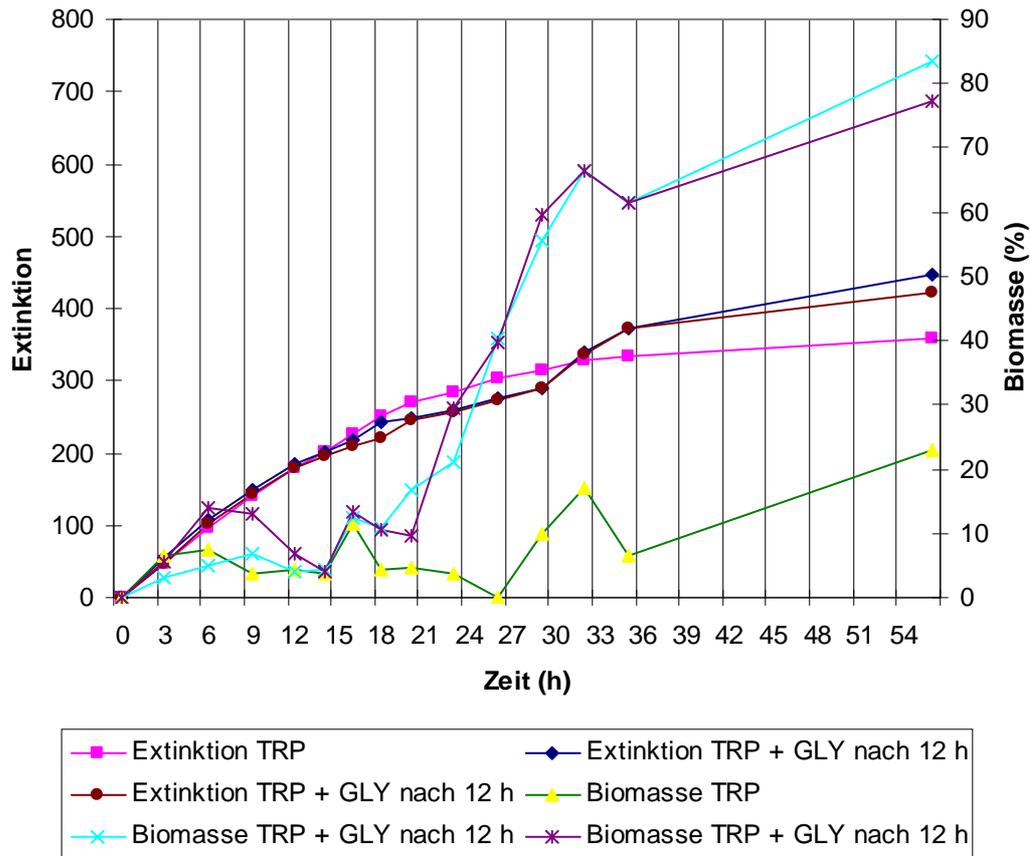


Abbildung 62: Extinktion und Biomassenzunahme bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen

In Abbildung 62 ist ein Diagramm zu sehen, welches sowohl die Wachstumsrate als auch die Extinktion zeigt. Zu erkennen ist, dass nach dem Zeitpunkt der GLY-Gabe zur 12. Stunde einerseits die Pigmentbildung in diesen Ansätzen nachlässt, andererseits der Biomassenzuwachs in diesen Ansätzen deutlich zunimmt. Ab der 29. Stunde wiederum erreicht die Kurve der Biomasse ein Wachstumsplateau und die Extinktion steigt wieder an. Sie erreicht sogar höhere Werte, als dies bei TRP alleine der Fall ist.

7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 8 h und 250.000 Zellen

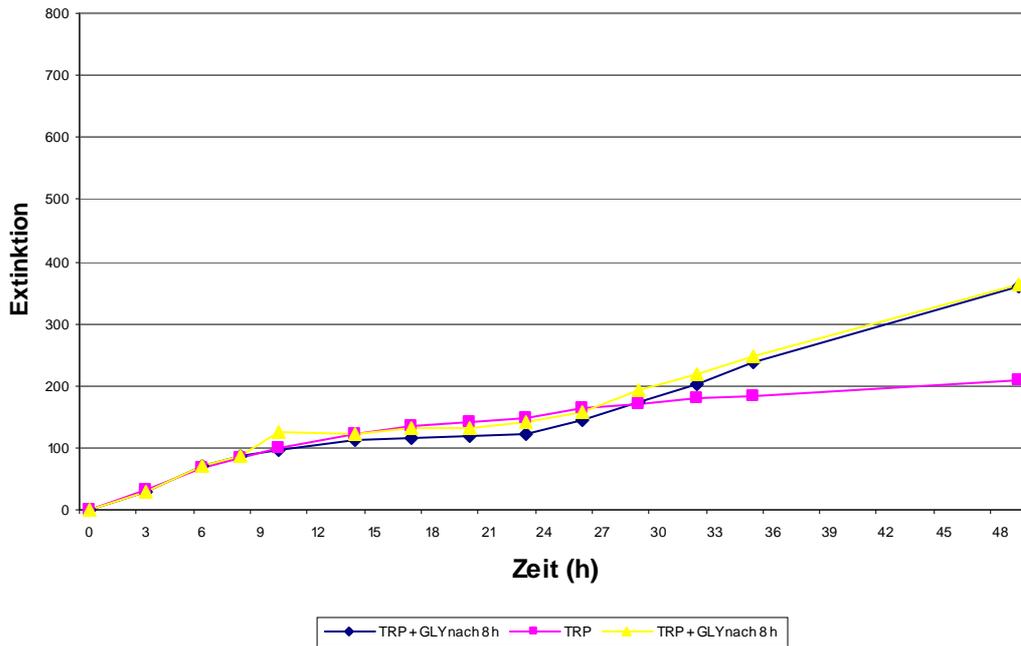


Abbildung 63: Extinktion bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 8 h und 250.000 Zellen

In der Abbildung 63 ist die Extinktion unter der Verwendung von 250.000 Zellen mit 7,5 mM TRP zu sehen. Zwei Ansätzen wurde zur 8. Stunde 7,5 mM GLY zugefügt.

Die Pigmentsynthese ist spektralphotometrisch und makroskopisch in allen Ansätzen zu erkennen. Der Ansatz nur mit TRP zeigt einen, zum späteren Zeitpunkt, abgebremsten Verlauf der Pigmentproduktion, in den beiden Ansätzen mit GLY kommt es ab der 14. Stunde zu einer Abflachung der Kurven. Die Pigmentbildung setzt in diesen beiden Ansätzen etwa zum Zeitpunkt der 26. Stunde wieder ein. Der Verlauf dieser beiden Kurven ist ab diesem Zeitpunkt linear und die Werte der Extinktion sind zum Ende der Versuchsreihe deutlich höher als im Ansatz allein mit TRP.

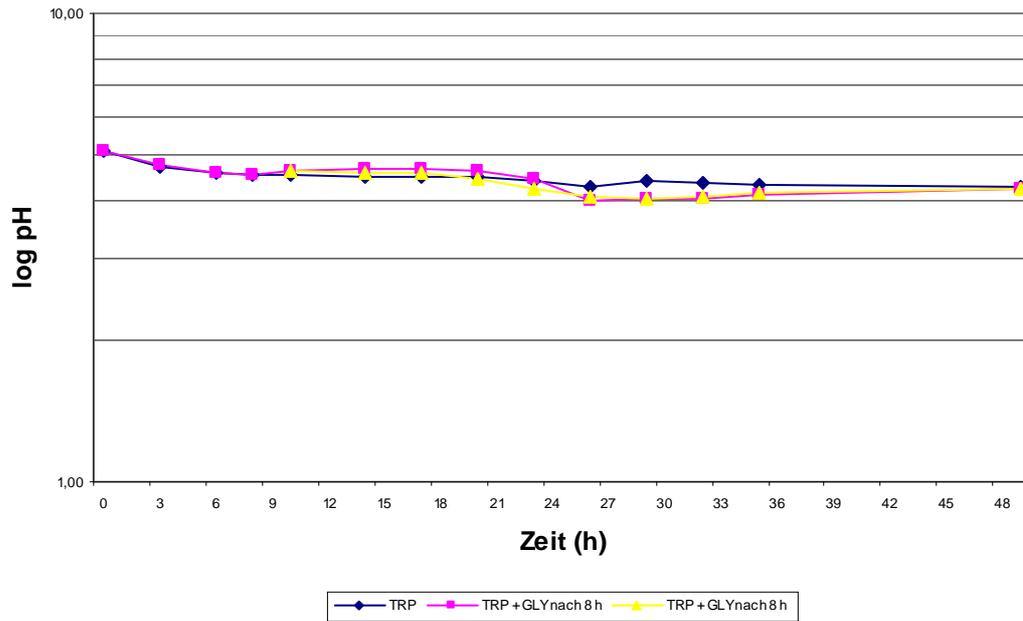


Abbildung 64: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM nach 8 h und 250.000 Zellen

Die Abbildung 64 zeigt innerhalb der ersten 8 Stunden der Pigmentbildung deutlich ein Absinken der pH-Werte an. Nach Zugabe von GLY zur 8. Stunde in zwei Ansätze ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Allerdings fällt der pH-Wert mit Wiederaufnahme der Pigmentsynthese in diesen Ansätzen umso deutlicher unter den Wert von Ansatz 1, der nur TRP enthält.

15 mM TRP sowie 3 mM GLY nach 9 h und 15 h und 1 Mio. Zellen

In dieser Versuchsreihe wurde versucht, durch zeitverzögerte Zugabe von nur 3 mM GLY zu einem Zeitpunkt von sicherer Pigmentbildung den zuvor beobachteten Stopp der Pigmentsynthese herbeizuführen. Die geringe Menge GLY sollte von den Zellen aber auch noch während des Versuchs verbraucht werden, um die dann folgenden mutmaßlichen Veränderungen beobachten zu können. Dies alles sollte in einem möglichst überschaubaren Zeitrahmen passieren, um den Arbeitsaufwand nicht unnötig zu vergrößern. Leider gelang dies aber offenbar nicht.

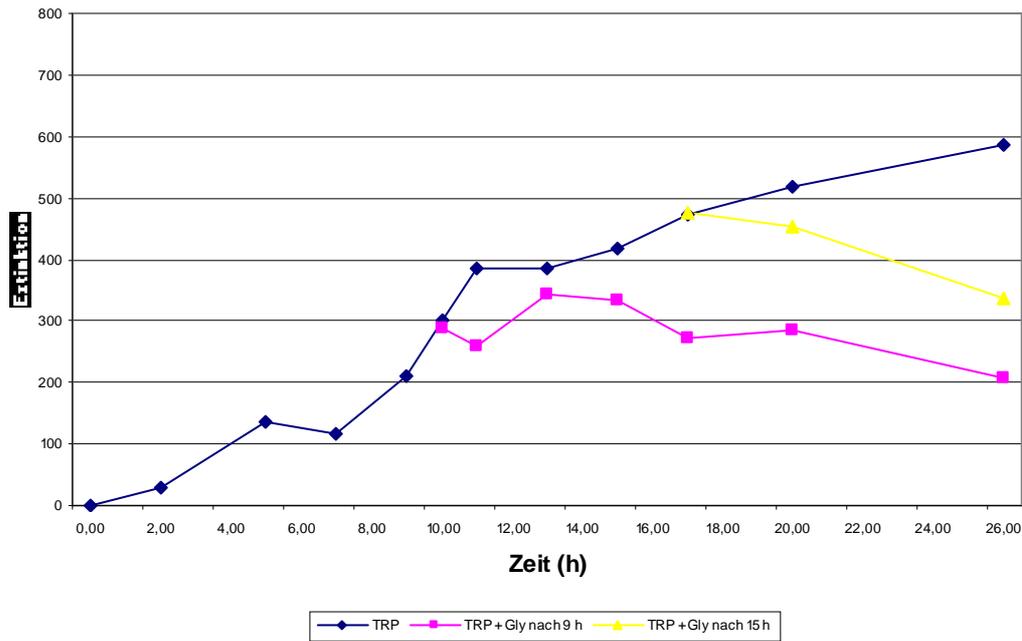


Abbildung 65: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP sowie je 3 mM TRP nach 9 h und 15 h und 1 Mio. Zellen

Die Abbildung 65 zeigt den zeitlichen Verlauf der Pigmentsynthese bei Verwendung von 1 Mio. Zellen und der Zugabe von 15 mM TRP. Dieser einzige Ansatz wurde nach 9 beziehungsweise 15 Stunden aufgeteilt und der entnommene Teil mit jeweils 3 mM GLY versetzt und in einen separaten Versuchskolben gegeben. Die Graphik zeigt in beiden so mit GLY versetzten Ansätzen einen deutlichen Stopp der Pigmentsynthese, während im Ansatz nur mit TRP die Pigmentsynthese weiter läuft. Makroskopisch war im ursprünglichen Ansatz die Pigmentsynthese zu sehen, diese braune Verfärbung war gegen Ende des Versuchs auch deutlich stärker als in den beiden Ansätzen, denen GLY zugegeben wurde.

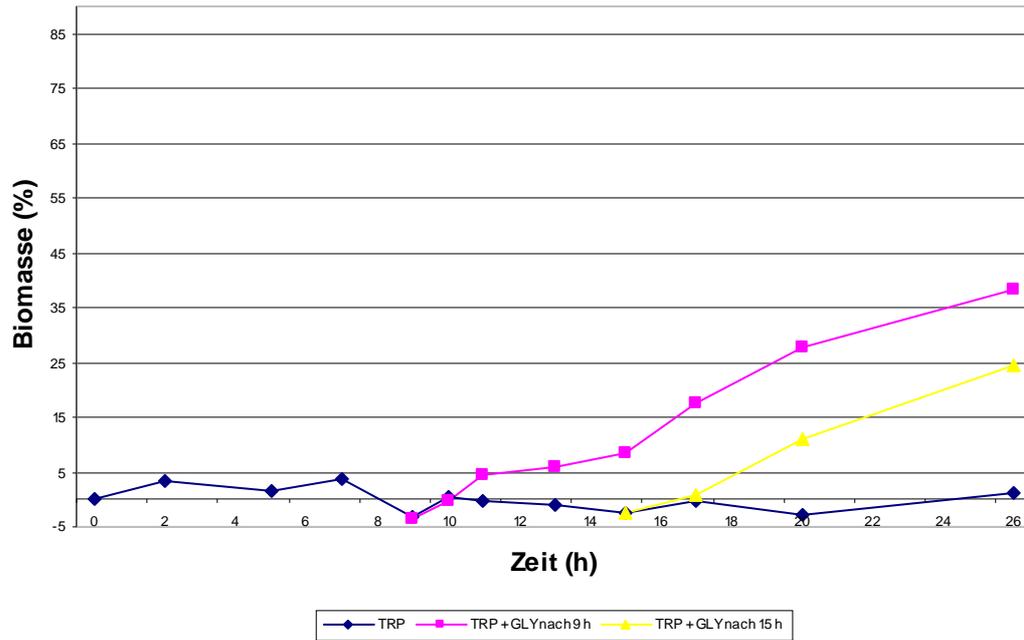


Abbildung 66: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP sowie je 3 mM GLY nach 9 h und 15 h und 1 Mio. Zellen

Abbildung 66 zeigt die Wachstumsrate der Biomasse im zeitlichen Verlauf. Im Ansatz nur mit TRP nimmt die Biomasse nicht zu. Nach der Zugabe von 3 mM GLY nach 9 beziehungsweise 15 Stunden steigen die Biomassen in diesen Ansätzen dagegen nahezu linear an.

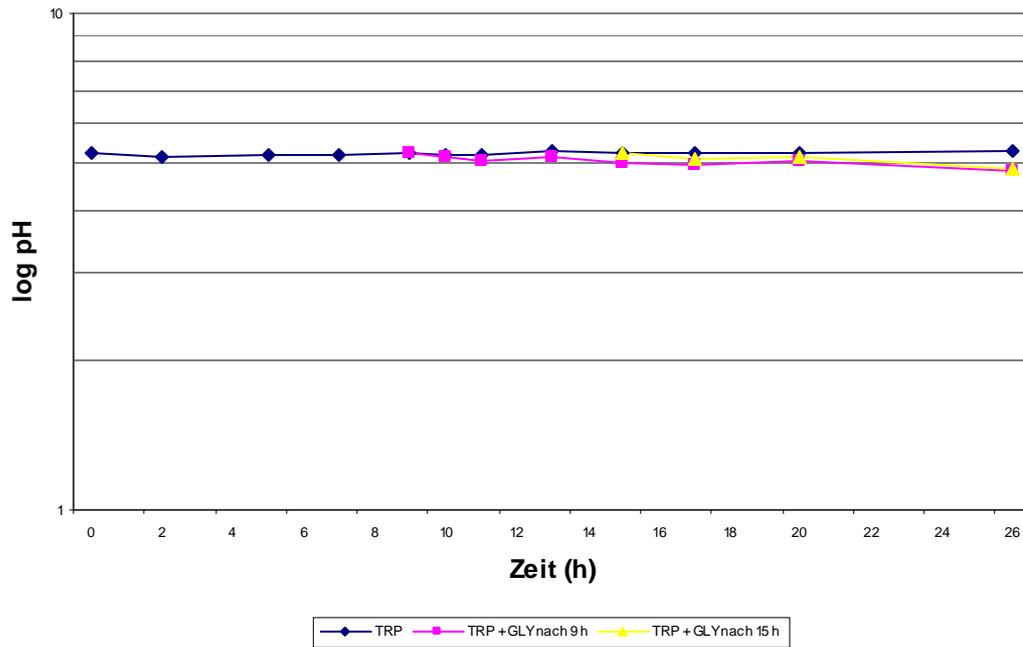


Abbildung 67: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP sowie 3 mM GLY nach 9 h beziehungsweise 15 h und 1 Mio. Zellen

In Abbildung 67 ist der zeitliche Verlauf des pH-Werts zu erkennen. Der pH-Wert vom Ansatz nur mit TRP unterliegt keinen großen Veränderungen. Bei Zugabe von GLY nach 9 beziehungsweise 15 Stunden sinkt der pH-Wert in diesen Ansätzen jeweils gering ab. Interessanterweise ist es hier nicht zu einem deutlichen Absinken des pH-Werts im Rahmen der Pigmentsynthese gekommen, der sonst immer beobachtet werden konnte.

4.3 Morphologie

Unter dem Lichtmikroskop sind Unterschiede zwischen Pilzen, abhängig von der Art des Nährmediums, zu erkennen.

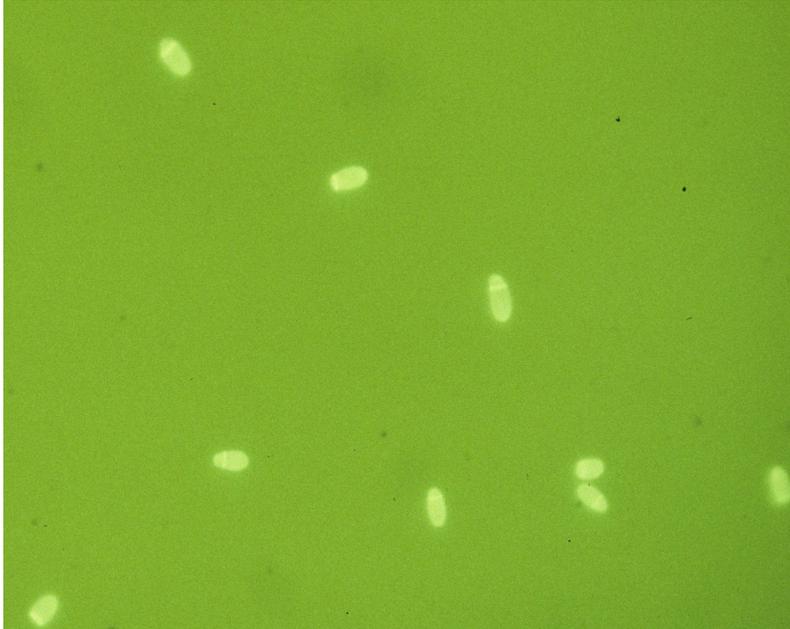


Abbildung 68: In GLY-haltigem Medium gewachsene Pilze (480-fache Vergrößerung)

In GLY-haltigem Medium gewachsene Pilze neigen zu rundem und kleinem Wachstum (Abbildung 68), während die mit TRP angezüchteten Zellen eher oval und größer sind (Abbildung 69).

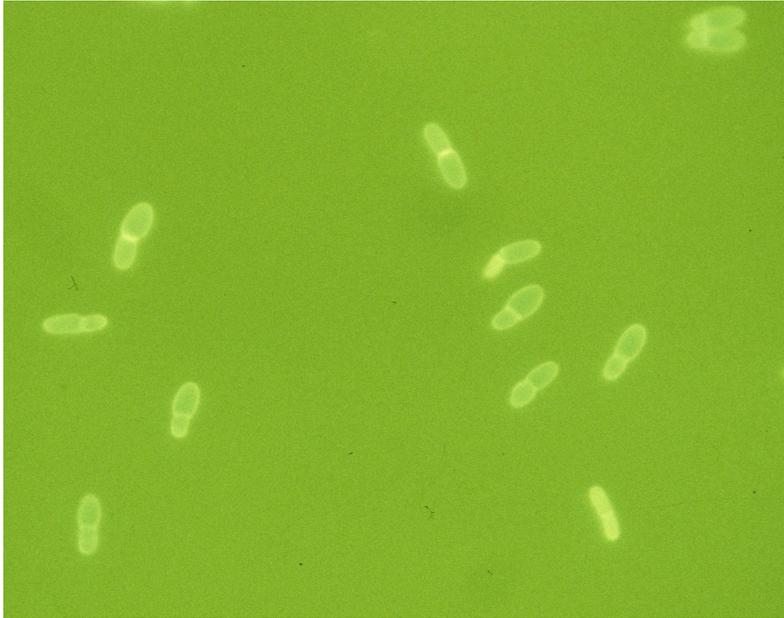


Abbildung 69: In TRP-haltigem Medium gewachsene Hefen (480-fache Vergrößerung)

Bei zeitgleicher Gabe von TRP und GLY sind die Zellen bei der Zunahme der Biomasse klein und rund, mit Beginn der Pigmentbildung oval und größer. Die Morphologie ist der bei alleiniger Aminosäuregabe ähnlich.

4.4 Pigment

Das bei zeitgleicher TRP- und GLY-Gabe nach dem Verbrauch von GLY synthetisierte Pigment und das daraus im dünnschichtchromatographischen Verfahren gewonnene Farbmuster entspricht dem, bei alleiniger TRP-Gabe produzierten (Abbildung 70).

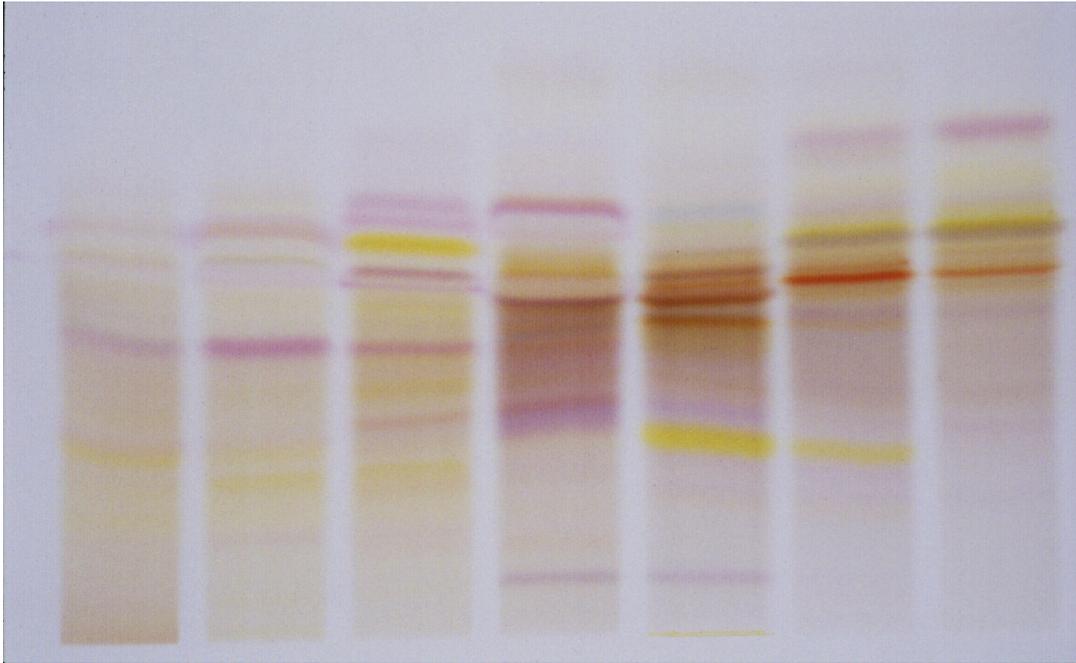


Abbildung 70: Gebildetes Pigment dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt

5 Diskussion

Bei *M. furfur*-Stämmen konnte durch Gabe von TRP als alleinige Stickstoffquelle ein bisher unbekannter Stoffwechselweg induziert werden (Mayser et al. 1998a). Hierbei kam es unter anderem zur Bildung eines braunen Pigments, welches im Spektralphotometer nachgewiesen werden konnte. Die im Pigment enthaltenen Stoffe scheinen deutlichen Einfluss auf die Entstehung der PV zu nehmen, eine durch *Malasszia*-Hefen verursachte Hautkrankheit, die mit Depigmentierung der Haut einhergeht.

Diese Arbeit versucht durch Kombination von TRP mit einer weiteren auf der Haut vorkommenden Stickstoffquelle, dem GLY, einen tieferen Einblick in die Stoffwechselsituation auf der Haut im Rahmen der PV zu erhalten. Besonders interessant sind hierbei On/Off-Effekte der Pigmentsynthese und des Zellwachstums, wobei der Situation auf der Haut durch den speziellen Versuchsaufbau Rechnung getragen wird. Die Morphologie der Hefen wurde besonders in Hinblick auf die typische Hyphenbildung von *M. furfur* bei der PV betrachtet.

5.1 Modell

Beim Inkubieren der Zellen im Flüssignährmedium mit TRP war auffällig, dass es ebenso wie auf einem festen Nährboden mit der Zeit zu einer deutlichen Verfärbung des flüssigen Mediums kam. Diese Färbung nahm rasch zu.

Die Verfärbung ist im Bereich der Brauntöne anzusiedeln. Da es sich bei der Farbe Braun aber um eine Mischfarbe handelt, konnte keine einzelne Wellenlänge zur Messung herangezogen werden. So wurde die farbliche Veränderung des Mediums auf der ganzen Bandbreite des sichtbaren Lichts gemessen. Der Bereich wurde von 400-800 nm gewählt.

Mit der erarbeiteten Methode ist es möglich, die Situation auf der Haut in vitro nachzuahmen. Physiologisch kommen auf der Haut nicht nur eine einzelne Aminosäure, sondern mehrere nebeneinander vor. Durch die Veränderungen bei Hyperhidrose kommt es durch Abtropfen ekkrinen Schweißes zu einem Verlust hydrophiler Aminosäuren (Liappis 1980), in den Experimenten stellvertretend anhand des GLY untersucht. TRP mit seiner hydrophoben Struktur bindet im Blut an Albumin (Mc Menamy 1958), könnte also auch auf der Hautoberfläche eine Proteinbindung eingehen und so bei vermehrtem Schwitzen kumulieren.

Durch das Modell ist der Wechsel zwischen diesen Stadien durch die Gabe beider Aminosäuren nachvollziehbar.

Bisher gab es bei dem Nachweis des Pigments das Problem, dass es auf den Agarböden nur qualitativ nachgewiesen werden konnte. Durch die Messung der im Rahmen des Versuchs gewonnenen Proben im Spektralphotometer ist nun auch eine quantitative Beurteilung der Pigmentsynthese möglich.

Durch die Überführung der Pilze in ein Flüssigmedium wird der tatsächlichen Situation auf der Haut Rechnung getragen. Bei der Hyperhidrose bildet sich auf der Haut ein Mikrofilm, vor allem im Bereich der Prädilektionsstellen, also im oberen Rumpfbereich und Nacken, der Sternummitte (vordere Schweißrinne) und der Vertebrallinie (hintere Schweißlinie). Aber auch unter Hosenträgern und BH-Trägern finden sich durch den Okklusionseffekt optimale Wachstumsbedingungen. Diesen Mikrofilm nachzuahmen ermöglicht das Flüssigmedium. Der Fluss des Mikrofilms und die Körperwärme werden durch die Nutzung eines beheizbaren Magnetrührers imitiert. Des Weiteren werden die Hefen vom gerührten und flüssigen Nährmedium bestmöglich umspült. Sie können so in einen optimalen Stoff- und Energieaustausch mit dem flüssigen Medium treten. Dies ist auf einer Agar-Platte ebenfalls nicht möglich.

Ein weiterer Vorteil des flüssigen Nährmediums ist der Umstand, dass das Pigment bereits in gelöster Form vorliegt und so über eine photometrische Messung quantitativ bestimmt werden kann. Der Einsatz eines Farbindikators wird also nicht benötigt. Die erste Probe, die zum Zeitpunkt Null genommen wird, stellt die Referenzprobe für die folgenden Proben dar, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Pigmentbildung stattgefunden hat.

5.2 Pigmentbildung

Mit dieser vorliegenden Arbeit sollte eine einfache Methode zur Beurteilung der Pigmentsynthese gefunden werden, mit der die Pigmentsynthese nicht nur qualitativ nachweisbar, sondern auch quantitativ beurteilbar ist. Gerade die Versuche mit TRP als alleiniger Stickstoffquelle waren durch die Methode gut beurteilbar. Die makroskopischen Beobachtungen der Pigmentbildung deckten sich mit den spektralphotometrischen Messungen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der überaus schnelle Pigmentanstieg in den Versuchen, der schon nach zwei Stunden nicht nur spektralphotometrisch nachzuweisen, sondern auch makroskopisch erkennbar ist. Dies spricht sicher für die von Zuther (2008) anhand von *Ustilagomaydis* gewonnenen Erkenntnisse, nach denen die Biosynthese von TRP Derivaten nur von einem Enzym, der TRP Aminotransferase – Tam 1 – katalysiert wird und die restlichen Syntheseschritte spontan ablaufen. Sollten diese Erkenntnisse, wie von den Autoren vermutet, auch auf *M. furfur* übertragbar sein, so ist hiermit sicher eine große Energieersparnis, gerade in einer Mangelsituation wie der Hyperhidrose wichtig, verbunden. Zusätzlich kann sich *M. furfur* so schnell auf wechselnde Umwelteinflüsse einstellen.

Bei den Versuchen mit GLY als alleiniger Stickstoffquelle fällt makroskopisch ein weißlicher Niederschlag von Stearinkristallen auf, der auch die spektralphotometrischen Messungen beeinflusst. Dieser Niederschlag ist auf die Aufspaltung der notwendigen Lipidquelle Tween zurückzuführen. Durch Verwendung einer Vakuumpumpe und geeigneter PTFE-Filter konnte dieser Fehlerquelle allerdings entgegengewirkt werden. Bei den Messungen der Versuche mit TRP kam dieses Problem nicht zum Tragen.

5.3 On/Off-Phänomene der Pigmentsynthese und des Wachstums und Ihre Auswirkungen auf die Haut

Zur Abklärung der Zusammenhänge zwischen Pigmentsynthese und Wachstum von *M. furfur* wurden in den vorgestellten Versuchen auch Kombinationen der beiden Stickstoffquellen verwendet. Bei der alleinigen Zugabe von TRP in das Minimal-Nährmedium mit den Hefen ist es möglich, eine Pigmentsynthese zu induzieren. Bei diesen Versuchen wurde aber zugleich festgestellt, dass es zu keiner deutlichen Veränderung der Biomasse kommt. Es ist also nur ein schwaches Wachstum nachweisbar. Bei der alleinigen Gabe von GLY verhält es sich genau Gegenteilig. Hier kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Biomasse, aber zu keiner, weder makroskopisch noch spektralphotometrisch nachweisbarer, rotbräunlichen Pigmentbildung. Die Beobachtungen bezüglich der Biomassenveränderung und damit des Wachstums decken sich mit denen von Murai (2002). Er führte seine Untersuchungen allerdings auf modifiziertem Dixon-Agar unter Zugabe der Stickstoffquellen durch und beurteilte das Wachstum der Kolonien auf den Platten.

Bei Gabe von TRP und dem Einsetzen der Pigmentsynthese ist in Bezug auf den pH-Wert ein deutlicher Abfall zu beobachten. Bei Gabe von GLY dagegen kommt es zu einem Anstieg der pH-Werte. Hier scheint also ein Zusammenhang zwischen der Pigmentsynthese und dem pH-Wert zu bestehen, der auch in den folgenden Versuchsanordnungen weiter zu erkennen ist.

Bei kombinierter, zeitgleicher equimolarer Gabe von GLY und TRP wurde im Hinblick auf die Vorversuche am ehesten damit gerechnet, dass sich sowohl die Bildung von Pigmenten, aber auch eine Zunahme der Biomasse beobachten lässt. Umso überraschender waren die Beobachtungen, dass es anfänglich nur zu einem Anstieg der Biomasse kommt. Dies kann als Ausdruck einer präferentiellen Verstoffwechslung von GLY gedeutet werden. Nach Erreichen eines Wachstumsplateaus beginnt dann deutlich die Pigmentbildung. Dieser Anstieg der Absorptionskurve ist sogar steiler, als er bei alleiniger equimolarer Gabe von TRP zu beobachten ist. Dies ist mit der anfänglichen Zunahme der Biomasse in der Phase der Metabolisierung von GLY zu erklären, die dann zum Zeitpunkt der beginnenden Pigmentsynthese deutlich über der Ursprungsmasse liegt.

Mit dem Einsetzen der Pigmentsynthese scheint der Stoffwechsel von *M. furfur* von der GLY-Verstoffwechslung auf TRP umzuschalten. Es kommt hierbei wohl zu einer Aktivierung des Sekundärmetabolismus von *M. furfur*. So greifen die Zellen nach dem Aufbrauchen von GLY auf die einzig andere vorhandene Stickstoffquelle, das TRP, zurück. Auch die pH-Werte scheinen dies zu bestätigen, denn es kommt zu einem erkennbaren Abfall, nachdem zuvor keine besonderen Veränderungen nachweisbar waren. Hier könnte aber auch die Puffereigenschaft von GLY eine Rolle spielen, die mit dem Absinken der GLY-Konzentration in der Lösung abnimmt.

Beginnt man den Versuch nun mit TRP und gibt noch im Anstieg der Extinktionskurve GLY als weitere Aminosäure hinzu, so kann man beobachten, dass es ab diesem Zeitpunkt zu einem deutlichen Anstieg der Biomasse kommt, der vorher so nicht zu sehen ist. Die Pigmentbildung dagegen stoppt und beginnt erst wieder, wenn auch die Biomasse ein Wachstumsplateau erreicht. Zeitgleich mit der GLY-Gabe kommt es zu einem Anstieg des pH-Werts, der bei Pigmentbildung für gewöhnlich absinkt. Die Pufferwirkung von GLY scheint hierbei einen Einfluss auf den pH-Wert zu haben. Kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer Stagnation der

Biomassenbildung, so ist ab diesem Zeitpunkt auch wieder ein Abfall des pH-Werts zu beobachten.

Der Nachweis dieser On/Off-Effekte deutet auf eine präferentielle Verstoffwechslung von GLY hin, einer Situation, bei der die Hefen wohl gedeihen. Dies ist an der Zunahme der Biomasse zu erkennen.

Überträgt man diese Erkenntnisse auf das Geschehen auf der Haut - hier kommt es bei der Hyperhidrose zum Verlust hydrophiler Stickstoffquellen, so auch des GLYs. Da nun die bevorzugte Stickstoffquelle von *M. furfur* verloren geht, beziehungsweise zuerst verbraucht wird, und sich die Hefen den veränderten Umgebungsbedingungen anpassen müssen, beginnen sie durch Aktivierung ihres Sekundärmetabolismus auf verbliebene Stickstoffquellen zurückzugreifen. Zu diesen gehört auch das TRP, welches im Oberflächenfilm der Haut vorhanden ist und, im Gegensatz zum ebenfalls stark hydrophoben Phenylalanin, nicht im Schweiß nachweisbar ist (Burke 1962, Liappis 1980). Diese Umstellung ihres Stoffwechsels auf das auf der Haut akkumulierte TRP ermöglicht den Hefen, auf diese Mangelsituation zu reagieren. Es kommt nun zwar zu keiner eindeutigen Biomassenzunahme mehr, aber durch die Bildung der Tryptophanmetaboliten Pityriacitrin und Pityrialacton zu einem potenten Breitband-UV-Schutz (Mayser et al. 2002; Machowinski 2006). Möglicherweise liegt im Pityrialacton mit seiner fluoreszierenden Eigenschaft auch der Grund für die orangegelbe bis gelbgrünliche Fluoreszenz der Läsionen der PV (Mayser et al. 2003). Dieser vermutete Verbrauch von TRP im Rahmen der Pigmentbildung könnte gut mit den Erkenntnissen von Burke (1962) übereinstimmen, der herausfand, dass die TRP-Konzentration in erkrankten Läsionen im Vergleich zu der sowieso schon sehr geringen Konzentration auf der Haut abnimmt.

Durch die Verringerung der TRP-Konzentration auf der Haut durch die Pigmentbildung kommt es zu einem weiteren Schutzmechanismus der Hefen. TRP selber gilt als natürlicher Lichtschutzfilter der menschlichen Haut, hat aber den Nachteil, dass es unter UVB-Bestrahlung zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (singuleter Sauerstoff [1O_2] und Superoxidradikale [O_2^-]) kommt. Ihre schädigende Wirkung kommt an Membranen und der DNA der Zellen zum Tragen (Babu et al. 1992).

In diesem Zusammenhang kann über die Rolle des pH-Werts spekuliert werden. Sein Abfall bei der Pigmentbildung könnte ein weiterer Schutzmechanismus sein. Da die Hefen auf der Haut auch in Konkurrenz zu ebenfalls ubiquitär auf der Haut vorkommenden Bakterien stehen, könnte eine Absenkung des pH-Werts einen weiteren Überlebensvorteil in dieser Mangelsituation darstellen. Mit Verlust des GLYs auf der Haut, durch Schwitzen und Verstoffwechslung, stoppt auch dessen Pufferwirkung, von der Bakterien zuvor noch profitieren konnten.

Diese nachgewiesenen On/Off-Effekte kommen durch die bevorzugte Verstoffwechslung anderer Stickstoffquellen als TRP zustande. Um aber auf diese spezielle Situation der Umgebung zu reagieren, wird der Sekundärmetabolismus aktiviert, durch den die Hefen sich ein Überleben sichern können.

Der klinische Einsatz einer GLY-haltigen wasserfesten Salbe würde die Zellen von *M.furfur* daran hindern, auf ihren Sekundärmetabolismus im Rahmen der Hyperhidrose umzustellen, indem man sie mit GLY bedient. Allerdings würde hierdurch das natürliche Gleichgewicht der Mikroorganismen auf der Haut gestört. Es ist zudem fraglich, ob eine Anzucht von *M. furfur* auf der Haut im Rahmen der PV tatsächlich eine Besserung der klinischen Symptome bedingt.

5.4 Morphologieänderungen der Hefen

Bei der Beurteilung der Morphologieänderungen der *Malassezia*-Hefen fällt auf, dass bei alleiniger Gabe von GLY die Zellen im Flüssignährmedium eine eher kleine und rundliche Form annehmen. Bei Verwendung von TRP dagegen kommt es vor allem zu größeren und länglicheren Zellformen.

Bei Verwendung von beiden Stickstoffquellen ist auffällig, dass die Zellen im Stadium der Biomassenzunahme die kleine rundliche Form an und in der Phase der Pigmentbildung die größere längliche annehmen.

Weder kann aber eine so deutliche Hyphenbildung wie bei dem Krankheitsbild der PV (Gordon 1951) noch die von Dorn (1977) durch Kultivierung der Zellen auf einem Medium mit GLY induzierte runde Zellform mit Ausbildung von Hyphen beobachtet werden. Die in den Versuchen gemachten Beobachtungen bezüglich der Abhängigkeit der Morphologieänderungen von der zugegebenen Stickstoffquelle, scheinen mit den

Erkenntnissen von Mayser (1998a) konform zu gehen. Mayser konnte eine Abhängigkeit der Zellform von der verwendeten Aminosäure und sogar eine Reversibilität bei Substratänderung aufzeigen. Die jetzigen Erkenntnisse zeigen nun aber auch eine präferentielle Verstoffwechslung von GLY mit der Ausbildung von runden Zellformen. Letztendlich scheint die Hyphenbildung aber nicht von der Zellform abhängig zu sein, da nach Nazzaro-Porro (1977) sowohl runde als auch ovale Zellen Hyphen produzieren können.

In diesem Zusammenhang spielen vielleicht eventuelle Wechselwirkungen der Hefen mit den ebenfalls ubiquitär auf der Haut vorkommenden Bakterien eine Rolle. Beide Mikroorganismen stehen bei der Hyperhidrose, mit einem Mangel an lebensnotwendigen Stickstoffquellen und Elektrolyten, im direkten Konkurrenzkampf ums Überleben. So ist die Hyphenbildung im Rahmen der PV sicherlich multifaktoriell bedingt, also auch als Reaktion auf Stoffwechselprodukte der Bakterien und auf die Veränderungen der Zusammensetzung des Schweißes bei Hyperhidrose.

6 Zusammenfassung

Malassezia-Hefen, Teil der residenten Hautflora, gelten als Erreger der PV. Untersucht wurden Auswirkungen des Aminostickstoffmilieus auf Wachstum, Morphologie und Sekundärmetabolismus von *M. furfur*. Nach Primärkultur auf Dixon-Agar wurden die Hefen in ein Flüssigmedium, bestehend aus einer Lipidquelle, Salzen und einer Kombination von Stickstoffquellen, überführt. Unter Zugabe von TRP und GLY wurde die Zellmasse mit Hilfe der Trockenmethode sowie die Pigmentsynthese spektralphotometrisch quantifiziert. Unter Zugabe von GLY kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der Biomasse, jedoch zu keiner Pigmentsynthese. TRP als alleinige Stickstoffquelle resultierte in einer deutlichen Braunfärbung des Mediums ohne Zunahme der Biomasse. Zeitgleiche equimolare Gabe beider Aminosäuren führte zunächst zu einem Anstieg der Biomasse als Ausdruck einer präferentiellen Verstoffwechslung von GLY, später nach Erreichen eines Wachstums-Plateaus zur Pigmentsynthese, die aber aufgrund der größeren Biomasse rascher abläuft als bei alleiniger TRP-Gabe. Hierbei änderte sich die Morphologie der Hefe von rund zu länglich. Starten mit TRP und spätere GLY-Zugabe führte zu einem Stopp der Pigmentbildung bei gleichzeitiger Wachstumsinduktion.

Diese in vitro dargestellten On/Off-Phänomene in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle könnten auch in der Pathogenese der PV bedeutsam sein: Hyperhidrose – Ausbildung eines Biofilms- präferentieller Verbrauch einzelner Stickstoffquellen wie Glycin mit exponentiellem Wachstum – nach deren Verbrauch Umschalten auf TRP-abhängige Pigmentsynthese mit pathophysiologisch bedeutsamen Wirkungen. Sie bilden die Grundlage für molekularbiologische Methoden zum Nachweis beteiligter Gene (u.a. Subtraktionstechnologie).

7 Summary

Belonging to the resident flora of the skin, *Malassezia* yeasts are thought to cause pityriasis versicolor (PV). The present investigation focused on the impact of an amino-nitrogen milieu on growth, morphology and secondary metabolism of *M. furfur*. Following primary culture on Dixon agar, the yeasts were transferred to a fluid medium comprised of a lipid source, salts, and a combination of nitrogen sources. After addition of tryptophan (TRP) and glycine (GLY), the cell mass was calculated by the dry-weight method, and pigment synthesis was determined by means of spectral photometric measurement. Addition of GLY caused an exponential increase in biomass, but pigment synthesis did not occur. TRP as the sole nitrogen source resulted in distinct brown staining of the medium, and there was no increase in biomass. Simultaneous equimolar addition of both amino acids caused an increase in biomass, indicating the preferential metabolism of glycine; once the growth curve had reached its plateau, this was followed by pigment synthesis which, however, by virtue of the higher biomass, occurred more rapidly than after addition of TRP alone. During the process, yeast cell morphology changed from round to oval. Starting with TRP alone and then adding GLY brought about an inhibition of pigment formation with simultaneous growth induction.

The on-off phenomena presented here in vitro as a function of nitrogen source may also be significant when considering the pathogenesis of pityriasis versicolor: hyperhidrosis - biofilm formation - preferential consumption of individual nitrogen sources such as glycine with exponential growth - thereafter, switchover to TRP-dependent pigment synthesis with pathophysiologically significant effects. They constitute the basis of molecular-biological methods intended to assist in the detection of genes involved (for example, subtraction technology).

Literaturverzeichnis

Adamson, H.G.: Pityriasis versicolor with subsequent leukodermic patches. Brit. J. Derm. 61: 322-322, 1949

Ashbee, R., Evans, E.G. V.: Immunology of diseases associated with *Malassezia* Species. Clin. Microbiol. Rev.: 21-57, Jan 2002

Babu, V., Joshi, P.c.: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. Indian J Biochem Biophy 29(3): 296-8, 1992

Balus, L., Grigoriu, D.: Pityriasis versicolor In: Mykologie Nr:4. Cilag GMBH, (1982)

Barfatani, M., Mumn, R.J., Schjeide, O.A.: An ultrastructure study of *Pityrosporum orbiculare*. J.Invest. Derm. 43: 231-233, 1964

Bergbrant, I.M., Faergemann, J. : Variations of *Pityrosporum orbiculare* in Middle-aged and Elderly Individuals. Acta Derm. Venereol. 68: 537-540, 1988

Boardman, C.R., Malkinson, F.D.: Tinea versicolor in steroid treated patients. Arch. Derm. 85: 44-52, 1962

Bojanovsky, A., Bohmert, E., Jung, E.G.: *Pityrosporum orbiculare*: Erreger verschiedener klinischer Bilder und Model einer Depigmentierungsart. Akt. Derm. 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

Breathnach, A.S., Gross, M., Martin, B.: Freeze-fracture replications of cultured *Pityrosporum orbiculare*, Sabouraudia 14: 105-113, 1976

Besnier, E., Balzer, F.: Les dermatomycoses. Gaz. Hebdom. Med. Chir. 19: 326-328, 341-344, 1882

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: 206-211, 1962/63

Canizares, O., Shatin, H., Kellert, A.J.: Cushings syndrome and dermatomycosis. Arch. Derm. 80: 705-709, 1959

Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., Beidler, J.G.: Hypopigmentation in tinea versicolor: a histochemical and electronmicroscopic study. Int J Dermatol 12:48-58, 1973

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

Cunningham, A.C., Leeming, J.P., Ingham, E., Gowland, G.. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. Journal of Applied Bacteriology 68, 439-446, 1990

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

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

Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. Journal of Investigative Dermatology, 69, 224-248, 1977

El-Gothany, Z., Abdel-Fattah, A.F.: Tinea versicolor hypopigmentation. histochemical and therapeutic studies. Int. J. Derm. 14: 510-515, 1975

Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. Acta Derm. Venereol. 60: 531-533, 1980

Faergemann, J., Fredriksson, T.: Tinea versicolor: Some new aspects on etology, pathogenesis and treatment. Int. J. Derm. 21: 8-11, 1982

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

Fritsch P.: Dermatologie und Venerologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1998

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

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

Gohla, C., Krämer, H.J., Mayser, P.: Entwicklung eines Flüssigmediums zur Pigmentinduktion bei *Malassezia furfur* und Vergleich verschiedener *Malassezia furfur* Stämme. (in press), 2008

Gordon, M.A.: The lipophilic mycoflora of the skin. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* n. sp. (Mycologia 43: 524-535, 1951)

Gudden, B. von.: Beitrag zur Lehre von den durch Parasiten bedingten Hautkrankheiten. II. Pityriasis versicolor. Arch. Physiol. Heilk. Stuttg., 12: 496-505, 1853

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., Bluhm, R., Summerbell R.: Pityriasis versicolor. JEADV 16: 19-33, 2002

Hagler, A.N., Ahearn, D.G.: Rapid diazonium blue test to detect *basidiomycetous* yeasts. Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 204-208, 1981

Hay, R.J., Roberts, S.O.B., Meckenzie, 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

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

Ingham, E., Cunningham, A.C.: *Malassezia furfur*. J. Vet. Med. Mycol. 31: 265-288, 1993

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

Jeliffe, D.B. Jacobson, F.W.: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. J. Trop. Med. Hyg. 57: 290-293, 1954

Jung, E.G., Truniger, B.: Tinea versicolor and Cushings Syndrome. *Dermatologica* 127: 18-22, 1963

Keddie, F.M.: Electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. *Sabouraudia* 5:134-137, 1966

Koch, H.H., Pimsler, M.: Evaluation of Unitex 2B: A non specific fluorescent stain for detecting and identifying fungi and algae in tissue (Lab. Med. 18: 603-606, 1987)

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

Krämer, H.J., Kessler, D., Hipler, U.C., Irlinger, B., Hort, W., Bodeker, R.H., Steglich, W., Mayser, P.: Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcyriarubin A. *ChemBioChem* 6:2290-2297, 2005a

Krämer, H.J., Podobinska, M., Bartsch, A., Battmann, A., Thoma, W., Bernd, A., Kummer, W., Irlinger, B., Steglich, W., Mayser, P.: Malassezin, a Novel Agonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor from the Yeast *Malassezia furfur*, Induces Apoptosis in Primary Human Melanocytes. *Chembiochem* 6: 860-865, 2005b

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

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

Lange, B., Vejdělek, Z.J.: *Photometrische Analyse*. Verlag Chemie. p. 3-24, 1980

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

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

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

Lockshin, N.A.: Tinea versicolor masquerading as vitiligo. Cutis 12: 245-247, 1973

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

Machowinski, A., Krämer, H.J., Hort, W., Mayser, P.: Pityriacitrin – a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human microflora. (Mycoses 49(5):388-392, 2006)

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

Mayser, P., Gründer, K.: Die Wertigkeit mykologischer Nativdiagnostik *Pityrosporum* induzierter bzw. –aggravierter Dermatosen (Hautnah myk 2: 68-72, 1992)

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

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

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 a single nitrogen source (Mycoses 41:265-271, 1998b)

Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.-J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityriacitrin- an ultravioletabsorbing from the yeast *Malassezia furfur*. Arch. Dermatol. Res. 294: 131-134, 2002

Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H.J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *M. furfur*. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 84: 185-191, 2003

Mc Aleer, R.: Pityriasis versicolor. Aust. J. Derm. 21: 42-46, 1980

Mc Menamy, R.H., Oncley, J.L.: The specific binding of L-Tryptophan to Serum Albumin. J. Biol. Chem. 233:1436-47, 1958

Michalowski, R., Rodziewicz, H.: Pityriasis versicolor in the aged. *Brit. J. Derm.* 77: 388-390, 1965

Midgley, G.: The diversity of *Pityrosporum (Malassezia)* yeasts in vivo and in vitro. *Mycopathologia* 106, 143-153, 1989

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*-assoziierten Erkrankungen. *Mycoses* 39: 13-19, 1996

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

Müting, D., Langhof, H.: Über die Aminosäurezusammensetzung gesunder und kranker menschlicher Haut. *J Mol Med* 31:618-619, 1953.

Murai, T., Nakamura, Y., Kano, R., Watanabe, S., Hasegawa, A.: Differentiation of *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis* by glycine utilization. *Mycoses* 45: 180-183, 2002

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

Naylor, G.A.: Practical and Theoretical Treatise on the Diseases of the Skin. London, 1866: 46-50

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

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

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

Randjandiche M.. Frequence de *Pityrosporum ovale* dans l'oreille humaine. *Dermatologica* 151 : 100-103, 1975

- Razack, E.M.A., Thambiah, A.S.: A clinical study pityriasis versicolor in Madras. *Sabouraudia* 15: 3005-311, 1977
- Reed, W.B., pidgeon, J., Becker, S.W.: Patients with spinal cord injury. Clinical cutaneous studies. *Arch. Derm.* 83: 379-385, 1961
- Roberts, S.O.B.: The mycology of the clinical normal scalp. *Brit. J. Derm.* 81: 626-628, 1969
- Roed-Peterson, J.: Tinea versicolor and body lotions. *Acta. Derm. Venereol.* 60: 439-440, 1980
- Ruete, A.: Pityriasis versicolor. In: Jadasohns Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: J. Jadasohn). Bd. XI., Berlin: springer Verlag, pp. 696-710, 1928
- Ruete, A.e.: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. *Derm. Wocheschr.* 96: 333-336, 1933
- Salkin, I.F., Gordon, M.A.: Polymorphism of *Malassezia furfur*. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 471-475, 1977
- Simmnos, R.B., Guého, E.: A new species of *Malassezia* (*Mycological Research* 94 : 1146-1149, 1990)
- 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
- Slooff, W.Ch.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: The Yeasts – A Taxonomic Study (Hrsg. J. Lodder) 2 nd edition, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970
- Stefanovic , M., Medicijjan, M.. die Verbreitung der Pityriasis versicolor bei der Sportjugend. *Castellania* 4: 29-31, 1976
- Sunenshine, P.J., Schwartz, R.A., Janninger C.K.: Tinea versicolor. *Int. J. Dermatol.* 37: 648-655, 1998
- Swift, J.A., Dunbar, S.F.: The ultrastructure of of *Pityrisporum ovale* and *Pityrosporum canis*. *Nature* 206: 1174-1175, 1965
- Thoma, W., Krämer, H.-J., Mayser, P.: Pityriasis versicolor alba. *JEADV* 19:147-152, 2005

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

Van Abbe, N.J.: The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosm. Chemists* 15: 609-630, 1964

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)

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

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)

Zuther, K., Mayser, P., Hettwer, U., Wenying, W., Spittler, P., Kindler, B., Karlovsky, P., Basse, C., Schirawski, J.: The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic Stepp for tryptophan dependent synthesis in *Ustilago maydis*. (**in press**), 2008

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der <i>Malassezia</i> -Hefen auf der Hautoberfläche	2
Abbildung 2: Hyperpigmentierung der Pityriasis versicolor.....	6
Abbildung 3: Fluoreszenz der Hautveränderungen im UV-Licht	7
Abbildung 4: Pityriasis versicolor alba: depigmentierte Areale auf dunkler Haut	7
Abbildung 5: Diagnostik der Pityriasis versicolor.....	10
Abbildung 6: Versuchsanordnung der Kolben mit beheizbaren Magnetrührern.....	19
Abbildung 7: Vakuumfiltersystem mit PTFE-Filter und Probe	21
Abbildung 8: Verbleibende Pilzpellets der Proben.....	22
Abbildung 9: Das verwendete Spektralphotometer der Firma Beckman Modell DU 640.....	23
Abbildung 10: Eichkurve mit GLY (1878)	29
Abbildung 11: Eichkurve mit TRP (1878)	29
Abbildung 12: Extinktionskurve bei Verunreinigung mit Dixon-Agar	35
Abbildung 13: Biomassenzunahme bei Verunreinigung mit Dixon-Agar.....	36
Abbildung 14:Extinktion ohne Verunreinigung und unter Verwendung eines Watteträgers	37
Abbildung 15: Vergleich der Extinktionskurven einer gefilterten und einer ungefilterten Probe	38
Abbildung 16: Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer.....	39
Abbildung 17:Zellzahlbestimmung nach der indirekten Methode (Trockengewichtbestimmung)	40
Abbildung 18: Extinktion bei Verwendung von 2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	44
Abbildung 19: Biomassenveränderung bei Verwendung von 2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	45
Abbildung 20: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	46

Abbildung 21: Extinktion bei Verwendung von 15 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	47
Abbildung 22: Biomassenzunahme bei Verwendung von 15 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	48
Abbildung 23: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	48
Abbildung 24: Extinktion bei Verwendung von 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	49
Abbildung 25: Biomassenveränderung bei Verwendung von 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen.....	50
Abbildung 26: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 45 mM GLY und 1 Mio. Zellen ...	51
Abbildung 27: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen.....	52
Abbildung 28: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen.....	53
Abbildung 29: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und 1 Mio. Zellen ...	54
Abbildung 30: Extinktion bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen.....	54
Abbildung 31: Makroskopischer Verlauf der Pigmentsynthese bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen.....	55
Abbildung 32: Biomassenveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen.....	55
Abbildung 33: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 1 Mio. Zellen ...	56
Abbildung 34: Extinktion bei Verwendung von 30 mM TRP und 250.000 Zellen	57
Abbildung 35: Biomassenveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 250.000 Zellen.....	58
Abbildung 36: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 30 mM TRP und 250.000 Zellen.....	59
Abbildung 37: Extinktion bei Verwendung von 45 mM TRP und 500.000 Zellen	60
Abbildung 38: Biomassenveränderungen bei Verwendung von 45 mM TRP und 500.000 Zellen.....	61

Abbildung 39: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 45 mM TRP und 500.000 Zellen.....	61
Abbildung 40: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen.....	63
Abbildung 41: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen.....	64
Abbildung 42: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen.....	65
Abbildung 43: Biomassenveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen.....	66
Abbildung 44: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen.....	66
Abbildung 45: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen.....	67
Abbildung 46: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen.....	68
Abbildung 47: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP und GLY und je 500.000 Zellen.....	69
Abbildung 48: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP und GLY und 500.000 Zellen.....	70
Abbildung 49: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP und GLY und je 500.000 Zellen.....	71
Abbildung 50: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / 7,5 mM TRP und 7,5 mM GLY und 200.000 Zellen (Formatierung der y-Achse geändert, Maximum liegt bei 1200).....	72
Abbildung 51: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / sowie 7,5 mM TRP und GLY und je 200.000 Zellen (extrapoliert / gleitender Mittelwert).....	73

Abbildung 52: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM TRP & GLY und 200.000 Zellen.....	74
Abbildung 53: Extinktion bei Verwendung von je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen.....	75
Abbildung 54: Pigmentsynthese im makroskopischen Verlauf (ohne Probe der 32. Stunde) bei Gabe von je 15 mM TRP & GLY und 1 Mio. Zellen.....	76
Abbildung 55: Biomassenveränderung bei Verwendung von je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen.....	77
Abbildung 56: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen.....	78
Abbildung 57: pH-Wert und Extinktion mit je 15 mM TRP und GLY sowie 1 Mio. Zellen....	79
Abbildung 58: Extinktion und Biomassenveränderung bei je 15 mM TRP und GLY und 1 Mio. Zellen	80
Abbildung 59: Extinktion bei Verwendung von 7,5 mM TRP mit 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen.....	81
Abbildung 60: Biomassenveränderungen bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen.....	82
Abbildung 61: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen.....	83
Abbildung 62: Extinktion und Biomassenzunahme bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen.....	84
Abbildung 63: Extinktion bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM GLY nach 8 h und 250.000 Zellen.....	85
Abbildung 64: pH-Wertveränderungen bei Verwendung von 7,5 mM TRP sowie 7,5 mM nach 8 h und 250.000 Zellen.....	86
Abbildung 65: Extinktion bei Verwendung von 15 mM TRP sowie je 3 mM TRP nach 9 h und 15 h und 1 Mio. Zellen	87

Abbildung 66: Biomassenveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP sowie je 3 mM GLY nach 9 h und 15 h und 1 Mio. Zellen.....	88
Abbildung 67: pH-Wertveränderung bei Verwendung von 15 mM TRP sowie 3 mM GLY nach 9 h beziehungsweise 15 h und 1 Mio. Zellen.....	89
Abbildung 68: In GLY-haltigem Medium gewachsene Pilze (480-fache Vergrößerung).....	90
Abbildung 69: In TRP-haltigem Medium gewachsene Hefen (480-fache Vergrößerung).....	91
Abbildung 70: Gebildetes Pigment dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.....	92

Rohdatenliste

Eichkurve *M. furfur* (1878) mit GLY

Zellen in Mio.	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)
0	0	0	0	0
25	0,15	0,23	0,2	0,19
50	0,39	0,4	0,38	0,39
100	0,79	0,83	0,82	0,81
150	1,15	1,14	1,24	1,18
200	1,58	1,52	1,61	1,57
250	1,9	1,94	1,95	1,93

Eichkurve *M. furfur* (1878) mit TRP

Zellen in Mio.	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)
0	0	0	0	0
25	0,1	0,1	0,1	0,1
50	0,31	0,29	0,33	0,31
100	0,7	0,72	0,8	0,74
150	1,19	1,26	1,18	1,21
200	1,62	1,67	1,63	1,64
250	2,11	2,07	2,01	2,06

Extinktionskurve bei Verunreinigung mit Dixon-Agar

Zeit (h)	100.000 Zellen Extinktion	200.000 Zellen Extinktion	300.000 Zellen Extinktion	400.000 Zellen Extinktion
0	0	0	0	0
2	6,5133	0,5486	2,0544	1,4998
4	10,0561	1,5955	3,3586	4,9242
6	13,1926	2,8528	6,8369	8,39
7	14,2133	3,9918	8,6064	13,2603
8	16,136	4,6633	10,8173	19,1692
10	20,2422	7,3914	20,5415	36,5614
12	20,4208	8,9889	43,7649	115,5248
14	21,6919	16,8841	88,3183	169,3366
17	24,5475	69,3715	146,745	201,433
20	26,8858	147,0545	170,8921	221,6363
24	30,73	177,8072	205,9758	276,7434

Biomasse bei Verunreinigung mit Dixon-Agar

Zeit (h)	100.000 Zellen Biomasse (%)	200.000 Zellen Biomasse (%)	300.000 Zellen Biomasse (%)	400.000 Zellen Biomasse(%)
0	0	0	0	0
2	19,71	5,93	5,42	7,04
4	18,98	7,91	6,23	8,49
6	17,52	4,74	8,4	12,63
7	24,82	16,21	13,28	13,66
8	41,61	18,97	15,45	8,03
10	44,53	20,55	17,07	10,35
12	76,64	28,06	21,95	12,63
19	104,38	42,69	29,81	21,33

Extinktion ohne Verunreinigung und unter Verwendung eines Watteträgers

Zeit (h)	100.000 Zellen Extinktion	200.000 Zellen Extinktion	300.000 Zellen Extinktion	400.000 Zellen Extinktion
0	0	0	0	0
2	5,8858	11,45	15,3351	15,3395
4	12,5358	24,7959	24,8363	35,1153
6	25,0041	47,8547	53,2092	69,9595
8	38,2014	79,361	94,0878	112,0648
10	51,9451	103,7898	129,0564	147,7485
12	69,2562	126,3028	159,1498	176,4037

Vergleich der Extinktionskurven einer gefilterten und einer ungefilterten Probe

Wellenlängen (nm)	Extinktion (gefiltert)	Extinktion (ungefiltert)
400	0,5709	0,6315
440	0,4647	0,5269
480	0,3725	0,4298
520	0,3019	0,3499
560	0,2566	0,3024
600	0,2209	0,2622
640	0,1927	0,2303
680	0,1703	0,2038
720	0,1511	0,1814
760	0,1353	0,1626
800	0,1216	0,1466

Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer

Zeit (h)	15 mM Trp Biomasse (%)	15 mM Gly Biomasse (%)	7,5 mM Trp & 7,5 mM Gly Biomasse (%)
0	100	100	100
2,1	84,93	137,11	120,75
4,2	96,58	160,82	132,08
6	113,01	132,99	154,72
8,1	101,37	179,38	139,62
10,2	76,03	138,14	183,02
12,1	65,07	174,23	107,55
14,2	89,04	120,62	120,75
17,25	78,82	189,69	128,3
19,33	93,15	136,08	150
22,75	88,36	130,93	172,64
24,75	134,25	204,12	118,87
26,8	91,1	172,16	123,58
29	72,6	168,04	116,98
30,9	69,86	94,85	163,21
33,1	98,63	346,39	104,72
46,1	108,22	582,47	133,02
49,1	119,86	191,75	225,47
51,1	102,05	294,85	153,77
53,1	99,32	171,13	124,53
54,9	68,49	219,59	153,77
70,6	85,62	197,94	142,45
72,1	104,11	278,35	158,49
74,75	91,1	241,24	150,94

Zellzahlbestimmung nach der indirekten Methode (Trockengewichtbestimmung)

Zeit (h)	2T Biomasse (%)	3T Biomasse (%)	4T Biomasse (%)
0	0	0	0
2	7,1	8,13	7,64
4	12,71	15,04	12,34
6	14,79	19,92	15,76
8	17,64	19,43	16,64
10	18,14	17,97	17,28
22	17,89	19,67	20,38

2,5 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Zeit (h)	2T Gewicht t	3T Gewicht t	4T Gewicht t	2T Extinktion	3T extinktion	4T Extinktion	pH 2T	pH 3T	pH 4T
0	0,01576	0,01541	0,01523	0	0	0	5,19	5,2	5,2
2	0,01568	0,01563	0,0155	9,6931	8,7369	10,3776	5,2	5,2	5,2
4	0,01612	0,01598	0,01624	22,8263	26,5774	24,5539	5,25	5,24	5,21
6	0,01653	0,01583	0,01635	32,435	35,6652	31,0237	5,31	5,33	5,28
8	0,01672	0,01663	0,0161	41,4271	43,566	37,907	5,4	5,41	5,37
10	0,01683	0,0166	0,01734	45,8046	53,3645	46,7203	5,44	5,46	5,42

15 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Zeit (h)	1G Extinktion	2G Extinktion	3G Extinktion	1G Gewicht (g)	2G Gewicht (g)	3G Gewicht (g)	1 pH	2 pH	3 pH
0	0	0	0	0,01493	0,0151	0,01373	5,18	5,18	5,18
2	10,034	16,3629	10,1426	0,01621	0,01693	0,01553	5,34	5,21	5,18
4	25,0381	33,8109	25,6441	0,01666	0,01687	0,01684	5,65	5,6	5,58
6	35,3411	39,5949	33,175	0,01724	0,01687	0,01765	5,84	5,7	5,75

8	40,636	45,633	35,5765	0,01771	0,01921	0,01839	5,94	5,81	5,78
10	40,2078	49,799	36,8966	0,01825	0,02015	0,019	5,94	5,77	5,74

45 mM GLY und 1 Mio. Zellen

Zeit (h)	1G Extinktion	2G Extinktion	3G Extinktion	1G Gewicht (g)	2G Gewicht (g)	3G Gewicht (g)	1G pH	2G pH	3G pH
0	0	0	0	0,0148	0,01455	0,01527	5,16	5,18	5,16
2	17,9829	14,6175	11,4503	0,01629	0,01587	0,01659	5,22	5,24	5,2
4	42,1289	25,4463	27,324	0,01693	0,01784	0,01857	5,58	5,6	5,62
6	48,6755	27,2992	29,3522	0,01896	0,01818	0,01962	5,81	5,83	5,68
8	58,239	30,0296	22,9842	0,0209	0,01947	0,02137	5,97	5,9	5,89
10	73,0895	49,0793	23,1649	0,02321	0,02211	0,0221	6,26	5,89	6,01

30 mM TRP und 1 Mio. Zellen

Zeit (h)	2T Extinktion	3T Extinktion	4T Extinktion	2T Gewicht (g)	3T Gewicht (g)	4T Gewicht (g)	2T pH	3T pH	4T pH
0	0	0	0	0,01196	0,0123	0,01256	5,2	5,22	5,26
2	29,9858	46,3412	37,427	0,01281	0,0133	0,01352	4,81	4,72	4,8
4	87,0252	80,1318	83,3154	0,01348	0,01415	0,01411	4,54	4,54	4,57
6	134,6479	125,3041	129,3301	0,01373	0,01475	0,01454	4,34	4,39	4,39
8	176,9996	165,08	180,1899	0,01407	0,01469	0,01465	4,23	4,27	4,26
10	221,1626	207,8642	232,0458	0,01413	0,01451	0,01473	4,21	4,24	4,21
22	310,2534	266,1396	370,6992	0,0141	0,01472	0,01512	4,15	4,14	4,13

45 mM TRP und 500.000 Zellen

Zeit (h)	2T Extinktion	3T Extinktion	4T Extinktion	2T Gewicht (g)	3T Gewicht (g)	4T Gewicht (g)	2T pH	3T pH	4T pH
0	0	0	0	0,02923	0,02725	0,033	5,11	5,11	5,12
2	31,2504	29,35	31,9123	0,03099	0,02807	0,03485	4,61	4,59	4,6
4	86,2593	100,5423	82,0078		0,0285	0,034	4,37	4,36	4,36
6	162,4363	174,8403	146,0965	0,03291	0,02991	0,03474	4,27	4,26	4,26
8	261,9705	268,6733	241,5781	0,03168	0,02901	0,0346	4,25	4,25	4,25
10	348,5531	339,7561	318,2633	0,0329	0,02873	0,03536	4,24	4,22	4,22

30 mM TRP und 250.000 Zellen

Zeit (h)	2T Extinktion	3T Extinktion	4T Extinktion	2T Gewicht (g)	3T Gewicht (g)	4T Gewicht (g)	2T pH	3T pH	4T (pH)
0	0	0	0	0,0109	0,0109	0,01076	5,14	5,14	5,14
2	37,674	47,3497	32,3484	0,01169	0,01145	0,01123	4,65	4,77	4,71
4	113,2639	82,8475	88,7618	0,01177	0,01173	0,01181	4,44	4,6	4,5
6	176,9423	128,2623	143,1174	0,0114	0,01186	0,01158	4,35	4,49	4,37
8	214,4734	175,1092	183,1179	0,01134	0,01198	0,01141	4,31	4,39	4,3
10	242,9716	234,3182	254,4488	0,01119	0,01191	0,0112	4,31	4,33	4,3
24,5	364,341	365,408	324,9528				4,22	4,26	4,22

15 mM TRP und 1 Mio. Zellen

Zeit (h)	2T Extinktion	3T Extinktion	4T Extinktion	2T Gewicht (g)	3T Gewicht (g)	4T Gewicht (g)	2T pH	3T pH	4T pH
0	0	0	0	0,03099	0,02943	0,03124	5,32	5,32	5,28
2	19,0486	70,6202	65,7715	0,03231	0,02999	0,03259	5,1	5,11	4,47
4	86,4105	83,7917	155,261	0,03366	0,03387	0,03166	4,78	4,75	4,43
6	193,4776	180,2962	352,5672	0,03524	0,03501	0,0344	4,58	4,52	4,08
8	276,0476	337,286	523,3989	0,03444	0,03598	0,03485	4,33	4,31	3,98
10	484,9928	435,0274	608,7249	0,03607	0,03595	0,03538	4,17	4,19	3,95

15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

Zeit	100.000 Extinktion	500.000 Extinktion	1 Mio. Extinktion	2 Mio. Extinktion	100.000 Gewicht t (g)	500.000 Gewicht t (g)	1 Mio. Gewicht t (g)	2 Mio. Gewicht (g)
0	0	0	0	0	1,68	6,99	14,28	28,79
3	13,3013	24,5578	56,4817	107,9472	2,01	8,74	14,98	29,57
6	29,2534	51,6615	86,7476	145,4961	2,08	9,16	15,88	29,66
9	48,3772	82,2989	121,8848	174,5385	2,16	9,31	16,98	29,71
12	64,1429	159,0627	147,4301	167,3755	2,04	9,36	16,85	30,39
15	84,158	241,8533	162,4128	191,2949	2,05	9,26	18,1	30,58
21	110,3566	355,7928	192,3226	189,8182	2,07	9,31	18,78	32,04
24	139,2154	427,1266	170,3722	148,825	2,02	9,48	18,97	32,84

Zeit h)	pH 100.000	pH 500.000	pH 1 Mio.	pH 2 Mio.
0	5,12	4,82	4,78	4,78
3	4,51	3,97	4,49	4,51
6	4,07	3,8	4,45	4,77
9	4,06	3,7	4,18	4,64
12	4,06	3,69	4,02	4,6
15	4,01	3,67	3,83	4,62
21	4,1	3,63	3,72	4,42
24	4,02	3,64	3,6	4,26

15 mM TRP und 100.000 / 500.000 / 1 Mio. / 2 Mio. Zellen

Zeit	100.000 Extinktion	500.000 Extinktion	1 Mio. Extinktion	2 Mio. Extinktion
0	0	0	0	0
3	5,5284	24,187	29,7711	68,9429
6	15,6989	63,9831	64,1659	98,4259
9	28,229	106,8025	294,3316	223,2735
24	72,8968	1010,3173	1224,7066	1611,4055

Zeit	100.000 Gewicht (g)	500.000 Gewicht (g)	1 Mio. Gewicht (g)	2 Mio. Gewicht (g)	100.000 pH	500.000 pH	1 Mio. pH	2 Mio. pH
0	0,0009	0,00408	0,0084	0,02598	5,4	5,15	5,08	5,01
3	0,0009	0,00468	0,00944	0,02968	4,96	4,01	4,1	3,7
6	0,00098	0,00477	0,01469	0,0293	4,6	3,93	3,92	3,74
9	0,00101	0,00486	0,00961	0,02884	4,5	3,95	3,89	3,71
24	0,00098	0,00489	0,01008	0,02949	4,48	3,89	3,83	3,71

15 mM TRP/ GLY und 1 Mio. Zellen in einem Diagramm

Zeit (h)	2 GLY Extinktion	3 GLY Extinktion	4 GLY Extinktion	2 TRP Extinktion	3 TRP Extinktion	4 TRP Extinktion
0	0	0	0	0	0	0
2	10,034	16,3629	10,1426	19,0486	70,6202	65,7715
4	25,0381	33,8109	25,6441	86,4105	83,7917	155,261
6	35,3411	39,5949	33,175	193,4776	180,2962	352,5672
8	40,636	45,633	35,5765	276,0476	337,286	523,3989
10	40,2078	49,799	36,8966	484,9928	435,0274	608,7249

Zeit (h)	2 GLY Gewicht (g)	3 GLY Gewicht (g)	4 GLY Gewicht (g)	2 TRP Gewicht (g)	3 TRP Gewicht (g)	4 TRP Gewicht (g)
0	0,01493	0,0151	0,01373	0,03099	0,02943	0,03124
2	0,01621	0,01693	0,01553	0,03231	0,02999	0,03259
4	0,01666	0,01687	0,01684	0,03366	0,03387	0,03166
6	0,01724	0,01687	0,01765	0,03524	0,03501	0,0344
8	0,01771	0,01921	0,01839	0,03444	0,03598	0,03485
10	0,01825	0,02015	0,019	0,03607	0,03595	0,03538

15 mM TRP und 15 mM GLY mit 1 Mio. Zellen

Zeit (h)	2TG Extinktion	3TG Extinktion	4TG Extinktion	2TG Gewicht (g)	3TG Gewicht (g)	4TG Gewicht (g)	2TG pH	3TG pH	4TG pH
0	0	0	0	0,029 98	0,028 9	0,030 35	5,05	5,02	5,03
2	110,7203	40,4986	39,1176	0,032 45	0,032 77	0,032 65	4,83	4,85	4,79
4	169,4431	85,1028	71,1169	0,035 98	0,035 8	0,034 85	4,9	5	4,92

6	218,4356	122,1976	136,0957	0,037 63	0,039 26	0,038 52	4,81	4,87	4,78
8	228,939	170,314	142,3601	0,039 82	0,038 98	0,039 32	4,45	4,52	4,59
10	224,8997	187,8433	138,3676	0,041 44	0,042 3	0,042 6	4,06	4,12	4,02
13	432,0374	336	270,8962	0,039 3	0,041 1	0,040 15	4,11	4,07	4,02
24,5	589,9202	436,6776	385,5274	0,041 83	0,044 24	0,041 68	4,17	4,16	4,12
32,5	758,1926	422,5896	365,4126	0,039 59	0,042 41	0,043 35	4,39	4,41	4,33

7,5 mM TRP mit 7,5 mM GLY nach 12 h und 250.000 Zellen

Zeit (h)	1T Extinktion	3T Extinktion	4T Extinktion	1T Gewicht t (g)	3TG Gewicht t (g)	4TG Gewicht t (g)	1TG pH	3T G pH	4T G pH
0	0	0	0	0,00844	0,00846	0,00835	4,75	4,76	4,75
3	46,0466	54,8296	46,2083	0,009	0,00871	0,00881	4,13	4,11	4,08
6	95,5248	108,1566	102,298	0,00906	0,00889	0,00952	4,05	4,06	4,04
9	141,2512	149,2563	144,6526	0,00876	0,00905	0,00944	4,06	4,06	4,06
12	179,2879	183,9863	178,1604	0,00882	0,00879	0,00893	4,09	4,1	4,09
14	200,8311	201,2876	194,6603	0,00876	0,00884	0,00868	4,07	4,19	4,19
16	225,0504	218,3573	210,829	0,0094	0,0095	0,00946	4,09	4,2	4,2
18	252,3916	242,3086	220,0674	0,00881	0,00938	0,00922	4,07	4,2	4,17
20	270,1928	247,3948	244,1814	0,01186	0,00987	0,00927	4,07	4,17	4,15
23	283,1748	258,097	257,4526	0,00876	0,01025	0,0108	4,09	4,1	4,09
26	302,5124	275,9012	271,8822	0,00845	0,01186	0,01166	4,09	3,99	4,01
29	315,2642	288,86	290,9612	0,00927	0,01316	0,01332	4,14	3,9	3,91

32	328,5908	338,2404	336,0996	0,00987	0,01409	0,01413	4,11	3,89	3,87
35	333,3594	371,9686	372,4752	0,00899	0,01365	0,01347	4,11	3,92	3,93
56	358,1058	446,2236	420,7576	0,01039	0,01553	0,0148	4,04 0	4,12	4,15

7,5 mM TRP mit 7,5 mM GLY nach 8 h und 250.000 Zellen

Zeit (h)	1T Extinktion	2T Extinktion	3T Extinktion	1T pH	3T pH	5T pH
0	0	0	0	5,08	5,09	
3	30,0321	29,1499	31,8954	4,7	4,74	
6	69,8571	61,3712	66,6993	4,57	4,58	
8	85,5059	79,3732	85,0144	4,52	4,54	
10	96,6252	96,6462	99,3941	4,53	4,61	4,6
14,25	113,1921	128,1199	120,7145	4,47	4,64	4,56
17,25	116,1965	138,4489	135,422	4,47	4,65	4,55
20,25	118,2379	165,7071	142,1601	4,46	4,59	4,42
23,25	121,0657	198,4511	149,2124	4,4	4,43	4,23
26,25	145,49	217,037	163,7985	4,25	3,97	4,07
29,25	172,7225	235,8345	171,8494	4,37	4,02	4,03
32,25	202,9538	248,1883	180,2743	4,33	4,03	4,05
35,25	236,6711	260,152	182,143	4,29	4,08	4,14
49,75	358,6714	366,8398	207,4269	4,25	4,21	4,21

15 mM TRP mit 3 mM GLY nach 9 und 15 h und 1 Mio. Zellen

Zeit	Extinktion ohne Gly	Extinktion mit Gly nach 6h	Extinktion mit Gly nach 9h	pH ohne Gly	pH mit Gly nach 6h	pH mit Gly nach 9h	Biomasse (g) ohne Gly	Biomasse (g) mit Gly nach 6h	Biomasse (g) mit Gly nach 9h
0	0			5,25			0,01253		
2	29,9107			5,15			0,01293		
5	135,2019			5,17			0,01271		
7	115,0674			5,2			0,01298		
9	209,1714			5,22	5,22		0,01211	0,01211	
10	300,8306	287,3132		5,2	5,13		0,01257	0,0125	
11	386,5296	259,7324		5,19	5,06		0,01248	0,01307	
13	384,4413	342,3847		5,3	5,13		0,0124	0,01326	
15	417,9059	333,1346		5,25	4,98	5,25	0,01221	0,01358	0,01221
17	474,1601	272,7574	476,3433	5,24	4,96	5,07	0,01248	0,01472	0,01262
20	519,0541	286,156	452,1799	5,25	5,03	5,12	0,01219	0,01601	0,01393
26	584,6652	206,3782	335,9122	5,26	4,83	4,85	0,0127	0,01732	0,01561

15 mM TRP / 15 mM GLY / 7,5 mM TRP & 7,5 mM GLY und 200.000 Zellen

Zeit (h)	TRP Extinktion	GLY Extinktion	TRP&GLY Extinktion	TRP Zellzahl	GLY Zellzahl	TRP&GLY Zellzahl	TRP pH	GLY pH	TRP & GLY pH
0	0	0	0	200.000	200.000	200.000	5,19	5,26	5,17
2	0,3414	2,9194	2,1726	240000	230000	265000	5,04	5,14	5,14
4	4,1671	1,1126	6,0374	210000	235000	230000	4,4	4,83	4,59
6	14,6685	1,3531	10,6376	255000	330000	425000	4,25	4,72	4,29

8	28,6959	38,739	13,6869	260000	325000	325000	3,97	5,03	4
10	43,5903	70,7822	16,3854	325000	375000	415000	4,08	4,77	3,92
12,1									
6	63,5378	68,8815	18,5375	275000	525000	560000	4,12	5,2	4,05
14,7									
5	83,2405	127,9569	31,0078	290000	660000	600000	4,09	5,4	4,16
20	172,8161	171,5104	114,6762	250000	945000	720000	4,06	5,72	3,93
21,8									
3	225,4042	85,8934	112,2078	235000	910000	710000	4,02	5,12	3,84
26	348,2992	177,8516	279,3631	315000	815000	380000	4,04	5,17	3,91
29,8									
3	412,2992	49,4243	472,2377	205000	770000	380000	4,01	4,11	4,06
33,8									
3	371,6331	31,2288	601,4321	310000	520000	445000	4,02	4,01	3,93
35,1									
6	539,0704	14,0337	712,1944	285000	520000	235000	4,12	4,08	4,03
37,5	564,0335	11,7641	882,4973	285000	565000	390000	4,13	4,04	4,13
43,5	652,2581	5,3366	922,8567	225000	675000	495000	4,09	3,85	4,02
49	720,7254	8,2855	1084,8071	405000	800000	415000	3,96	3,8	4,03
50,5	703,4592	5,0644	1120,1352						

15 mM TRP / 15 mM GLY / je 7,5 mM GLY & TRP und 500.000 Zellen

Zeit (h)	15 mM Trp Extinktion	15 mM Gly Extinktion	7,5 mM Trp & 7,5 mM Gly Extinktion	15 mM Trp Biomasse (%)	15 mM Gly Biomasse (%)	7,5 mM Trp & 7,5 mM Gly Biomasse (%)	15 mM Trp pH	15 mM Gly pH	7,5 mM Trp & 7,5 mM Gly pH
0	0	0	0	100	100	100	4,35	4,49	4,43

2,1	4,1891	11,1704		84,93	137,11	120,75	4,3	5,02	4,54
4,2	8,0737	91,8297		96,58	160,82	132,08	4,15	5,33	4,63
6	12,0696	150,3062	90,7344	113,01	132,99	154,72	3,93	5,46	4,59
8,1	16,4555	238,0817	127,045	101,37	179,38	139,62	3,9	5,54	4,41
10,2	22,2282	243,9242	157,8614	76,03	138,14	183,02	3,93	5,59	4,5
12,1	43,9006	279,7903	189,1243	65,07	174,23	107,55	3,83	5,62	4,45
14,2	78,397	287,5074	239,1938	89,04	120,62	120,75	3,84	5,65	4,52
17,25	131,4159	259,4321	262,4014	78,82	189,69	128,3	3,85	5,65	4,55
19,33	156,6101	252,488	267,5516	93,15	136,08	150	3,86	5,31	4,36
22,75	218,6722	237,5394	277,3282	88,36	130,93	172,64	3,87	5,22	3,92
24,75	226,8605	152,9817	276,2951	134,25	204,12	118,87	3,86	5,07	3,9
26,8	258,3316	112,3443	211,2533	91,1	172,16	123,58	3,85	5,04	3,92
29	277,7805	120,0087	215,6328	72,6	168,04	116,98	3,86	4,77	3,89
30,9	300,002	96,7796	224,3272	69,86	94,85	163,21	3,87	4,43	3,87
33,1	360,32	66,741	192,2305	98,63	346,39	104,72	3,91	4,06	3,92
46,1	501,9239	45,5905	371,6609	108,22	582,47	133,02	3,89	3,91	3,9
49,1	477,5022	27,8344	383,0406	119,86	191,75	225,47	3,93	3,89	3,93
51,1	517,0032	26,1857	414,2347	102,05	294,85	153,77	3,96	3,85	3,93
53,1	545,0975	27,3731	413,995	99,32	171,13	124,53	3,93	3,8	3,95
54,9	426,1985	24,2826	379,053	68,49	219,59	153,77	4,06	3,89	4,02
70,6	593,9436	17,9765	409,4044	85,62	197,94	142,45			
72,1	591,0756	18,0123	385,0706	104,11	278,35	158,49	4,06	3,95	4,08
74,75	569,6868	18,2795	400,007	91,1	241,24	150,94			

Danksagung:

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Mayser bedanken, einerseits für das interessante Dissertationsthema, andererseits auch für sein großes Engagement, seine tollen Ideen und seine schier unendliche Geduld.

Ich danke auch Frau Dr. Wiebke Thoma und PD Dr. med. Hans-Joachim Krämer für Ihre Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Versuche und bei den Veröffentlichungen.

Ich danke auch Frau Ursula Förste, die mir die Grundkenntnisse der Laborarbeit vermittelt hat und mir stets eine große Hilfe war.

Nicht vergessen möchte ich PD Dr. Günter Lochnit, der mir bei meinen photometrischen Untersuchungen mit Rat und Tat zu Seite stand.

Ein Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Robert König, Thibaud von Reutern und Dipl. Inform. Jan Künzel, die mir bei der statistischen Auswertung eine große Hilfe waren.

Als letztes möchte ich meinen Eltern für Ihre Unterstützung meines Studium und meiner Dissertation danken, sowie meiner Frau und meiner Tochter, die mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen sind und stets an mich geglaubt haben.