

Aus dem Institut für Virologie
des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Becker



**Glykosylphosphatidylinositole bei *Trichophyton rubrum*:
Identifizierung und Charakterisierung**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrike Wagner

aus Arnstadt/Thür.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 30. Oktober 2008

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. T. Schwarz

Korreferent: Prof. Dr. R. Jacob

Die vorliegende Arbeit wurde unter folgendem Titel veröffentlicht:

Pusch, U., Effendy, I., Schwarz, R.T. und Azzouz, N. (2001)

Glycosylphosphatidylinositols synthesized by *Trichophyton rubrum* in cell free system. *Mycoses*, **44**, 215

Vortrag:

Pusch, U., Effendy, I., Schwarz, R.T. und Azzouz, N.

„Glykosylphosphatidylinositole bei *Trichophyton rubrum*: Identifizierung und Charakterisierung.“

35. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., MYK 2001, 13.-15. September 2001, Marburg.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Humanpathogene Pilze-historischer Überblick	3
2.2	Pilze als Krankheitsursache	4
2.3	Infektion durch <i>Trichophyton rubrum</i>	5
2.3.1	Epidemiologie	5
2.3.2	Pathophysiologie von <i>Trichophyton rubrum</i>	6
2.4	Isolierung und Identifizierung von <i>Trichophyton rubrum</i>	8
2.4.1	Identifizierung von <i>T. rubrum</i> anhand des nativen Präparats	8
2.4.2	Identifizierung von <i>T. rubrum</i> durch das Anlegen einer Kultur	9
2.4.3	Weitere Testverfahren zur Identifizierung von <i>T. rubrum</i>	12
2.5	Das klinische Erscheinungsbild von <i>T. rubrum</i>	12
2.5.1	Tinea pedis	13
2.6	Glykosylphosphatidylinositle (GPI)	18
2.6.1	Struktur der GPIs	18
2.6.2	Biosynthese des GPI-Ankers	19
2.6.3	Funktion der GPIs	21
2.7	Zielsetzung der Arbeit	23
3.	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Plastikwaren	25
3.1.3	Chemikalien	25
3.1.4	Radioaktive Substanzen	25
3.1.5	Enzyme	26
3.1.6	Agarplatten	26
3.2	Methoden	26
3.2.1	Kultivierung von <i>Trichophyton rubrum</i>	26
3.2.1.1	Herstellung des Kulturmediums	26
3.2.1.2	Beimpfung des Kulturmediums	27

3.2.2	Metabolische Markierung von <i>T. rubrum</i> -Glykolipide im zellfreien System	27
3.2.2.1	Herstellung eines zellfreien Systems	28
3.2.2.2	Metabolische Markierung	29
3.2.3	Extraktion der Glykolipide	30
3.2.3.1	Extraktion mit organischen Lösungsmitteln	30
3.2.3.2	Bestimmung der Markierungseffizienz mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler	31
3.2.4	Dünnschichtchromatographie	31
3.2.4.1	Vorbereitung der Chromatographieplatten	31
3.2.4.2	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glykolipide	32
3.2.4.3	Detektion der Radioaktivität auf Kieselgel-Platten	33
3.2.5	Identifikation der Glykolipide	33
3.2.5.1	Elution der Glykolipide aus Kieselgel-Platten	33
3.2.5.2	Enzymatische und Chemische Spaltung	34
3.2.5.2.1	Spaltung mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC)	35
3.2.5.2.2	Spaltung mit Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase D (GPI-PLD)	35
3.2.5.2.3	Spaltung mit salpetriger Säure (HNO ₂)	36
3.2.5.2.4	Milde Alkalische Hydrolyse	36
3.2.6	Identifizierung von Dolichol-Phosphat-Mannose	37
3.2.6.1	Versuch der Spaltung mit HNO ₂ , PI-PLC und α -Mannosidase (Jack bean)	37
3.2.6.2	Metabolische Markierung der <i>T. rubrum</i> -Glykolipide	37
3.2.6.3	Analyse von Dolichol-Phosphat-Monosacchariden mittels Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose	37
3.2.7	Untersuchung neutraler Core-Glykane	38
3.2.7.1	Spaltung mit wässriger Flusssäure (HF) zur Darstellung neutraler Core-Glykane	38
3.2.7.2	Spaltung mit α -Mannosidase (Jack bean) und Spaltung mit <i>A. saitoi</i> α -1-2-Mannosidase	39
3.2.7.3	Spaltung mit α -Galaktosidase	40
3.2.7.4	Spaltung mit β -Galaktosidase	40
3.2.7.5	Dionex-HPAEC (high-pH-anion-exchange-chromatography)	40
3.2.7.6	Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie	42

4.	Ergebnisse	43
4.1	Metabolische Markierung von <i>T. rubrum</i>-Glykolipide im zellfreien System	43
4.2	Identifizierung der dünnenschichtchromatographisch aufgetrennten Glykolipide	45
4.3	Charakterisierung des „Glykolipids VII“	47
4.3.1	Auswertung der radioaktiv markierten Glykolipide von <i>T. rubrum</i> im zellfreien System mit dem Zusatz von Amphomycin	49
4.3.2	Auswertung der Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose	51
4.4	Analyse der durch Spaltung mit wässriger Flusssäure dargestellten neutralen Core-Glykane der GPIs	52
4.4.1	Dionex-HPAEC Analyse	52
4.4.2	Auswertung der Core-Glykane mit Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie	54
4.5	Untersuchung zum Einbau von Galaktose als mögliche Modifikation	56
5.	Diskussion	59
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Abkürzungen	83
8.	Anhang	
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	I
8.2	Danksagung	II

1. Zusammenfassung

Trichophyton rubrum ist ein parasitärer Einzeller mit medizinischer Bedeutung. Er wird den antropophilen Dermatophyten zugeordnet. Der humanpathogene Pilz infiltrierte vor allem keratinhaltiges Gewebe und zählt zu den häufigsten Erregern der Dermatophyteninfektion. Dazu zählen unter anderem Tinea corporis, Tinea cruris oder die Onychomykose. Doch zu der weltweit häufigsten Erkrankung zählt Tinea pedis, der so genannte „Athletenfuß“. Vor allem bei chronisch erkrankten Patienten (zum Beispiel bei Diabetes mellitus) oder immunsupprimierten Patienten (zum Beispiel bei AIDS) kann es zu unangenehmen Krankheitserscheinungen mit Juckreiz, Schmerzen, Hautmazerationen bis zu bakteriellen Superinfektionen kommen. Bisherige therapeutische Ansätze zur Bekämpfung der Erreger richten sich in erster Linie gegen den funktionellen Aufbau der Pilze. Dabei könnten auch Glykosylphosphatidylinositole eine wesentliche Rolle spielen. Bei einer Vielzahl anderer Pilze und Hefen sind posttranslationale Modifikationen von Oberflächenproteinen durch GPIs für die Zellwandsynthese erforderlich. GPIs bestehen aus einer evolutionär-konservierten hydrophilen Glykan-Grundstruktur. An ein Ethanolaminphosphat, über welches das Protein gebunden werden kann, schliessen sich drei alpha-gebundene Mannosen an. Es folgt ein nicht-acetyliertes Glukosamin. An das anschliessende Inositolphosphat ist der Lipidanteil gebunden, welcher zumeist aus an Glycerol gebundenen Fettsäuren besteht. Der Glykan- als auch der Lipidanteil können durch verschiedensten Modifikationen Unterschiede bei den einzelnen Organismen aufweisen. So zum Beispiel durch den Einbau einer vierten Mannose in die Glykanstruktur bei *Plasmodium falciparum*. Bei *Aspergillus fumigatus* findet sich anstatt der an Glycerol gebundenen Fettsäuren ein Ceramid im hydrophoben Anteil.

Um einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt zur Bekämpfung von *T. rubrum*-Infektionen zu schaffen, sind Kenntnisse über das Vorhandensein von GPIs in *Trichophyton rubrum* und deren Struktur notwendig.

In dieser Arbeit wurden erstmals Grundzüge der Struktur und der Biosynthese der Glykosylphosphatidylinositole bei *Trichophyton rubrum* untersucht. Durch hypotone Behandlung wird die Zellmembran effektiv permeabilisiert und die nicht markierten GPIs extrahiert. In einem zellfreien System werden diese einer spezifischen Markierung unterzogen. Dazu werden GDP-[³H]Mannose und UDP-[³H]Galaktose, radioaktive

Bausteine des GPI-Ankers, verwendet. Die markierten Glykolipide können anhand spezifischer enzymatischer Behandlungen und chemischen Hydrolysen charakterisiert werden und mit bereits vorhandenen Daten verglichen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals, dass *Trichophyton rubrum* Glykosylphosphatidylinositole synthetisiert. Die markierten Glykolipide zeigen das evolutionär-konservierte Grundgerüst mit einem Ethanolaminphosphat, drei alpha-gebundenen Mannosen, einem nicht-acetyliertem Glukosamin, einem Inositolphosphat und an ein Glycerol gebundene Fettsäuren. Zusätzlich findet sich als Modifikation des Glykananteils der Einbau einer Galaktose in Form einer Galaktofuranose oder Galaktopyranose. Dabei kann gezeigt werden, dass Galaktose, im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* und Säugetierzellen, in einer labilen Bindung eingebaut wird. Dies lässt den Schluss zu, dass die Biosynthesewege in den verschiedenen Organismen signifikante Unterschiede aufweisen. Basierend auf diesen Daten könnten möglicherweise spezifische Inhibitoren im Sinne neuer Antimykotika entwickelt werden, welche die Biosynthese von GPIs bei *T. rubrum* hemmen, ohne jedoch in die GPI-Biosynthese der befallenen Wirtszelle einzugreifen.

2. Einleitung

2.1 Humanpathogene Pilze-historischer Überblick

Pilze (*Mycophyta*, *Fungi*), welche früher zu der Pflanzenwelt gezählt wurden, bilden heute mit rund 100.000 Arten ihr eigenes Reich. Von diesen 100.000 sind jedoch nur ca. 100 Arten für den Menschen pathogen.

Die Entwicklung der Mykologie begann Mitte des 17. Jahrhunderts, als R. Hooke filamentöse Organismen in der „Gelbfleckenkrankheit“ der Rosenblätter entdeckte, in denen er kontagiöse Erreger vermutete (Hooke, 1665). 1729 wurde von P. A. Michelli die Gattung *Aspergillus* erstmals beschrieben (Diaz Sanches und Lopez Vina, 2004) und durch J.H.F. Link wurde dieser 1809 als *Aspergillus flavus* benannt und näher untersucht. Die Humanmykologie findet ihren Ursprung 1835, als Remak Pilzfäden in den Favusborken fand. Diese Ergebnisse wurden in der Dissertation seines Freundes X. Hube 1837 erwähnt. Schönlein wies als erster 1839 mit seiner Publikation „Zur Pathogenität der *Impitigenes*“ auf den parasitären Charakter pflanzlicher Mikroorganismen beim Menschen hin (Schoenlein, 1839). 1839-41 erfolgte die Identifizierung des Soorerregers durch Langenbeck und Berg. Malmsten beschrieb 1845 einen in den Haaren wachsenden Pilz und bezeichnete diesen als *Trichophyton tonsurans* (Miescher, 1928). Auch bei Tieren entdeckten 1853 Banley und Raynal erstmals Dermatomykosen. Im Jahre 1856 demonstrierte R. Virchow eine Aspergillose der inneren Organe und prägte in diesem Jahr erstmals den Ausdruck „Mykose“. Die Unterscheidung zwischen Schimmelpilzen und *Trichophyton* erfolgte 1864 durch H. Köbner, indem er jeweils eine Zellkultur animpfte und Untersuchungen daran vornahm. Sabouraud beginnt um 1890 mit seinen mykologischen Untersuchungen und veröffentlicht 1910 seine Erkenntnisse in dem Werk „Les Teignes“ (Sabouraud, 1910). Mit der Entdeckung des Penicillins 1928 durch A. Fleming als myzetogenen antibiotischen Wirkstoff erfolgten weiter Untersuchungen für neuere Therapiemöglichkeiten.

2.2 Pilze als Krankheitsursache

Die Feinstruktur der Pilze ist sehr komplex, im Grundaufbau jedoch ähnlich. Neben der Zellwand besitzen sie eine Plasmamembran, ein Zytoplasma sowie einen Zellkern. Die Zellwand schützt den Pilz vor der Abwehrreaktion des Wirtes. Sie ist starr und hart und verläuft parallel, sodass die Hyphen eine zylindrische Struktur annehmen. Sie ist unterschiedlich beschaffen und besteht zumeist aus einer äusseren amorphen Matrix, welche aus Glukanen, hauptsächlich aus beta(1,3)-Glykanen, z. B. in *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida* (Douglas, 2001) und in *Saccharomyces* zusätzlich aus beta(1,6)-Glykanen zusammengesetzt ist (Popolo und Vai, 1999). Zusätzlich sind Zellwandproteine (CWPs) über kovalente Bindungen an die Glykane gebunden, z. B. GPI-CWPs und Pir-CWPs in *Saccharomyces cerevisiae* (Kapteyn *et al.*, 1999), sowie Mannoproteine in *Saccharomyces* (Popolo und Vai, 1999) und Galaktomannan in *Aspergillus fumigatus* (Bernard und Latge, 2001). Mannan, ein Zellwandglykoprotein besteht aus $\alpha(1,6)$ -Mannose-Einheiten und $\alpha(1,2)$ -Mannose Seitenketten (Ikuta *et al.*, 1997). Die innere fibröse Komponente besteht aus Chitin, welches ebenfalls kovalent mit den Glykanen verbunden ist. In einigen Hefepilzen findet man die zusätzliche Ausbildung einer Polysaccharidkapsel. Zu den wesentlichen Bestandteilen der Zellmembran gehören die Sterine, genauer die Ergosterine. Ergosterin trägt zur Stabilisierung der Zellmembran bei, indem die Permeabilität herabgesetzt wird. Dies ist die Voraussetzung für das Zellwachstum und die Vermehrung.

Pilze können in unterschiedlicher Weise den Organismus schädigen, einmal durch eine Vergiftung des Organismus mit Hilfe von Stoffwechselprodukten der Pilze (Mykotoxikose), weiterhin durch die Überempfindlichkeit gegen an sich unschädlichen Pilzinhaltsstoffen, myzetische Allergene (Mykoallergosen) und drittens durch die Infektion pathogener Erreger (Mykose).

In der Normalflora des Menschen lassen sich opportunistisch lebende Pilze nachweisen. Dazu gehört u. a. *Candida albicans*, ein Hefepilz, welcher in der normalen Mund-, Intestinal- sowie Vaginalflora angesiedelt ist oder auch der opportunistische Erreger *Aspergillus fumigatus*. Sind diese Erreger Infektionsauslöser, so werden diese als endogene Mykosen bezeichnet. Erfolgt eine Infektion mit primär pathogenen Erregern (z. B. *Histoplasma capsularum*), so werden diese als exogene Mykose bezeichnet.

Der gesunde Organismus besitzt einen hohen natürlichen immunologischen Schutz gegenüber Pilzinfektionen. Die Abwehrlage ist abhängig von genetischen Faktoren,

Gesundheit, Alter, Geschlecht, Ernährung und dem hormonellen Gleichgewicht. Ausserdem verhindern eine chemische Barriere, die intakte Haut und Schleimhaut und die Sekretion fungizider Bestandteile in Schweiß und Talg eine Infektion durch Pilze. Zusätzlich findet man spezielle anatomische Gegebenheiten, wie z. B. Zilien im Respirationstrakt, die einer Besiedelung mit Pilzen vorbeugen. Liegt eine Abwehrschwäche vor, infolge von Infektionen (HIV-Infektion), nach Einnahme von Antibiotika, Immunsuppressiva oder von Corticoiden, kann sich eine Mykose entwickeln. Zu den endogenen prädisponierende Faktoren gehören u. a. Endokrinopathien (Diabetes mellitus, M. Cushing), Immunopathien, Malignome und Durchblutungsstörungen. Auch hängt die Pathogenität der Pilze von der Hautbeschaffenheit des Organismus ab. Ist die Haut, welche als natürliche Barriere für Krankheitserreger dient, nicht mehr intakt, liegen Verhornungsstörungen oder Durchblutungsstörungen vor, kommt es leicht zur Besiedelung und zum Eindringen von Pilzen in den Organismus. Auch durch falsche Kleidung (Gummi- oder Kunststoffschuhe) und ungenügende Hygiene entsteht ein günstiges Milieu zum Wachstum von Pilzen (Feuchtigkeits- und Wärmestau).

2.3 Infektion durch *Trichophyton rubrum*

2.3.1 Epidemiologie

Trichophyton rubrum wird den Dermatophyten zugeordnet. Dermatophyten sind Pilze, welche als parasitäre Einzeller in keratinhaltigen Geweben leben. Sie sind Verursacher von superfiziellen Mykosen, sie sind also nicht in der Lage, tiefere Gewebe und Organe zu penetrieren (Dei Cas und Vernes, 1986; King *et al.*, 1975).

Dermatophyten sind weltweit verbreitet, wovon einige jedoch nur in bestimmten geographischen Gebieten isoliert werden können. Nach ihrem Vorkommen kann man sie in anthropophile, zoophile und geophile Dermatophyten unterteilen (Georg, 1960; Ajello, 1962). Die anthropophilen Dermatophyten infizieren fast ausschliesslich den Menschen und werden von Person zu Person übertragen (Mayr, 1989). Die Dermatophyten lassen sich zusätzlich in drei Gattungen unterteilen. Dazu gehören Epidermophyton, Mikrosporum sowie Trichophyton (Emmons, 1934).

R. Sabouraud prägte erstmals den Namen *Trichophyton rubrum* 1911 (Darai *et al.*, 1998). Doch schon 1910 wurde der Pilz von Bang beschrieben, welcher dafür das

Synonym *Trichophyton purpureum* verwendete. Noch im selben Jahr beschrieb Castellani den Pilz und benannte ihn *Epidermophyton rubrum* (Castellani, 1910).

Der anthropophile Pilz *Trichophyton rubrum* verursachte ursprünglich Endemien in Ostasien und in Teilen der USA, durch die Migration der Menschen kam es jedoch zur weltweiten Verbreitung (Rippon, 1988). *Trichophyton rubrum* verursacht neben *T. mentagrophytes* ca. 90% der Dermatophyteninfektionen der Haut (Hay, 1982). Vor allem sind die Leiste (*Tinea cruris*) und die Zehen bzw. Zehenzwischenräume (*Tinea pedis*) betroffen (English, 1980). Auch gehören diese zu den häufigsten Erregern von Onychomykosen (Sinski und Flouras, 1984; Summerbell *et al.*, 1989).

2.3.2 Pathophysiologie von *T. rubrum*

T. rubrum infiziert hauptsächlich den menschlichen Organismus, wodurch er den antropophilen Dermatophyten zugeordnet wird. Bei Tieren wurde er kaum isoliert. Die Übertragung erfolgt direkt von Mensch zu Mensch oder durch indirekten Kontakt mit pilzbefallener Kleidung, Teppichböden, in Schwimmbädern (Detandt und Nolard, 1988) oder Saunabetrieben. Selten wurden Übertragungen vom Tier zum Menschen beobachtet.

T. rubrum ist fast vollständig an den Menschen adaptiert. Elektronenoptische Untersuchungen zeigten, dass *T. rubrum* mit Hilfe dornähnlicher Perforationsorgane in die Wirtszelle eindringt und dort als intrazellulärer Parasit persistiert (Shetsiruli und Apridonidze, 1977).

Dermatophyten, so auch *Trichophyton rubrum* verfügen über Keratinasen (Rippon, 1988) und ein System proteolytischer Enzyme (Apodaca und McKerrow, 1989), wodurch sie in der Lage sind, die Disulfidbrücken (-S-S-) des Skleroproteins Keratin zu spalten und damit die Struktur des Keratins zu zerstören und in die tieferen Schichten der Haut einzudringen. Gleichzeitig nutzen sie die freigesetzten Metaboliten als Kohlenstoffquelle.

Dermatophyten induzieren eine zelluläre (durch T-Lymphozyten) und eine humorale (durch Makrophagen, Neutrophile, Mastzellen und Killerzellen) Immunantwort (Calderon, 1989). Dabei sind zwei Klassen von Dermatophyten-Antigenen von grosser Bedeutung. Glykopeptide, welche in der Lage sind, eine zelluläre sowie humorale Immunantwort zu induzieren (Dahl, 1993) und Keratinasen, welche eine Allergie vom Verzögerungstyp hervorrufen. Dies wurde bei Untersuchungen an Tieren festgestellt,

indem man diesen Keratinasen intradermal verabreichte (Grappel und Blank, 1972). Besteht ein Defekt in der Immunreaktion, z. B. bei HIV, kann es zu rezidivierenden Infektionen kommen bis hin zur Ausbildung einer chronischen Infektion (Jones *et al.*, 1973; Jones, 1986; Jones, 1993). Es kommt ausserdem zur Proliferation von Keratinozyten, wodurch das Stratum corneum schneller erneuert und dadurch der Pilz mit den Hautschuppen abgetragen wird (Dahl, 1993). Des Weiteren sind einige Dermatophyten in der Lage, darunter auch *Trichophyton rubrum*, die Immunreaktion zu unterdrücken. Dahl zeigte, dass Mannan, ein Zellwandglykoprotein, die Antigenproduktion und -präsentation in der Wirtszelle hemmt und damit als wesentlicher Pathogenitätsfaktor von *T. rubrum* zählt (Dahl, 1993). Es ist in der Lage, die zelluläre Immunreaktion, sowie die Keratinozytenproliferation zu unterdrücken (Dahl, 1993; 1994; Cabrera *et al.*, 1991). Auch bei chronischen Infektionen wird die zelluläre Immunantwort, insbesondere die Lymphozytenproliferation, durch *Trichophyton rubrum*-Mannan (TRM) unterdrückt (Blake *et al.*, 1991). Grando *et al.* identifizierte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Monozyten, welche hauptsächlich durch TRM supprimiert wurden (Grando *et al.*, 1992). *Trichophyton rubrum* besitzt eine geringe Pathogenität und ruft eine schwache Abwehrreaktion hervor, im Vergleich zu geophilen oder zoophilen Erregern, welche eine aggressivere und heftigere Entzündungsreaktion hervorrufen (Rippon, 1988). Blake *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass grössere Mengen an *Trichophyton rubrum*-Mannan, welche auch eine stärkere immunsupprimierende Wirkung zeigten, bei *T. rubrum* produziert werden, im Vergleich zu dem zoophilen Erreger *M. canis*, wo geringere Mengen an Mannan isoliert wurden. Dies könnte erklären, dass *T. rubrum* eine schwache Entzündungsreaktion hervorruft, es aber häufiger zur Ausbildung einer Chronizität kommt, im Vergleich zu *M. canis* (Blake *et al.*, 1991). Auch aufgrund der ständigen Anwesenheit des Pilzes im Organismus kommt es zu rezidivierenden Erkrankungserscheinungen und damit zur Chronizität der Pilzinfektion. Exogene Prädispositionsfaktoren, darunter zählen Feuchtigkeit- und Wärmestau durch falsche Kleidung oder unzureichende Hygiene, sowie endogene Prädispositionsfaktoren wie z. B. Immunopathien, Diabetes mellitus oder Durchblutungsstörungen, können zu einer erhöhten Rezidivrate führen. Bei Infektionen mit *T. rubrum* ist auch stets an eine noch nicht diagnostizierte Grunderkrankung wie z. B. Diabetes mellitus oder auch an eine HIV- Infektion zu denken.

In Ausnahmefällen kann es zu heftigen „id“-Reaktionen kommen. Als Oberbegriff beschreiben diese knötchen-, bläschenförmige Hauterscheinungen als Reaktion auf eingeschwemmtes Erregermaterial, -fragmente oder -stoffwechselprodukte. Klinisch äussert sich diese Reaktion zumeist als dyshidrotisches Palmoplantarekzem und gilt als Ausdruck einer Immunantwort auf die Pilzantigene (Fitzpatrick *et al.*, 2001) Diese Reaktion kommt allerdings bei *T. rubrum*-Infektionen im Gegensatz zu *T. mentagrophytes*-Infektionen sehr selten vor. Die von *Trichophyton* produzierten Allergene wie Serin Protease und Subtilase D sind in der Lage, eine Typ I Allergie (vom Soforttyp) und eine Typ IV Allergie (vom Verzögerungstyp) bei Atopikern auszulösen (Horner *et al.*, 1995; Woodfolk *et al.*, 1996; Woodfolk *et al.*, 1998; Woodfolk und Plattes-Mills, 2001). Dabei können die Symptome einer chronischen Dermatophyteninfektion und einer Atopie sehr ähnlich sein (Woodfolk und Platts-Mills, 1998). Interessant ist die Erkenntnis, dass *T. rubrum* in der Lage ist, Interleukine wie z. B. IL-4 oder IL-5 zu stimulieren und damit die Ig-E Synthese anzuregen, welche eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen spielt (Kanda *et al.*, 2002)

2.4 Isolierung und Identifizierung von *Trichophyton rubrum*

2.4.1 Identifizierung von *T. rubrum* anhand des nativen Präparats

Trotz falsch negativer Ergebnisse von 5-15 % ist die mikroskopische Untersuchung eine höchst effiziente Screeningmethode zur Erfassung einer Pilzinfektion (Rippon, 1988). Anhand der mikroskopischen Untersuchung kann man Aussagen über Form und Aufbau der Mikrostruktur und der Kolonisation machen (Kane und Fischer, 1975; Rebell und Taplin, 1970; Weitzman und Kane, 1991).

Dazu wird das gewonnene Probenmaterial, welches von den infizierten Haut- oder Nagelpartien entnommen wurde, zerkleinert und auf einen sauberen Objektträger gebracht. Anschliessend werden 2 Tropfen 20%ige Kalilauge daraufgegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Damit die Lauge ihre volle Wirkung entwickeln kann, wird das Präparat in eine Petrischale gelegt, deren Boden zum Schutz vor Austrocknung mit einem feuchten Fliesspapier ausgelegt ist. Dann wird die Petrischale verschlossen und 40 min inkubiert. Nach diesen 40 min ist das Material aufgeweicht und so aufgehellt, dass man das Präparat unter dem Mikroskop begutachten kann (Weitzman und Summerbell, 1995).

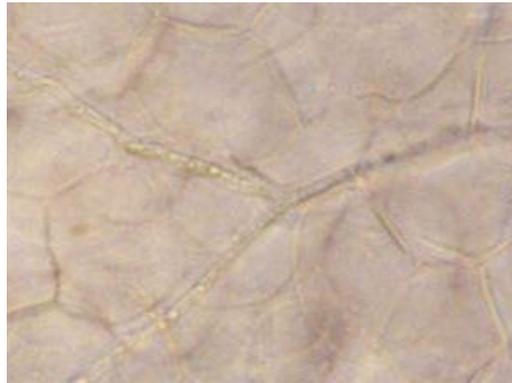


Abb. 2.1 Nativpräparat von *Trichophyton rubrum*.

Es zeigt sich ein in der Epidermis weitläufig verzweigtes Mycel. (Al Hasan *et al.*, 2004)

Trotz allem lässt das Nativpräparat keinen Schluss auf die genaue Pilzart zu. Es ist deshalb stets das Anlegen einer Kultur zur Identifizierung erforderlich.

2.4.2 Identifikation von *T. rubrum* durch das Anlegen einer Kultur

Durch das Anlegen einer Kultur ist es möglich, eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Pilzarten vorzunehmen. Die Anzucht der einzelnen Erreger erfolgt üblicherweise auf Sabouraud-2% Glukose-Agar (Weitzmann *et al.*, 1988). Dabei handelt es sich um Fertignährböden, denen Glukose als Kohlenstoffquelle und Pepton als Stickstoffquelle dient. Um bakterielles Wachstum und Verschimmelung zu verhindern werden Cycloheximid und Chloramphenicol hinzugefügt. Für die Kultivierung steht ebenfalls Selektivagar nach Kimmig zur Verfügung. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für ca. 10-20 Tage.

Die Identifikation erfolgt nun durch die Betrachtung des Kulturverhaltens, sowie durch die Untersuchung der Makro- und Mikrostrukturen. Dabei spielen Wachstumsrate und Wachstumstemperatur (Kane *et al.*, 1987; Stockdale, 1953), Pigmentation, Thallusdurchmesser, Oberflächenbeschaffenheit und der Geruch ebenfalls eine grosse Rolle.

Nach dem makroskopischen Bild kann man fünf verschiedene Varianten unterscheiden:

1. Der **flaumige Typ** ist die am häufigsten isolierte Form. Die Prädilektionsstellen sind v. a. die Epidermis und die Nagelsubstanz der Extremitäten. Die Kultur ist

weiss, flaumig mit zentraler Erhabenheit und flachem Rand. Die Farbe verändert sich mit steigendem Alter von rosa nach gelb. Auch kommen Farbvariationen von grün oder orange vor. Auf der Kulturunterseite findet man eine weinrote Pigmentierung (Rinaldi, 2000).



Abb. 2.2 Flaumiger Wachstumstyp von *T. rubrum*

(www.provlab.ab.ca/mycol/tutorials/derm/trub.htm)

Mikroskopisch zeigen sich Makrokonidien und selten Mikrokonidien.

2. Der **pudrig-gipsige Typ** zeigt ein cerebriformes rot-violettes Zentrum mit einem flachen Rand. Die Rückseite ist dunkelbraun bis weinrot (Rinaldi, 2000).

Mikroskopisch zeigen sich zahlreiche Makrokonidien und zahlreiche bis wenige Mikrokonidien.

3. Der **gelbpigmentierte Typ** bildet ein gelbpigmentiertes Luftmycel und weist einen orangefarbenen Kolonierand auf. Man findet diesen Typ nur in isoliertem Nagelmaterial.

Im mikroskopischen Bild zeigen sich extrem wenige Mikrokonidien.

4. Der **melanoide Typ** produziert, wie der Name schon sagt ein Melaninpigment, welches den gesamten Nährboden rot-braun verfärbt. Die Kultur ist zentral erhaben und hat eine flaumige Oberfläche. Diese melaninproduzierende Form kommt auch bei *T. mentagrophytes*, als auch bei *Epidermophyton floccosum* vor. Die mikroskopischen Charakteristika sind mit dem flaumigen Typ vergleichbar.

5. Der **afrikanische Typ** zeigt eine pudrige, cremig bis rosarote Kultur mit kegelförmige Thallusmitte. Die Unterseite ist schwachrot pigmentiert. Diese Art wurde bei dunkelhäutigen Patienten isoliert.

Mikroskopisch zeigen sich zahlreiche Makrokonidien, sowie keulenförmige in der Zahl weniger Mikrokonidien. Ausserdem wird die Bildung von Chlamydosporen (= terminal am Luft- oder vegetativen Mycel vorkommende, grosse, runde, asexuelle Dauersporen mit einer doppelten Membran, die besonders bei ungünstigen Umweltbedingungen resistent sind) beobachtet.

Zur Untersuchung der mikroskopischen Morphologie wird ein Tesafilm-Abrisspräparat der Kultur angefertigt. Dabei wird ein Stück Tesafilm leicht auf die Pilzkolonie gedrückt und auf einen Objektträger mit 1 Tropfen Methylenblau oder Lactophenolblau geklebt. Anschliessend erfolgt die Beurteilung der Feinstruktur mittels Mikroskopie. Zu den allgemeinen **mikroskopischen Merkmalen** gehören das Vorkommen von Mikro- und Makrokonidien.

Mikrokonidien: Die Mikrokonidien sind in unterschiedlich grosser Zahl vorhanden und zeigen eine längliche, ovale bzw. birnenförmige Form, vereinzelt sind sie auch rund und oft findet man eine akladiumförmige (Ähren förmig) Anordnung. Ihre Grösse beträgt 2-3 x 3-5 μm . Sie sind lateral zu den Hyphen angeordnet.

Makrokonidien: Makrokonidien werden nur spärlich gebildet. Sie sind lang, schmal und mehrkammrig, sowie an den Polen abgerundet. Sie sind 4-6 x 15-40 μm gross. Ihre Wand ist dünn und glatt und sie sitzen ungestielt den Hyphen auf. Einige Stämme bilden keine Makrokonidien, im Gegensatz zum afrikanischen Typ, welcher eine grosse Anzahl von Makrokonidien bildet, als auch in der Lage ist, Chlamydosporen zu bilden.

Hyphen: Die Hyphen prägen meistens das mikroskopische Bild. Sie sind sehr fein, hyalin, ineinander verwoben, septiert und verzweigt und gelegentlich findet man Raquettehyphen.

T. rubrum kommt nur im imperfekten Stadium vor, d. h. es findet nur die asexuelle Vermehrung mit der Bildung von Mikro- und Makrokonidien statt. Ein perfektes Stadium ist bisher unbekannt. Sie gehören deshalb zu den Fungi imperfecti.

2.4.3 Weitere Testverfahren zur Identifizierung von *T. rubrum*

Um die einzelnen *Trichophyton*-Arten untereinander zu differenzieren, werden unterschiedliche physiologische Tests angewandt. Die Testergebnisse sind aber im Gegensatz zu biochemischen Methoden nicht valide.

A: Urease-Test (Rebell und Tablin, 1970)

Dieser Test eignet sich besonders zur Differenzierung zwischen *Trichophyton rubrum* und atypischen Stämmen von *Trichophyton mentagrophytes*. Die Differenzierung erfolgt auf Grund einer Farbänderung von ursprünglich gelb zu rosa bis rot. Die Farbänderung beruht auf den Zusatz eines Phenolrotindikators, welcher das Ansteigen des pH-Wertes bei einer ureasepositiven Reaktion signalisiert. Da *Trichophyton rubrum* nicht in der Lage ist, Urease zu bilden, kommt es hier nicht zu einer Farbänderung, was die Differenzierung zu *T. mentagrophytes* erleichtert, da dieser Harnstoff hydrolysieren kann und es damit zu einer Farbänderung kommt.

B: in vitro Haar-Perforationstest (Ajello und Georg, 1957)

Bei diesem Test wird die enzymatische Tätigkeit auf Keratin und damit das Haarperforationsvermögen erfasst. Unter dem Mikroskop sucht man, nach einer Inkubationszeit von ca. 14 Tagen, keilförmige Haarteile, die für eine Haarperforation sprechen. *T. rubrum* ist nicht in der Lage, Haare *in vitro* zu perforieren, der Test fällt damit negativ aus. Dies ist wieder ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu *T. mentagrophytes*, da hier der Test positiv ausfällt.

Es ist anzumerken, dass der Perforationstest nichts mit dem Befall der Haare zu tun hat, d. h. dass *T. rubrum* sehr wohl in der Lage ist, das äussere Haar *in vivo* zu besiedeln (Ektothrix), als auch das Haarinnere (Endothrix).

2.5 Das klinische Erscheinungsbild von *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum ist in 76 % Auslöser der Dermatophyteninfektion (Weinstein und Berman, 2002). Er verursacht eine Reihe von Erkrankungen, dazu gehört u. a. Tinea corporis, *T. cruris*, *T. pedis* (English, 1980), *T. manuum*, *T. barbae* (selten) und die Onychomykose (Sinski und Flouras, 1984; Summerbell *et al.*, 1989).

2.5.1 Tinea pedis

Definition:

Als Tinea pedis wird der Pilzbefall der Füße und der Zehen bzw. der Interdigitalräume bezeichnet. Diese Erkrankung ist auch als „Athletenfuß“ bekannt.

Die Fusspilzerkrankung ist eine sehr häufige (10-30%) und weitverbreitete Erkrankung. Die Inzidenz ist steigend. Verantwortlich dafür ist die Zunahme von Immundefekten durch die Infektion mit HIV, durch die Behandlung mit Steroiden, Chemotherapien, Organtransplantationen und vieles andere (Rinaldi, 2000). Etwa 30-50% der Erwachsenen sind betroffen, die Füße von Kindern sind nur selten von Pilzen befallen, wobei die Infektionsrate mit zunehmendem Alter stetig ansteigt, da Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus ebenfalls Risikofaktoren darstellen (Rinaldi, 2000).

Ätiologie

Zu den hauptsächlichen Erregern gehören *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* und *Epidermophyton floccosum*. In Nord- und Ostafrika gehört *Trichophyton violaceum* zu den häufigsten Erregern der Tinea pedis.

Pathogenese

Für die Infektion spielen Epithelschäden im Bereich des Fusses, Mazeration der Zehenzwischenräume (Aufquellung bzw. Erweichung der Haut durch längeren Kontakt mit Flüssigkeiten, z. B. Schweiß, Nässe etc.) und die Feuchtigkeit und Füße eine grosse Rolle. Ideale Voraussetzungen für eine Pilzinfektion im Bereich der Zehenzwischenräume sind übermässiges Schwitzen (Hyperhidrose), unzureichende Trocknung der Zehen und Zehenzwischenräume und die Entwicklung von feuchter Wärme durch das Tragen von ungeeigneter Kleidung (Strümpfe mit einem hohem Anteil an Kunststofffasern, zu enges Schuhwerk, Gummistiefel, schlecht belüftete Turnschuhe etc.).

Die Übertragung erfolgt für gewöhnlich direkt von Mensch zu Mensch. Die indirekte Übertragung erfolgt durch den Kontakt mit kontaminierten Gegenständen oder in einer kontaminierten Umgebung. Ein gutes Milieu für das Wachstum bzw. das Überleben von *Trichophyton rubrum* bieten feuchte warme Umgebungen, wie sie z. B. in Saunabetrieben, Schwimmbädern oder anderen Sportstätten zu finden sind (Auger *et al.*,

1993; Detandt und Norland, 1988). Auch dienen kontaminierte Badetücher, Badeschuhe und Fussmatten der Übertragung von *T. rubrum* (Rippon, 1988).

Klinik

Tinea pedis kann man in drei klinische Formen unterteilen:

a) Interdigitale oder mazerative Form

Die interdigitale Form ist die am häufigsten diagnostizierte Form. Die Infektion beginnt typischerweise im 3. und 4. Interdigitalraum, wo sie für längere Zeit unentdeckt bleibt, da der Patient vorerst keine Beschwerden hat.



Abb. 2.3 Interdigitale Fussmykose
(Al Hasan *et al.*, 2004)

Auch bleibt der Defekt vorerst lokal begrenzt. Die oben genannten Dispositionsfaktoren führen zu einer Weiterverbreitung der Infektion auf weitere Zehenzwischenräume, als auch auf die Zehenunterseite (Hainer, 2003; Hirschmann und Raugi, 2000). Es kommt zum starken Juckreiz (Pruritus) bis hin zu Schmerzen, zu weisslich-mazerierter, sich teilweise ablösender Haut oder zur Ausbildung von Fissuren in diesen Bereichen (Leyden und Kligman, 1977). Dazu kommt ein unangenehmer Geruch, ein typischer Schweißfuss-Geruch, welcher durch die Abfallprodukte aus dem Stoffwechsel des Pilzes hervorgerufen wird.

b) Squamös-hyperkeratotische Form

Bei der squamös-hyperkeratotischen Form kommt es im Bereich der Fusssohle zur Bildung von feinen, trockenen, mehlstaubartigen Schuppen, sowie zur Verdickung von kleineren Herden (Hyperkeratosen), wobei es zu einer Ausbreitung über die gesamte Fusssohle, als auch schuhförmig über die Fusssohle hinaus kommen kann (Mokassin-Mykose). In den betroffenen Bereichen erscheint die Haut unter den

Schuppen und der Verdickung hyperämisch und entzündet (Hainer, 2003; Hirschmann und Raugi, 2000).



Abb. 2.4 Mokassin-Mykose

(Al Hasan *et al.*, 2004)

c) Vesikulös-dyshidrotische Form

Die vesikulös-dyshidrotische Form ist eine schwere akute Entzündungsreaktion („id“-Reaktion) (Fitzpatrick *et al.*, 2001), welche vornehmlich in warmen Jahreszeiten (Sommer) auftritt.



Abb. 2.5 vesikulös-dyshidrotische

Form (Al Hasan *et al.*, 2004)

Es kommt im gesamten Bereich des Fusses zur Bildung von Bläschen bis hin zu Blasen, welche einen starken Juckreiz auslösen und durch Kratzen eröffnet werden. Es kommt dabei zur Exsudation (Entleerung) des Bläscheninhaltes. Die Bläschen trocknen binnen weniger Tage ein, es kommt zur Krustenbildung und schliesslich

bleiben rundliche mit Schuppen (Kollarettschuppen) versehene Herde zurück (Hirschmann und Raugi, 2000).

Der Verlauf der Tinea pedis ist meist chronisch, d. h. es kommt häufig zu Rezidiven, v. a. bei Patienten mit einer Immunschwäche (Smith *et al.*, 1994). Weitere Komplikationen sind nicht selten bakterielle Sekundärinfektionen. Die Mykose dient als Eintrittspforte für Staphylokokken und Streptokokken, als auch für gramnegative Keime (Semel und Goldin, 1996). Es kann zur Ausbildung eines Erysipels, einer Lymphangitis oder einer Lymphadenopathie kommen. Diskutiert wird ebenfalls der Zusammenhang zwischen *T. rubrum*-Infektionen und Erkrankungen des atopischen Formenkreises (Elewski und Schwartz, 1999; Hurlimann und Fah, 2001)

Diagnose

1. **Klinische Inspektion**
2. **Materialgewinnung und weiterführende Diagnostik**
 - Anfertigung eines Nativpräparates (2.4.1.)**
 - Anlegen einer Kultur (2.4.2.)**
3. **Spezialuntersuchungen (siehe 2.4.3.)**

Therapie

Die antimykotische Therapie richtet sich nach der Lokalisation und dem Ausprägungsgrad der Erkrankung. Im Regelfall wird eine Lokalthherapie eingeleitet. Dabei kann man in erster Linie auf **Azol-Derivate** zurückgreifen, welche durch die Interaktion mit der Zytochrom-P-450 abhängigen Lanosterol-delta-14-demethylase die Biosynthese von Ergosterin hemmen (Bastert *et al.*, 2001). Durch sein breites Wirkspektrum besteht eine effektive Behandlung von Dermatomykosen. Systemisch verabreicht binden sie jedoch auch an menschliche (hepatische) Zytochrome, so dass unerwünschte Arzneimittelinteraktionen auftreten können (Majstorovic, 1996). Auch **Allylamine** greifen in die Ergosterinbiosynthese ein, indem sie die Squalen-Epoxidase hemmen (Bastert *et al.*, 2001). Sie wirken fungizid und sind besonders wirksam gegenüber Dermatophyteninfektionen (Balfour und Faulds, 1992). **Morpholine** inhibieren zwei Enzyme, δ -14-Reduktase und die δ -7- δ -8-Isomerase, und hemmen somit ebenfalls die Ergosterol-Biosynthese (Bastert *et al.*, 2001). Sie wirken

fungistatisch und werden vor allem in einer Nagallack-Formulierung bei Onychomykosen eingesetzt.

Wird eine lokale Therapie nicht zur Heilung führen, kommt eine Reihe von oralen modernen Breitbandantimykotika zum Einsatz. Zu erwähnen sind Itraconazole, welche zu den **Triazol-Derivaten** gehören. Wie auch bei der topischen Anwendung wird infolge der Interaktion mit den Cytochrom-P-450 Isoenzymen die Biosynthese der Ergosterine gehemmt (Niewerth *et al.*, 2000). Fluconazole, zu den **Bi-Triazolen** gehörend, werden per os verabreicht und werden im Gegensatz zu Itraconazolen besser enteral absorbiert (Grant *et al.*, 1990). Das zu der Gruppe der **Allylamine** angehörende Terbinafin ist auch zur systemischen Therapie anwendbar (Niewerth *et al.*, 2000).

Prophylaxe

Neben der pharmakologischen Therapie gibt es weitere unterstützende und präventive Massnahmen zur Behandlung und zur Vorbeugung von Pilzinfektionen. An erster Stelle stehen die richtige Hygiene der Füße und die richtige Wahl der Kleidung. Hier gilt es, während einer Infektion austrocknende, adstringierende Fussbäder zu machen. Ansonsten sollten nach dem Baden und Schwimmen die Füße desinfiziert werden (hauptsächlich in öffentlichen Bädern und Sportanlagen), die Zehenzwischenräume trocken gehalten werden, möglichst nur baumwollene Strümpfe getragen und diese täglich gewechselt werden. Im Sommer sollte offenes, lockeres Schuhwerk getragen werden (z. B. Sandalen) und ansonsten sollten die Schuhe täglich gewechselt werden, damit diese austrocknen können. Nach einer Infektion sollten alle Schuhe, Pantoffeln, Stiefel usw. desinfiziert werden, damit es nicht zu einer Reinfektion kommt. Für die Bekämpfung peripherer Durchblutungsstörungen sollten täglich gymnastische Übungen durchgeführt werden. Prädispositionsfaktoren und andere Grunderkrankungen (z. B. Diabetes mellitus) müssen diagnostiziert sowie therapiert werden. Darüberhinaus sollten Patienten ausreichend über die Erkrankung und deren Ansteckungsgefahren aufgeklärt werden, um eine Übertragung auf Dritte zu verhindern.

2.6 Glykosylphosphatidylinositole (GPI)

2.6.1 Struktur der GPIs

Glykosylphosphatidylinositole (GPIs) wurden erstmals Ende der 70iger Jahre durch Low, Holder und Cardoso beschrieben. Diese führten Untersuchungen zur Verankerung von Proteinen durch und erkannten durch die Behandlung mit einem bakteriellen Enzym, der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C, dass Membranproteine von der Zelloberfläche gelöst werden können (Low und Finean, 1977; Low 1990; Holder und Cross, 1981; Cardoso und Turner, 1983). Später charakterisierte Ferguson erstmals die vollständige Struktur eines GPI-Ankers bei dem Protozoon *Trypanosoma brucei brucei* (Ferguson *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1988). Danach folgte eine Reihe an Untersuchungen von Proteinverankerungen durch GPIs bei anderen Organismen (Englund, 1993; McConville und Ferguson, 1993; Field und Menon, 1993; Eckert *et al.*, 1997; Gerold *et al.*, 1994; Striepen, 1997). Heute weiss man, dass die Mehrzahl der Eukaryonten GPIs synthetisieren. Beispiele für die Proteinverankerung durch GPIs in höheren Lebewesen sind z. B. die alkalische Phosphatase in Hepatozyten (Tse *et al.*, 1985) oder die Acetylcholinesterase in Erythrozyten (Roberts *et al.*, 1988). Dabei können GPIs auch frei in der Zelle vorkommen. Diese sind als Stoffwechselprodukte der Biosynthese und des Abbaus zu verstehen. Allen gemeinsam ist aber eine evolutionär konservierte Grundstruktur (McConville und Ferguson, 1993). In der Abbildung 2.6. ist diese dargestellt.

Die Grundstruktur besteht aus mehreren Komponenten, welche miteinander verknüpft sind. An ein Ethanolaminphosphat, welches über das C-terminale Ende der Aminosäure des Proteins mit dem Protein verbunden ist, schliesst sich über eine Phosphodiesterbindung, das Trimannosyl-Glykan an. Dieser Glykananteil ist evolutionär hoch konserviert und besteht aus 3 α -gebundenen Mannosen, Man- α 1,2-Man- α 1,6-Man- α 1,4 -GlcN. Dieser Glykananteil ist über ein nicht-acetyliertes Glukosamin mit einem Phosphatidylinositol verbunden, woran sich dann der hydrophobe Anteil anschliesst. Das hydrophobe Fragment kann sowohl aus an Glycerol-gebundenen Fettsäuren, als auch aus Ceramiden bestehen und ist in der Zellmembran verankert. Diese Grundstruktur kann nun manigfaltig variieren (Eckert *et al.*, 1997). So z. B. können verschiedene Reste am Glykananteil gebunden sein, wie beispielsweise die Struktur eines GPI-Ankers bei *Plasmodium falciparum* zeigt. Am

Glykananteil ist hier eine vierte Mannose eingebaut und am Inositol findet sich zusätzlich eine Acylgruppe (Gerold *et al.*, 1996b). Bei *Aspergillus fumigatus* findet man ebenfalls eine Pentomannose als Glykanstruktur. Der Lipidanteil besteht aus einem Inositol-Phosphoceramid aus Phytosphingosinen und Monohydroxy-Fettsäuren (Fontaine *et al.*, 2003).

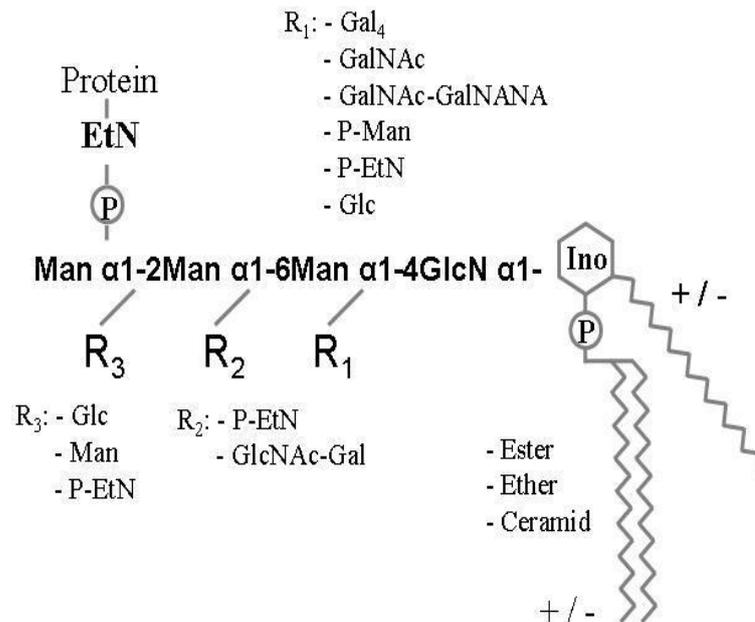


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Grundstruktur von Glykosylphosphatidylinositolen, sowie mögliche Beispiele von Modifikationen

Die hochkonservierte Grundstruktur von GPI – Membranankern ist in der Abb.1.1. fett dargestellt.

EtN= Ethanolamin, **P**= Phosphat, **Man**= Mannose, **GlcNH₂**= Glucosamin, **Ino**= Inositol

Die unter R₁ – R₃ aufgeführten Substituenten, sind Beispiele für die bisher beschriebenen Modifikationsmöglichkeiten von GPI-Membranankern.

Glc= Glukose, Gal= Galaktose, GalNAc= N-acetyl-Galaktosamin, NANA= N-acetyl-Neuraminsäure, GlcNAc= N-acetyl-Glucosamin. Der Lipidanteil kann aus an Glycerol gebundenen Fettsäuren, aus Ceramiden oder aus langkettigen Alkoholen bestehen.

(aus Englund, 1993)

2.6.2 Biosynthese des GPI - Ankers

Erstmals wurde die Biosynthese von GPI-Anker-Vorläufern bei *Trypanosoma brucei* untersucht (für eine Übersicht Englund, 1993). Die Biosynthese findet an der

ytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt (Virdugiriene und Menon, 1993; 1994) und beginnt mit der Übertragung der aktivierten Form von N-Acetyl-Glukosamin UDP-GlcNAc auf ein Phosphatidylinositol. Dann erfolgt die Abspaltung des N-Acetylrestes (Doering *et al.*, 1989). Im Folgenden werden 3 aktivierte Mannosen mit Hilfe der Dolichol-Phosphat-Mannose als Donor auf das Glukosamin übertragen (Menon *et al.*, 1990a). Im letzten Schritt fungiert Phosphatidylethanolamin als Donor für die Übertragung des Ethanolamins (Menon *et al.*, 1993). Die Proteinübertragung ist in der Abbildung 2.7 dargestellt.

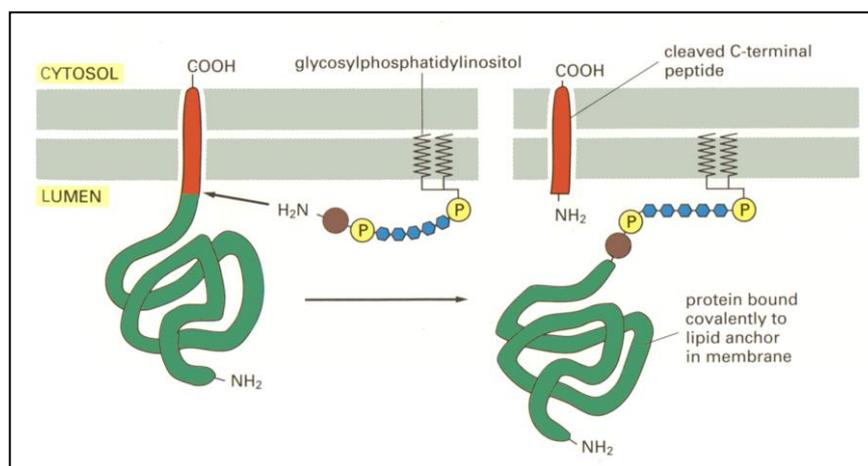


Abb. 2.7 Übertragung des Proteins auf den GPI-Vorläufer

Die Übertragung erfolgt auf der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums. Es besteht eine Pseudopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Ende des zwischen der 17-32 Aminosäure gespaltenen Peptids und dem Ethanolamin des GPI-Vorläufermoleküls. Die Übertragung erfolgt „en bloc“ (aus Udenfriend und Kodukula, 1995)

Die Übertragung der Proteine auf den GPI-Vorläufer findet auf der luminalen Seite des ERs statt. Menon und Mitarbeiter postulieren eine „Flipase“, welche den Transport des Vorläufer-Moleküls von der zytoplasmatischen auf die luminalen Seite des ERs gewährleistet (Menon und Vidugiriene, 1994). Dabei erfolgt Übertragung des GPI-Vorläufers „en bloc“ auf das entstehende Protein (Bangs *et al.*, 1988; Krakow *et al.*, 1986). Am C-terminalen Ende wird das Protein gespalten, wobei die Erkennungssequenz bei 17-32 hydrophoben Aminosäuren liegt. Zwischen dem C-terminalen Ende der Aminosäure des abgespaltenen Peptids und des Ethanolamins des

GPI-Vorläufers wird eine Pseudopeptidbindung hergestellt (Übersicht: Udenfriend und Kodukula, 1995).

2.6.3 Funktion der GPIs

Das gebundene Protein wird nun via Golgi-Apparat durch die Zelle transportiert und in der Membran verankert. Der Transport und die Verankerung von Proteinen in der Zellmembran sind zwei der wichtigsten Funktionen, welche GPIs ausüben. Dies ist z. B. bei der alkalischen Phosphatase in Hepatozyten (Tse *et al.*, 1985), als auch bei der Acetylcholinesterase in Erythrozyten nachgewiesen worden (Roberts *et al.*, 1988). Untersuchungen zufolge, dient die Verankerung von Proteinen an GPIs auch als Transportsignal. Es konnte gezeigt werden, dass GPI-verankerte Proteine zur apikalen Zelloberfläche transportiert werden (Lisanti *et al.*, 1990). Die Verweildauer eines Proteins in einem Kompartiment kann ebenfalls mittels Verankerung an ein GPI beeinflusst werden. Darüberhinaus sind GPIs an vielen Signalprozessen beteiligt. Eine Signalkaskade wird über unterschiedliche Botenstoffe (z. B. Stoffwechselprodukte der Zellmembran) ausgelöst, indem diese in der Zellmembran lokalisierte Proteinkinasen aktivieren oder auch deaktivieren und dadurch über weitere Schritte der Aktivierungszustand der Zelle geändert wird. So zeigte sich in *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria tropica) und in *Trypanosomen* (Erreger der Schlafkrankheit), dass nur durch die Bindung GPI-verankerter Lymphozytenantigene (z. B. CD 59, Thy-1 und CD 55) mit den entsprechenden Antikörpern die Signaltransduktion für die Lymphozytenaktivierung ausgelöst werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten Antigene, welche über eine transmembrane Proteinkomponente in der Membran verankert waren, nach Antikörperbindung keine Signaltransduktion für die Lymphozytenaktivierung auslösen (Schofield *et al.*, 1994; Tachado *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GPIs aus *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) in Adipozyten des menschlichen Organismus die Glukoseoxidation und die Lipogenese aktivieren können, so das angenommen werden kann, dass GPIs auch direkt als „second messenger“ fungieren (Saltiel, 1991). Selbst einzelne Komponenten der GPIs sind in der Lage, eine Signaltransduktion auszulösen und damit als „second messenger“ zu fungieren. Eine grosse Rolle spielt diese Erkenntnis auch in der Erforschung der Pathogenese der Malariaerkrankung. Es wurde durch Untersuchungen an Makrophagen gezeigt, dass einzelne Komponenten der GPIs, wie z. B. der

Glykananteil, in der Lage sind, die Protein-Tyrosin-Kinase zu aktivieren (Tachado *et al.*, 1997). Auch GPI-Diacylglycerole sind in der Lage, eine calciumunabhängige Form der Proteinkinase C zu aktivieren. Diese beiden Signalkaskaden spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression des Tumornekrose Faktors α (TNF α), der NO-Synthetase (Tachado *et al.*, 1996) und von Interleukin-1 (IL-1). Schon in früheren *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass GPIs aus *P. falciparum* zu einer vermehrten Produktion von TNF α in Makrophagen führt (Schofield und Hackett, 1993). TNF α ist Auslöser für viele typische Symptome der cerebralen Malaria (Clark und Chaudhri, 1988). Hierzu gehören u. a. die Hyperpyrexie, die normozytäre Anämie, pulmonale Ödeme, diffuse intravaskuläre Koagulation und Aborte. Korrelation zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und der TNF α -Konzentration im Serum konnten nachgewiesen werden (Kern *et al.*, 1989). Tachado und Schofield postulierten 1994 ähnliche biologische Effekte der GPIs aus anderen Parasiten. Auch im Rahmen einer *T. gondii*-Infektion spielt die TNF- α Produktion in den Makrophagen eine Rolle. Es wurde demonstriert, dass der Lipidanteil als Signalfaktor mit einer Rolle spielt, da gezeigt werden konnte, dass GPIs mit einer Acylglycerol-Gruppe die Bildung von TNF- α begünstigt, jedoch GPIs mit einer Alkylglycerol-Gruppe die Bildung hemmen (Debierre-Grockiego *et al.*, 2003).

Wahrscheinlich spielen GPIs auch bei der Zellwandsynthese der Pilze eine wichtige Rolle. Bei dem Pilz *Aspergillus fumigatus* wurde eine 1,3- β -Glukanosyltransferase (Gel1p) untersucht, welche ebenfalls über GPIs in der Zellmembran verankert ist (Moyna *et al.*, 2000) und welche die 1,3- β -Verknüpfung zwischen den einzelnen Glykanen katalysiert (Hartland *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es Gemeinsamkeiten zu anderen Oberflächenproteinen gibt. Zu erwähnen sind das Gas1p Protein, welches bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben wurde (Popolo und Alberghina, 1984; Popolo *et al.*, 1986; Conzelmann *et al.*, 1988; Nuoffer *et al.*, 1991) und die Phrp Proteine in *Candida albicans* (Muhlschlegel und Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Diese sind homolog der GPI-verankerten 1,3- β -Glukanosyltransferase (Gel1p) und besitzen die gleiche biochemische Aktivität (Moyna *et al.*, 2000).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es in erster Linie, das Vorkommen von Glykosylphosphatidylinositolen in dem Dermatophyten *Trichophyton rubrum* zu untersuchen und wenn möglich diese zu identifizieren und zu charakterisieren.

Es sollte ein zellfreies System etabliert werden, in dem es möglich ist, GPIs radioaktiv zu markieren und anschliessend zu charakterisieren. Dabei sollten verschiedene aktivierte Zucker als selektive Marker eingesetzt werden. Nach dem Einbau der selektiven Marker in die vom Pilz synthetisierten Glykolipide sollte eine dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser erfolgen. Um die aufgetrennten *T. rubrum*-Glykolipide zu charakterisieren werden GPI-spezifische Spaltungen durchgeführt. Diese Spaltfragmente sollten dann mit Hilfe entsprechender Verfahren analysiert werden und mit schon bekannten Strukturen verglichen werden. Dabei sollte ein vorläufiges Strukturmodell der in *Trichophyton rubrum* synthetisierten GPIs erstellt werden.

Es gibt bisher nur wenige Untersuchungen zur Erforschung von GPIs in *Trichophyton rubrum*. Dabei konnte gezeigt werden, dass GPIs eine Rolle in der Morphogenese und in der Entwicklung von Pilzen spielen. Es ist deshalb wichtig zu untersuchen, ob *Trichophyton rubrum* GPIs synthetisiert, wenn möglich dessen Struktur zu analysieren, die Biosynthese zu verstehen und ihre Funktionen zu untersuchen. Mit Hilfe dieser grundlegenden, detaillierten Erkenntnisse ist es in Zukunft möglich, neue Ansatzpunkte für die Erforschung spezifischer und wirksamerer Antimykotika aufzuzeigen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysewaage Mettler AT 250	Mettler, Rabenau-Londorf
Analysewaage Mettler P 1200	Mettler, Rabenau-Londorf
Bio-Gel P4 Säule (1x130cm, <400 Mesh)	Bio-Rad-Laboratorien, Inc., Hercules
DC-Platten-Scanner LB 2842	Berthold, Wildbad
Dionex-HPAEC, Typ BIOLC	Dionex, Sunnyvale
Dounce-Homogenisator	Braun, Melsungen
Dünnschichtplatten (Si-60)	Merck, Darmstadt
ELISA-Reader PR 2100	Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg
Feinwaage Mettler PM 460	Mettler, Rabenau-Londorf
Flüssigkeitsszintillation-Zähler LS 1801	Beckmann, München
Fraktionssammler Pharmacia	
LKB Frac-100	Pharmacia, Freiburg
Heizplatte Heidolph MR 2002	Heidolph, Schwabach
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
pH-Meter CG 822	Schott, Hofheim
Sterile-Arbeitsbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge pico	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Branson 3200	Branson, Dietzenbach
Vakuumkonzentrator, Typ SC 200	Savant Instruments, San Francisco
Wasserbad Thermomix BU	Braun, Melsungen
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen

3.1.2 Plastikwaren

Die benötigten Plastikwaren wurden von folgenden Firmen bezogen:

Für die Anzuchtung der Pilzkultur:

Becton Dickinson Labware	Falcon, Lincoln Park
Schleicher & Schnell	Dassel
Greiner	Frickenhausen

Sonstige:	Becton Dickinson Labware	Falcon, Lincoln Park
	Eppendorf	Hamburg
	Greiner	Frickenhausen
	Millipore	Eschborn
	Schleicher & Schnell	Dassel

3.1.3 Chemikalien

Es wurden ausschliesslich Chemikalien vom Reinheitsgrad p. A. (*pro Analyti*) verwendet.

Diese wurden von folgenden Firmen bezogen:

Becton-Dickinson	Falcon, Lincoln Park
Merck	Darmstadt
Sigma	Steinheim
Roth	Karlsruhe

Das verwendete Wasser ist entionisiert und wurde mittels einer Milli-Q-Reinstwasser-Anlage (< 10 μ S) der Firma Millipore, gereinigt.

3.1.4 Radioaktive Substanzen

Uridin-Diphosphat-D-[6- ³ H]Galaktose	20 Ci mmol ⁻¹
Uridin-Diphosphat-N-Acetyl-D-[6- ³ H]Glukosamin	20 Ci mmol ⁻¹
Guanosin-Diphosphat-[3-4- ³ H]Mannose	15.1 Ci mmol ⁻¹

Alle diese Substanzen wurden von der Firma DuPont (New England) kommerziell erworben.

3.1.5 Enzyme

α -Galaktosidase (aus Grünen Kaffee Bohnen)	Sigma (Steinheim)
β -Galaktosidase (aus <i>S. pneumoniae</i>)	GlycoSystems (Oxford)
α -Mannosidase (Jack bean)	Sigma (St. Louis, MO)
α -1-2-Mannosidase (aus <i>Aspergillus saitoi</i>)	GlycoSystems (Oxford)
Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC, aus <i>Bacillus cereus</i>)	Boehringer (Mannheim)
Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase D (GPI-PLD, aus Kaninchen Serum)	Medizinisches Zentrum für Hygiene (Marburg)

3.1.6 Agarplatten

Sabouraud-Agar 2% Glukose	Merck (Darmstadt)
Selektivagar für pathogene Pilze	Merck (Darmstadt)
Kimmig-Agar	Merck (Darmstadt)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von *Trichophyton rubrum*

Der verwendete *Trichophyton rubrum*-Stamm wurde aus Patientenmaterial isoliert und anschliessend auf Sabouraud-Agar (2% Glukose) angezüchtet.

Die Stammkultur stammte aus der Anzüchtung im Mykologischen Labor der Hautklinik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. I. Effendy.

3.2.1.1 Herstellung des Kulturmediums

Um den humanpathogenen Pilz *Trichophyton rubrum* anzuzüchten, verwendet man normalerweise Sabouraud-Agar (2% Glukose) Platten. Da es aber sehr schwierig ist,

Hyphenmaterial aus einer Agar-Platte zu gewinnen, wurde ein Flüssignährmedium verwendet.

Dieses Medium wird folgendermassen hergestellt:

5 g Pepton (Difco, Becton-Dickinson)
entionisiertes Wasser ad 232.5 ml

Das Kulturmedium wird anschliessend autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Kurz vor Gebrauch des Kulturmediums werden folgende Lösungen hinzugefügt:

12.5 ml D(+)Glukoselösung (0.4 g / ml entionisiertes Wasser, steril filtriert) und
5 ml Chloramphenicollösung (2.5 mg / ml entionisiertes Wasser, steril filtriert)

Anschliessend wird mittels 1 M NaOH der pH-Wert auf 5.6 + / - 0.2 eingestellt.

Das nun gebrauchsfertige Kulturmedium wird in 2 Kulturflaschen (je 125 ml) aufgeteilt und steht der sofortigen Beimpfung zur Verfügung.

3.2.1.2 Beimpfung des Kulturmediums

Aus der zur Verfügung gestellten Stammkultur wurden mit einer sterilen Impföse *T. rubrum*-Hyphen entnommen und je 125 ml Flüssigmedium beimpft.

Die Inkubation der Kultur erfolgt für 2 Wochen bei Raumtemperatur.

Das Kulturmedium wurde alle 2 Monate erneuert. Dabei wurde *T. rubrum*-Material mittels einer sterilen Impföse aus dem alten Medium entnommen und in das frisch hergestellte Medium überführt.

3.2.2 Metabolische Markierung von *T. rubrum*-Glykolipiden im zellfreien System

Die metabolische Markierung mit spezifischen markierten Bausteinen des GPI-Ankers ermöglicht eine selektive Untersuchung von Glykosylphosphatidylinositolen. Ausserdem erlaubt diese Vorselektion des nachweisbaren Materials eine Einsparung an

aufwendigen Reinigungsschritten. Ein weiterer Vorteil der radioaktiven Markierung besteht darin, dass man auch mit einer sehr geringen Menge an GPI-Material arbeiten und diese untersuchen kann. Aus diesem Grund wurden alle hier aufgeführten Experimente an radioaktiv markiertem Material vorgenommen.

3.2.2.1 Herstellung eines zellfreien Systems

Zellfreie Systeme werden in besonderem Masse bei den Untersuchungen zur Biosynthese von GPI-Ankern eingesetzt (Masterson *et al.*, 1989; Mayor *et al.*, 1990 a; b). Dabei können spezifische Glykosylierungsinhibitoren verwendet werden, welche in das zellfreie System gelangen und so eine radioaktive Markierung mit aktivierten Bausteinen des GPI-Ankers, z. B. mit tritiierten Nukleotidzuckern ermöglichen. Darüberhinaus erlauben zellfreie Systeme die Markierung von GPI-Anker-Biosynthesemediaten. Deren Markierbarkeit ist in der Regel in zellfreien Systemen sehr viel effektiver, als bei *in vivo*-Markierungen, so dass ihre Identifizierung und Charakterisierung hierdurch erheblich erleichtert wird, wie z. B. bei der Identifizierung von GPI-Strukturen bei *T. brucei brucei* (Masterson *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990b), bei *P. primaurelia* (Azzouz *et al.*, 1995) oder bei *T. gondii* (Tomavo *et al.*, 1992b) gezeigt wurde.

Das zellfreie System besteht aus hypoton lysierten Zellen. Die Membranstruktur wird modifiziert (Masterson *et al.*, 1989). Dazu werden ca. 1 g *T. rubrum* Zellen aus dem Flüssigmedium entnommen und mit 2 x 4 ml PBS gewaschen. Durch anschließende Zentrifugation (2500 g, 5 min) erhält man ein Sediment. Der Überstand wird verworfen und das Sediment wird mit 1 ml 1 M Sorbitol / 1 M EDTA nochmals gewaschen. Nach erneuter Abzentrifugation wird das Sediment mit Zymolyase 20000, welches in 1 M Sorbitol / 1 M EDTA gelöst wird (100 mg/ml), versetzt (Mazhari-Tabrizi *et al.*, 1996). Nach kurzem Durchmischen wird der Ansatz für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 Std. wird das durch Abzentrifugation gewonnene Sediment mit 2 ml TM-Puffer und zusätzlich 0.2% 2-Mercaptoethanol für 1 Std. bei + 4 °C inkubiert.

Durch eine mechanische Zerstörung der Zellstruktur erhält man ein Homogenisat aus Zellmembranen. Dabei wird das Lysat mit 1 Volumen hypotonem Lysepuffer auf Eis resuspendiert. Das Resuspensat wird in einen eisgekühlten Dounce-Homogenisator gegeben und mit 50-80 Schlägen homogenisiert. Jeweils 1 ml des Lysats werden in 1 Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (2500 g, 2 min) wird das

Sediment (ca. 0.25 ml) 3 x mit 2 Volumen Waschpuffer gewaschen. Danach folgt die metabolische Markierung.

TM-Puffer	50 mM Tris / HCl, pH 7.5 5 mM MgCl ₂ ad 10 ml mit Wasser auffüllen
Hypotoner Lysepuffer:	1 ml Wasser 0.1 mM Tosyllysylchloromethylketon (TLCK), Trypsin-Protease Inhibitor 1 µg / ml Leupeptin, Serin-, Thiol-Protease Inhibitor auf Eis
Waschpuffer:	50 mM Na- HEPES, pH 7.4 50 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 0.1 mM TLCK 1 µl/ml Leupeptin

3.2.2.2 Metabolische Markierung

Das Sediment wird in 1.5 Volumen Waschpuffer mit zusätzlich 5 mM MnCl₂, 0.2 µg /ml Tunikamycin, Inhibitor der N-Glykosylation von Proteinen (Elbein, 1987), 10 µmol/l Nikkomycin Z, Inhibitor der Chitin-Biosynthese durch Blockierung der N-acetyl-Glukosamin-Synthese (Gaughran *et al.*, 1994) resuspendiert und zu 10 gleichen Teilen in Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt (ca. 75 µl Suspensat pro Röhrchen). In jedes Röhrchen werden nun 1 mM ATP und 1 mM Coenzym A gegeben.

Für die Markierung mit

- **UDP-N-acetyl-[³H]Glukosamin** wird jeder Ansatz mit 2 µCi tritiierten UDP-N-acetyl-[³H] Glukosamin, sowie mit 1mM nicht radioaktivierter GDP-Mannose supplementiert.

- **GDP-[³H]Mannose** werden in jeden Ansatz 2 µCi radioaktiv markierte GDP-[³H]Mannose und 1 mM nicht radioaktiv markiertes UDP-N-acetyl-Glukosamin pipettiert.
- **UDP-[³H]Galaktose** wird in jeden Ansatz 1 mM kaltes UDP-N-acetyl-Glukosamin und 1 mM kalte GDP-Mannose, sowie 2 µCi aktivierte UDP-[³H]Galaktose gegeben.

Die Reaktionsansätze werden 1 Std. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wird alle 15 min jeder einzelne Ansatz leicht durchmischt, so dass ein optimaler Einbau der tritiierten Zucker in die GPI-Vorläufer gewährleistet wird. Nach 1 Std. wird die Reaktion mittels Chloroform (C) / Methanol (M) (1:1, v:v) gestoppt. Es entsteht ein Mischungsverhältnis von C/M/W (10:10:3, v:v:v), wobei der Reaktionsansatz die wässrige Phase darstellt. Dies ist gleichzeitig der erste Extraktionsschritt. Es folgen weitere Extraktionsschritte mittels organischen Lösungsmitteln, mit dessen Hilfe Glykolipide aus ihrem Verband herausgelöst werden können. (s. 3.2.3)

3.2.3 Extraktion der Glykolipide

3.2.3.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Die Extraktion der Glykolipide aus der Membranstruktur wird mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Im ersten Extraktionsschritt werden zu jedem Reaktionsansatz im gleichen Volumen C/M (1:1, v:v) gegeben. Es entsteht ein Mischungsverhältnis von C/M/W (10:10:3, v:v:v), wobei der Reaktionsansatz die wässrige Phase darstellt. Anschliessend wird eine Behandlung über 5 Minuten mit Ultraschall vorgenommen, so dass eine feine Suspension entsteht. Nach Zentrifugation (16000 U/min(g), 2 min, RT) wird der Überstand abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Im zweiten Extraktionsschritt wird C/M/W (10:10:3, v:v:v) zu dem Sediment gegeben, es wird ebenfalls eine 5 min Ultraschallbehandlung durchgeführt und danach zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit dem ersten Extrakt vereinigt. Das Sediment wird verworfen und die gewonnenen Glykolipidextrakte werden im Vakuumkonzentrator eingetrocknet.

Um hydrophile Verunreinigungen zu beseitigen, wird das eingetrocknete Material in 500 µl wassergesättigtem n-Butanol resuspendiert, durchmischt und zentrifugiert. Nach

30 minütiger Durchmischung mit Hilfe des Rüttlers bei +4 °C wird erneut zentrifugiert und anschliessend die äquivalente Menge an Wasser hinzugefügt. Es entstehen 2 Phasen, welche kurz durchmischt und ultrabeschallt werden. Nach nochmals 10 minütiger Durchmischung, auf dem Rüttler, wird durch Abzentrifugation eine genaue Phasentrennung erreicht. Die Oberphase, welche aus wassergesättigtem n-Butanol und den darin gelösten Glykolipiden besteht, wird abgenommen und in ein neues Röhrchen gegeben. Die Unterphase wird erneut mit entsprechender Menge wassergesättigtem n-Butanol versetzt, durchmischt, abzentrifugiert und die Oberphasen werden vereinigt. Das gewaschene n-Butanol enthält potentiell markierte GPIs, sowie Dolichol-Phosphat-Zucker. Neben den markierten Zuckern enthält der Extrakt Phospholipide. Sie lassen sich nicht mit tritiierten Zuckern markieren, sodass sie dünnschichtchromatographisch nicht sichtbar sind. Eine Entfernung dieser ist daher für unsere Untersuchung nicht notwendig. Für die weitere funktionelle Differenzierung wäre jedoch die Entfernung der Phospholipide erforderlich, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

3.2.3.2 Bestimmung der Markierungseffizienz mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler (LSC)

Um die Markierungseffizienz zu bestimmen, werden Aliquots von 50 µl aus der organischen Phase entnommen und mittels Szintillation gemessen. Dabei werden in jede Probe 40 Volumen Szintilatorlösung gegeben, welche zum Messen von hydrophilen und hydrophoben Proben eingesetzt wird (rotiszint eco plus^R, Roth). Nach guter Durchmischung werden die Proben im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.2.4 Dünnschichtchromatographie

3.2.4.1 Vorbereitung der Chromatographieplatten

Für die Dünnschichtchromatographie werden 10 x 20 cm Silika-60-Platten (Kieselgelplatten, Merck, Darmstadt) verwendet. Das Kieselgel befindet sich dabei als stationäre Phase in Form einer dünnen Schicht (0.2 mm) auf einer Glasplatte. Die Glasplatten werden nach der Kennzeichnung der Laufrichtung mit Methanol vorbehandelt. Dazu werden sie in eine Chromatographiekammer gestellt, in welcher sich etwas Methanol befindet, und gewartet, bis die Laufmittelfront das Ende der Platte

erreicht hat. Somit werden alle Schmutzpartikel und Wasser, welche sich auf der Platte befinden bis an den Rand der Platte getragen und damit aus dem Auftrennungsfeld entfernt. Danach werden die Kieselgel-Platten herausgenommen, für ca. 10 Minuten unter den Abzug gestellt, sodass das Methanol verdunsten kann und dann zum Trocknen für 2 Std. bei 100 °C in den Heizofen gestellt. Nach der Trocknung werden die Platten herausgenommen, abgekühlt und zur Lagerung im Exsikkator aufbewahrt.

3.2.4.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glykolipide

Für die Analyse der Glykolipide werden diese in 30 µl C/M (2:1, v:v) gelöst. Die Glykolipidpräparationen werden dann mit einer 5 µl Auftragskapillare (Blaubrand) als dünne Bande auf einen vorher markierten Bereich der Kieselgelplatte aufgetragen. Damit die Proben nicht ineinander laufen, sollte zwischen den einzelnen Auftragsbanden ein Abstand von 0.5 bis 1 cm eingehalten werden.

Die Dünnschichtchromatographie wird in einer gesättigten Gasphase durchgeführt. Dabei wird ein Stück Filterpapier (Schleicher & Schnell) in eine mit Laufmittel gefüllte Kammer gestellt und luftdicht verschlossen, sodass die Atmosphäre in der Entwicklungskammer mit dem Dampf des Laufmittels gesättigt wird. Als Laufmittel verwendet man C/M/W (10:10:3, v:v:v). Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft ist, wird die Platte in die Kammer gestellt und schnell verschlossen. Der untere Rand der Platte muss dabei vollständig ins Laufmittel eintauchen und es ist darauf zu achten, dass das Laufmittel nicht mit der Auftragszone in Kontakt kommt, da sonst die aufgetragenen Substanzen von der Platte ins Laufmittel eluieren können. Nun beginnt das Laufmittel infolge der Kapillarkräfte in der Kieselschicht nach oben zu wandern. Die einzelnen Komponenten des zu trennenden Lipidgemisches werden entsprechend ihrer Affinität zur stationären Phase unterschiedlich stark vom Fließmittel mitgenommen. Wenn die Laufmittelfront bis auf 2 cm an den oberen Rand der Kieselgel-Platte heran gelaufen ist, wird die Chromatographie beendet. Die Platte wird herausgenommen und unter dem Abzug getrocknet, bis das Laufmittel vollständig verdampft ist.

3.2.4.3 Detektion der Radioaktivität auf Kieselgel-Platten

Die Auswertung der Chromatographie erfolgt durch einen Kieselgel-Platten-Radioaktivitätsscanner. Dabei wird die getrocknete Kieselgel-Platte unter den Scanner gelegt und mit Hilfe eines speziellen Programms (Chroma, Berthold) wird nun die Radioaktivitätsverteilung auf der Platte gemessen und ausgewertet.

3.2.5 Identifizierung von Glykolipiden

3.2.5.1 Elution der Glykolipide aus Kieselgel-Platten

Für die weitere Analyse und Identifizierung der markierten Glykolipide werden diese aus der Kieselgelplatte eluiert. Dazu werden die Bereiche, in denen mittels Radioaktivitätsscanner eine hohe Radioaktivität nachgewiesen wurde, mit einem Bleistift auf der Platte markiert. Danach wird die Platte mit 70%igem Ethanol angefeuchtet, was ein weitgehend staubfreies Auskratzen erlaubt. Mit Hilfe eines Spatels werden die markierten Banden einzeln ausgekratzt und in je ein Reagenzröhrchen gegeben.

Es folgt eine Extraktion der Glykolipide aus dem Kieselgel, indem man in jedes Reagenzröhrchen C/M/W (10:10:3, v:v:v) gibt. Nach einer kurzen Durchmischung werden die Reagenzröhrchen 7 min in das Ultraschallbad gestellt, so dass eine Suspension entsteht in der die Glykolipide gelöst vorkommen. Nun wird der durch Abzentrifugation (2800 g, 10 min, +5 °C) erhaltene Überstand in ein neues Reagenzglas überführt und das Sediment wird mit C/M/W (10:10:3, v:v:v) resuspendiert. Das Resuspensat wird nochmals für 7 Minuten ultrabeschallt und abzentrifugiert und die folgenden Überstände werden mit dem ersten Überstand vereinigt. Die glykolipidhaltigen Überstände werden unter Stickstoff getrocknet. Die Wiederaufnahme des getrockneten Extraktes erfolgt mit wassergesättigtem n-Butanol. Um die Effizienz der Elution zu bestimmen, wird ein Aliquot entnommen und mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers die verbliebene Radioaktivität gemessen.

3.2.5.2 Enzymatische und Chemische Spaltungen

Um herauszufinden, ob es sich bei den dünn-schichtchromatographisch aufgetrennten Glykolipiden um Glykosylphosphatidylinositole handelt, verwendet man bestimmte Enzyme und Säuren. Durch die Sensitivität der GPIs gegenüber verschiedenen Behandlungen mit diesen, kann eine Identifizierung und Charakterisierung vorgenommen werden. Die Abbildung 3.1 zeigt potentielle Spaltstellen.

Man versucht durch diese spezifischen Spaltungen mittels Enzymen, Säuren, Alkalien, das Grundgerüst in die einzelnen Bausteine zu zerlegen, um diese im Nachhinein analysieren zu können.

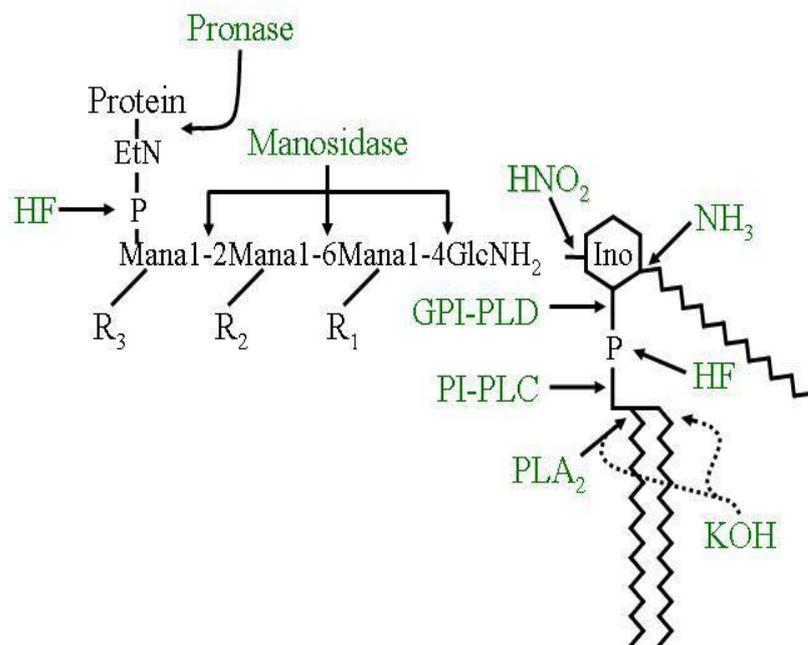


Abb. 3.1 Potentielle Spaltstellen zur Analyse von GPIs

HF: wässrige Fluorwasserstoffsäure; HNO₂: salpetrige Säure; NH₃: Ammoniak; GPI-PLD: Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase D; PI-PLC: Phosphatidylinositol-Phospholipase C; PLA₂: Phospholipase A₂; KOH: Kaliumhydroxyd; R₁₋₃: Reste

3.2.5.2.1 Spaltung mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC)

Die verwendete PI-PLC stammt aus *Bacillus cereus*. Diese erkennt und spaltet GPIs sehr effektiv, im Gegensatz zu Enzymen, welche aus anderen Stämmen hervorgehen. Nur GPIs, die kein modifiziertes Inositol tragen, können durch PI-PLC gespalten werden. PI-PLC setzt dabei die hydrophobe Komponente und das Phosphoinositol-Glykanfragment frei.

Die getrocknete Probe wird in 100 µl Phosphatidylinositol-Phospholipase C Puffer (0.1 M Tris / HCl, pH 7.4 und 0.1 % Desoxycholat) gelöst. Anschliessend wird der Ansatz gemischt und 5 Minuten im Ultraschallbad stehen gelassen. Nach der 2 minütigen Zentrifugation bei 13000 U / min werden 1 U PI-PLC hinzugefügt. Nach 12 Std. Inkubation bei 37 °C wird die Reaktion durch 3-minütiges Kochen bei 100 °C gestoppt. Die Spaltprodukte werden nun zwischen einer wassergesättigten Butanol- und einer Wasserphase verteilt. Dazu wird 1 Volumen N-Butanol in den wässrigen Ansatz gegeben. Nach kurzem Durchmischen, Beschallen im Ultraschallbad und Zentrifugieren wird die Butanolphase abgenommen und der Ansatz wird nochmals mit 1 Volumen n-Butanol versetzt. Der Überstand wird ebenfalls nach Zentrifugation abgenommen und mit dem Ersten vereinigt. Die Spaltungseffizienz wird nun mittels LSC bestimmt. Dabei werden die wässrige Phase, in welcher der Glykananteil gelöst ist, als auch die Butanolphase, in welcher der Fettanteil gelöst ist, untersucht.

3.2.5.2.2 Spaltung mit Glycosylphosphatidylinositol-Phospholipase D (GPI-PLD)

Das für die Spaltung verwendete Enzym stammt aus Kaninchen-Serum, welches GPI-PLD-Aktivität besitzt (Davitz *et al.*, 1987). Die Spaltung erfolgt zwischen dem Inositol und dem Phosphat und ist unabhängig davon, ob das Inositol des GPIs modifiziert ist oder nicht.

Für die Spaltung werden in eine getrocknete Probe 100 µl Phosphatidylinositol-Phospholipase C Puffer (0.1 M Tris / HCl, pH 7.4) und 0.1 % Desoxycholat gegeben. Zusätzlich werden 2 mM CaCl₂ hinzugefügt. Für die Spaltung benötigt man 10 µl des Kaninchen- Serums. Diese Spaltung wird ebenfalls 12 Std. bei 37 °C inkubiert und durch 3-minütiges Kochen gestoppt. Die Verteilung der Spaltprodukte erfolgt, wie

schon beschrieben, zwischen einer Butanol- und einer Wasserphase. Die Radioaktivität in beiden Phasen wird ebenfalls mittels dem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.2.5.2.3 Spaltung mit salpetriger Säure (HNO₂)

Salpetrige Säure wird zur Identifizierung von GPIs eingesetzt. Diese Spaltung ist GPI-spezifisch, da GPIs zu einer der wenigen Gruppen der Glykokonjugate gehören, welche ein nicht-acetyliertes Glucosamin besitzen. Die Spaltung erfolgt zwischen dem nicht-acetylierten Glucosamin und dem Inositol. Es findet eine Deaminierung des Glucosamins unter der intermediären Bildung eines Diazoniumkations (R-N⁺=N) statt, da Diazoniumsalze sehr leicht molekularen Stickstoff von Alkylverbindungen eliminieren. Es entsteht hierbei eine Anhydromannose. Zwischen dieser und dem Inositol kommt es nun zum Bruch der Bindung und zur Abspaltung des Glykans vom Lipidanteil.

In die getrocknete Probe werden 100 µl 0.2 M NaAc mit 0.1% SDS, pH 4 gegeben.

Unmittelbar vor Gebrauch wird 0.5 M HNO₂ hergestellt. Dieses wird im Verhältnis 1:1 (v:v) zu dem Natriumacetat gegeben. Die Inkubation wird 12 Std. bei RT durchgeführt. Mit der Zugabe von 20 µl Essigsäure wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt anschliessend eine Butanol-Wasser-Verteilung der Spaltprodukte und eine Analyse der Spaltungseffizienz mittels Flüssigkeitsszintillationszähler.

Der freigesetzte Glykananteil kann auf einer Bio-Gel P4-Gelfiltrationssäule analysiert werden (siehe 3.2.7.6)

3.2.5.2.4 Milde Alkalische Hydrolyse

Die KOH-Hydrolyse wird zur quantitativen Verseifung estergebundener Alkylketten verwendet. Ethergebundene Fettsäuren sowie Sphingolipide werden dabei nicht gespalten.

Die getrocknete Probe wird in 200 µl 0.1 N KOH und in gleicher Menge Methanol (50%) aufgenommen. Der Ansatz wird 4 Std. bei 50 °C inkubiert. Durch das Kochen des Ansatzes für eine Minute wird die Reaktion beendet. Nachfolgend wird die Probe in der Speed-Vac getrocknet und es wird eine Butanol-Wasser-Verteilung durchgeführt, welche mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler analysiert wird.

3.2.6 Identifizierung von Dolichol-Phosphat-Mannose

3.2.6.1 Versuch der Spaltung mit HNO₂, PI-PLC und α -Mannosidase (Jack bean)

Die Spaltungen mit HNO₂ und PI-PLC werden unter 3.2.5.2.3 und 3.2.5.2.1 beschrieben.

Die α -Mannosidase gehört zu den Exoglukosidasen, d. h. sie spaltet jeweils die endständige freie Mannose. Somit kann man eine Aussage zu der Struktur des Glykananteils treffen. Die Spaltung ist aber unspezifisch, das bedeutet, dass sie Man _{α 1-2}Man-Verbindungen spaltet, aber auch Man _{α 1-6}Man und Man _{α 1-3}Man-Verbindungen, sowie β -Verbindungen.

Die getrocknete Probe wird mit 100 μ l 50 mM Natriumazetat, pH 4.5 resuspendiert. Dieser werden 0.2 mM ZnCl₂, 0.025 % Natriumacid, sowie 2 U Jack bean α -Mannosidase zugefügt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 12 Std. und wird durch 3-minütiges Kochen bei 100 °C beendet. Die Spaltungseffizienz wird mittels Phasenverteilung und Flüssigkeitsszintillationszähler bzw. mit der DC-Analyse ermittelt (s. 3.2.3.1 bzw 3.2.4).

3.2.6.2 Metabolische Markierung der *T. rubrum*-Glykolipide

Zur genauen Analyse von Dol-P-Man wird eine radioaktive Markierung mit GDP-[³H]Mannose durchgeführt (s. 3.2.2.2) Zusätzlich wurden dabei jedoch pro Ansatz 2 μ l Amphomycin (Troponwerke, Köln) hinzugefügt. Amphomycin inhibiert die Dol-P-Man-Synthetase, welche als Katalysator für die Dol-P-Man Synthese fungiert. Die Extraktion der Glykolipide erfolgt wie beschrieben (s. 3.2.3).

3.2.6.3 Analyse von Dolichol-Phosphat-Monosacchariden mittels Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose (McDowell und Schwarz, 1988)

Die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose ist ein Verfahren, bei dem Dolichol-Phosphat-Mannose gereinigt wird. Es werden verschiedene Waschvorgänge mit verschiedenen Waschsubstanzen durchgeführt.

Für die Herstellung der DEAE-Säule wird Diethyl-Ammonium-Ethyl-Cellulose (Sigma, Steinheim) in 99%igem Methanol suspendiert und im Ultraschallbad entgast. Die DEAE-Cellulose wird nun in eine mit Glaswolle gefüllte 5 ml Plastikspritze bis zu einem Volumen von 3 ml gegeben. Anschliessend wird die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen an 99%igem Methanol äquilibriert. Die Säule steht nun dem sofortigen Gebrauch zur Verfügung.

Die zu analysierende Probe wird unter Stickstoff (0.5 bar) eingetrocknet und in 200 µl n-Butanol resuspendiert. Die Probe wird anschliessend auf die Säule aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 5 min, in der die Probe vollständig in die Säule aufgenommen wurde, wird die Säule mit 5 ml 99%igem entgastem Methanol gewaschen. Anschliessend erfolgt die Elution von Dol-P⁻ mittels 5 ml 0.2 M Ammoniumazetat, gelöst in 99%igem entgastem Methanol. Darauffolgend werden 5 ml 0.4 M Ammoniumazetat, gelöst in 99%igem entgastem Methanol, auf die Säule aufgetragen und es kommt damit zur Elution von Dol-P⁻-P⁻ aus der Säule. Diese Eluate werden in Fraktionen von je ca. 3 ml gesammelt, wobei jeweils die Fraktion markiert wird, sobald eine neue Waschsubstanz auf die Säule aufgetragen wurde. Nach Beenden der Chromatographie wird aus jeder Fraktion ein Aliquot von 1/60 entnommen und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

3.2.7 Untersuchung neutraler Core-Glykane

3.2.7.1 Spaltung mit wässriger Flusssäure (HF) zur Darstellung neutraler Core-Glykane

Mit Hilfe dieser Spaltung können die neutralen Core-Glykane der GPIs dargestellt werden. Die wässrige Flusssäure spaltet Phosphodiesterbindungen und setzt so den Zuckeranteil der GPIs frei (Dephosphorylierung). Nach Behandlung mit salpetriger Säure (Deaminierung) und nach Reduktion mit Natriumborhydrid entsteht Anhydromannose, welches dann gereinigt und entsalzt wird und über eine Anionenaustauschsäule analysiert werden kann (Mayor und Menon, 1990a).

Die zu untersuchende Probe wird in der Speed-Vac getrocknet und anschliessend mit 48% iger HF resuspendiert. Die Probe wird für 60 Std. auf Eis inkubiert. Anschliessend wird die Probe unter Stickstoff getrocknet. Es folgt die Deaminierung mit frisch angesetztem 0.5 M Natriumnitrit (NaNO₂) und 200 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3.6.

Dieser Ansatz wird in die zuvor getrocknete Probe gegeben und für 4 Std. bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.4 M Borsäure beendet. Damit die Reduktion unter optimalen Bedingungen ablaufen kann, muss der pH-Wert auf 10.5 eingestellt werden. Dies geschieht durch Zugabe von 1 M Natriumhydroxid (NaOH), welche solange zugegeben wird, bis ein pH-Wert von 10.5 erreicht wird. Für die Reduktion werden dann 100 µl 2 M Natriumborhydrid (NaBH₄), in 0.3 M NaOH, in das Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei RT für 5 Std. inkubiert oder für 12 Std. bei + 4 °C. Es ist darauf zu achten, dass das dabei entstehende H₂ entweichen kann. Dazu werden kleine Löcher z. B. mit einer dünnen Kanüle in den Deckel des Röhrchens gestochen. Die Reduktion wird durch zweimalige Zugabe von 20 µl Essigsäure gestoppt. Auch hier kommt es zur Entstehung von H₂, weshalb die Zugabe von Essigsäure sehr vorsichtig erfolgen muss. Danach folgen mehrere Entsalzungs- und Reinigungsschritte. Zunächst läuft die Probe durch einen Kationenaustauscher, wodurch Kationen gebunden und aus der Probe entfernt werden. Dieser Kationenaustauscher besteht aus 800 µl AG50W-x12 (H⁺). Die Säule wird mit 2 ml entionisiertem Wasser eluiert. Das Eluat wird in der Speed-Vac getrocknet. Zur Entfernung von flüchtigen Boratmethylestern wird die Probe in 2 x 200 µl 5%iger Essigsäure, welche in Methanol gelöst ist, aufgenommen. Ebenfalls werden 2 x 20 µl Toluol in die Probe gegeben. Zwischendurch wird die Probe stets getrocknet. Für die vollständige Entsalzung wird die in 100 µl entionisiertem Wasser resuspendierte Probe auf eine Mischbettionenaustauschsäule aufgetragen. Die Säule wird anschliessend mit 2 ml entionisiertem Wasser eluiert. Die Säule besteht aus 0.3 ml Chelex 100 (Na⁺), 0.2 ml AG50W-x12 (H⁺), 0.2 ml AG 3-x4A (OH⁻) und 0.1 ml QAE Sephadex (OH⁻) (alle Ionenaustauscher wurden von der Firma BioRad bezogen). Das aufgefangene Eluat wird durch einen 0.2 µm HPLC-Filter (Schleicher & Schnell) nochmals gereinigt.

Die Analyse der Core-Glykane kann nun über eine Anionenchromatographiesäule (Dionex-HPAEC), über eine Bio-Gel P4-Chromatographiesäule oder über eine High Performance Liquid Chromatography (HPLC) erfolgen.

3.2.7.2 Spaltung mit α -Mannosidase (Jack bean) und Spaltung mit *A. saitoi* α -1-2-Mannosidase

Die Spaltung mit α -Mannosidase (Jack bean) wird unter 3.2.6.1. beschrieben.

Die α -1-2-Mannosidase stammt aus *Aspergillus saitoi*.

Für die Spaltung wird die getrocknete Probe in 100 µl 0.1 M Natriumazetat (pH 5.0) resuspendiert. Es werden 10 mU α -1-2-Mannosidase hinzugefügt und für 14 Std. bei 37 °C inkubiert. Die Spaltung wird durch 3 minütiges Kochen bei 100 °C beendet. Es erfolgt eine Entsalzung der Probe mittels einer Austauschsäule bestehend aus Ag 3x4 (OH⁻) in der unteren und AG-50 WX 12 (H⁺) in der oberen Schicht. Die dabei aufgefangenen Eluate werden durch Filtration mit einem 0.2 µm Filter Porengröße nochmals gereinigt. Die Proben werden nun mittels Speed-Vac getrocknet und stehen für weitere Analysen mittels Dionex zur Verfügung (siehe 3.2.7.5).

3.2.7.3 Spaltung mit α -Galaktosidase

Die α -Galaktosidase stammt aus „Grünen Kaffee Bohnen“ der Firma Sigma.

Es erfolgt eine Resuspension der getrockneten Probe in 100 mM Natriumazetat (NaAc), pH 6.5. Ergänzend werden 3 µl 10% DOC und 0.2 U α -Galaktosidase hinzugefügt. Der Ansatz wird für 4 Std. bei 37 °C inkubiert. Anschliessend erfolgen eine N-Butanol-Wasser-Verteilung und die Analyse der Spaltungseffizienz durch die Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler.

3.2.7.4 Spaltung mit β -Galaktosidase

Die zur Spaltung von β -gebundener Galaktose verwendete β -Galaktosidase stammt aus *Streptococcus pneumoniae*.

Es werden 10 µl Inkubationspuffer X-5014 (Glycosystems, Oxford), sowie 90 µl Aqua dest. in die getrocknete Probe gegeben. Ebenfalls werden 3 µl 10% DOC hinzugegeben. Nach erfolgter Durchmischung werden 2 mU β -Galaktosidase in das Resuspensat pipettiert. Die Inkubation erfolgt für 4 Std. bei 37 °C und wird anschliessend mit einer n-Butanol-Wasser-Verteilung beendet. Die Spaltungseffizienz wird ebenfalls mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.2.7.5 Dionex-HPAEC (high-pH-anion-exchange-chromatography)

Für die Analyse der neutralen Core-Glykane stehen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Durch chromatographische Auftrennungsverfahren erhält man mehr Informationen über die unterschiedlichen

Strukturen der Core-Glykane. Zum einen kann man die Dionex-HPAEC verwenden. Die Dionex-HPAEC ist eine Anionen-Austausch-Chromatographie, mit deren Hilfe Mono- bzw. Oligosaccharide sehr spezifisch aufgetrennt werden können (Hardy und Townsend, 1988). Für die Analyse werden ca. 1500 cpm des aufgereinigten Core-Glykans auf die PA1-CarboPak-Säule aufgetragen. Zucker sind schwache Säuren. In der Säule herrscht ein stark alkalisches Milieu in dem die Zucker grösstenteils als Anionen vorliegen. Natriumhydroxid wird dabei als starker alkalischer Eluent eingesetzt. Die ionisierten Zucker binden an die Säule. Natriumazetat wird als Anionenaustauscher verwendet. Dieses ist im stark alkalischen Milieu ebenfalls anionisch und besitzt eine stärkere Bindungsaffinität zur Säule als die Zucker, wodurch diese aus ihrer Bindung verdrängt werden. Da Monosaccharide eine schwächere Bindungsaffinität zur Säule besitzen als Oligosaccharide, werden diese schneller aus der Säule eluiert. Zucker sind eigentlich alkalilabil, da aber dieses Verfahren nur 90 Minuten dauert, besteht keine Gefahr, dass diese zerstört werden.

Als interner Standard wird Dextranhydrolysat eingesetzt (5 µl). Diese Glukosepolymere besitzen verschiedene Längen und erlauben der radioaktiven Probe eine relative Grösse zuzuordnen. Sie werden durch „gepulste amperometrische“ Detektion nachgewiesen, d. h. dass ein Teil der Probe oxidiert wird und die dabei entstehende Potentialänderung bzw. der dabei entstehende Stromfluss gemessen wird. Das Elutionsvolumen bzw. die Elutionszeit der Radioaktivität in Bezug auf den Dextranstandard ergibt eine relative Elutionsposition, welche als „Dionexeinheit“ (DU) bezeichnet wird.

Durch den Vergleich mit bekannten GPI-Glykan-Strukturen erfolgt die Charakterisierung der chromatographisch aufgetrennten Core-Glykane von *T. rubrum*.

Elutionsprogramm für die Analyse von neutralen Glykanen an der HPAEC:

0.0 – 6.0 min	isokratisch 100 mM NaOH
6.1 – 36.0 min	auf 75 mM NaOAc / 100 mM NaOH
36.1 – 66.0 min	isokratisch 250 mM NaOAc / 100 mM NaOH
66.1 – 85.0 min	isokratisch 100 mM NaOH
Durchflussrate:	1 ml / min

3.2.7.6 Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie

Auch diese Untersuchungsmethode zählt zu den chromatographischen Auftrennungsverfahren. Die Analyse ermöglicht es, eine Aussage darüber zu treffen, aus wieviel Glukosefragmenten der Glykananteil der GPIs aufgebaut ist. Bei diesem Verfahren werden Moleküle entsprechend ihrer Grösse aufgetrennt. Es werden Moleküle mit einem Molekulargewicht von 200-3000 Dalton erfasst, d. h. es ist möglich, Strukturen mit 1-14 Glukoseeinheiten zu trennen. Für diese Analyse werden ca. 1500 cpm der aufgearbeiteten Probe mit freigesetztem Glykananteil und 100 µl Dextranhydrolysat als interner Standard auf die Säule aufgetragen (Yamashita *et al.*, 1982). Als Eluent wird 0.02 % Na-Azid verwendet. Da kleinere Moleküle die im Kieselgelbett vorhandenen Poren durchwandern müssen, laufen diese langsamer durch die Säule als grössere Moleküle. Überschreitet das Molekulargewicht das der Ausschlussgrenze (4 kDa), werden diese Moleküle ohne Verzögerung aus der Säule eluiert (Ausschussvolumen). Ist die Fraktionierung beendet (je ca. 600 µl pro Fraktion), werden aus jeder Fraktion 30 µl entnommen und in eine Mikrotiter-Platte (Nunc, Dänemark) pipettiert. Für die Nachweisreaktion des Standards werden 100 µl frisch angesetzte 0.2% Orcin / konz. Schwefelsäure dazu gegeben. Es findet eine Oxidation der Zucker statt, wodurch sich diese dunkelbraun-rötlich verfärben. Die unterschiedliche Intensität der Färbung erlaubt eine Abschätzung, in welchen Fraktionen die Maxima der verschiedenen Glukoseoligomere eluieren. Diese Abschätzung erfolgt sowohl per Auge, als auch in einem Microplate-Reader. Die Messung der OD wird dabei bei 450 nm durchgeführt. Die relativen Elutionsvolumina werden in Glukoseeinheiten (GU) angegeben. Die restliche Menge vorliegender Radioaktivität einer jeden Fraktion wird mittels des Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 **Metabolische Markierung von *T. rubrum*-Glykolipiden im zellfreien System**

Die radioaktive Markierung von Glykolipiden erfolgt im zellfreien System. Dazu wurde das Pilzmaterial gewaschen, lysiert, homogenisiert mittels Dounce-Homogenisator und sedimentiert. Anschliessend wurden Markierungen mit drei verschiedenen tritiierten Vorläufermolekülen vorgenommen. Zum einen mit UDP-N-acetyl-[³H]Glukosamin, mit GDP-[³H] Mannose, sowie mit UDP-[³H]Galaktose (3.2.2.2). Der danach durchgeführten Chloroform/Methanol/Wasser-Extraktion (3.2.3) folgt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der markierten Glykolipide von *Trichophyton rubrum* (3.2.4). Die Abbildung 4.1 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der markierten Glykolipide auf Kieselgel-Platten. Es handelt sich um das spezifische Glykolipidspektrum von *T. rubrum* (Tr_{gl}).

Die Markierung der Glykolipide mit den verschiedenen markierten Bausteinen des GPI-Ankers ergeben unterschiedliche Gipfel in der dünnschichtchromatographischen Auftrennung. Daraus können schon erste Aussagen über die Zusammensetzung der einzelnen Glykolipide getroffen werden.

In der Abb. A ist das Glykolipidspektrum des mit Mannose markierten Materials dünnschichtchromatographisch dargestellt. Es zeigt eine Auftrennung von sieben Glykolipiden, welche mit römischen Ziffern gekennzeichnet sind: Tr_{gl} I (R_f = 0.20), Tr_{gl} II (R_f = 0.36), Tr_{gl} III (R_f = 0.48), Tr_{gl} IV (R_f = 0.60), Tr_{gl} V (R_f = 0.68), Tr_{gl} VI (R_f = 0.80) und Tr_{gl} VII (R_f = 0.90). Der R_f-Wert ist dabei der Quotient aus der Laufstrecke der Analysekomponenten und der Laufstrecke des verwendeten Laufmittels. Die Gipfel haben eine unterschiedliche Ausprägung, d. h. dass unterschiedliche Mengen an Radioaktivität in die Glykolipide eingebaut wurden.

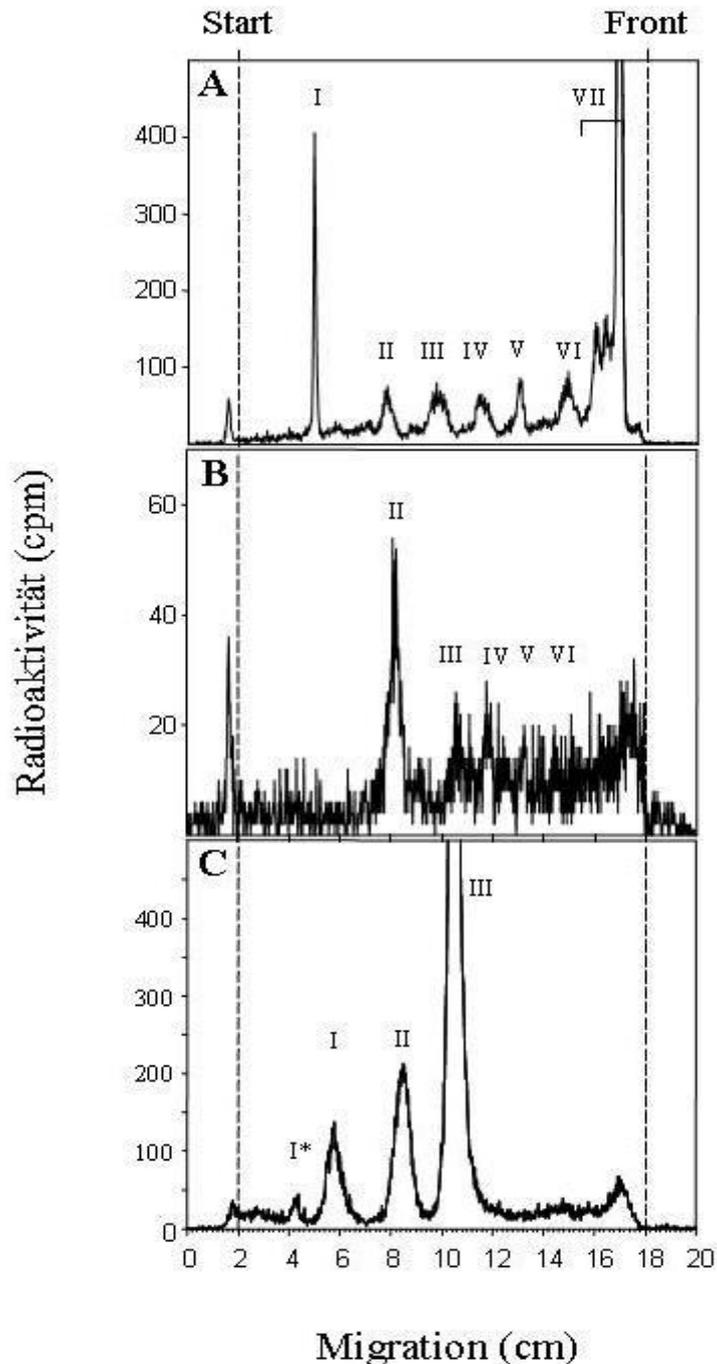


Abb. 4.1 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der mit unterschiedlichen Vorläufern markierten *T. rubrum*-Glykolipide

Die Abb. zeigt das spezifische Glykolipidspektrum von *T. rubrum*, wobei mit drei verschiedenen Vorläufermolekülen im zellfreien System markiert wurde. Die Glykolipide wurden mit C/M/W/ (10:10:3, v:v:v) extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde mittels TLC-Scanner (Berthold LB 2842) analysiert. Die Glykolipide wurden mit GDP- ^3H Mannose (A), mit UDP-N-acetyl- ^3H Glukosamin (B) und mit UDP- ^3H Galaktose (C) markiert. Es wurden sieben Glykolipide identifiziert, welche mit römischen Ziffern gekennzeichnet wurden.

In der Abb. B wird die Markierung mit tritiiertem Glukosamin dargestellt. Hier ergibt sich ein Spektrum mit einem Glykolipid (Tr_{gl} II, $R_f = 0.36$) Die Glykolipide II – VI lassen sich dagegen sehr unscharf auftrennen. Es ist dabei festzustellen, dass kaum tritiiertes Glukosamin in das Glykolipid VII eingebaut wird. Ausserdem kann man im Vergleich der Markierungen mit den verschiedenen Vorläufermolekülen feststellen, dass der Einbau des Glukosamins in die GPIs weniger effektiv verlief wie der Einbau von Mannose.

Die durchgeführte metabolische Markierung mit tritierter Galaktose und die anschliessende dünnschichtchromatographische Auftrennung ist in der Abb. 4.1 C dargestellt. Das Spektrum zeigt 4 Glykolipide, welche mit den Ziffern I*-III gekennzeichnet sind. Vergleicht man die R_f -Werte der einzelnen Glykolipide der drei Glykolipidspektren, kann man feststellen, dass diese bei Tr_{gl} I-III einander entsprechen.

4.2 Identifizierung der dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Glykolipide

Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung muss nun untersucht werden, ob es sich bei den markierten und aufgetrennten Glykolipiden um die zu erwartenden Glykosylphosphatidylinositole handelt. Dazu wurden verschiedene Spaltungen mit GPI-spezifischen Enzymen und chemische Hydrolysen durchgeführt. Die GPIs sind sensitiv gegenüber diesen Spaltungen, was darauf hinweist, dass es sich bei den aufgetrennten Glykolipiden um GPIs handelt. Für diese Untersuchungen wurden die einzelnen Glykolipide aus der Kieselgel-Platte eluiert (s. 3.2.5.1), aufgereinigt und anschliessend mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) (s. 3.2.5.2.1), Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase D (GPI-PLD) (s. 3.2.5.2.2) und mit salpetriger Säure (HNO_2) (s. 3.2.5.2.3) behandelt. Ebenfalls wurde eine alkalische Hydrolyse (KOH) durchgeführt (s. 3.2.5.2.4). Darauf folgend wurde eine Phasenverteilung zwischen wassergesättigtem n-Butanol und Wasser durchgeführt. Um die Spaltungseffizienz zu ermitteln, wurde in jeder Phase die Radioaktivität mittels dem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

In der Tabelle 4.1 sind die Spaltungsergebnisse zusammengefasst.

	R_r-Wert	markiert mit		sensitiv gegenüber der Behandlung mit			
		GDP-[³ H] Man	UDP-[³ H] GlcNAc	PI-PLC	GPI-PLD	HNO ₂	KOH
Tr_{gl} I	0.20	+	+	+	+	+	+
Tr_{gl} II	0.36	+	+	+	+	+	+
Tr_{gl} III	0.48	+	+	+	+	+	+
Tr_{gl} IV	0.60	+	+	+	+	+	+
Tr_{gl} V	0.68	+	+	+	+	+	+
Tr_{gl} VI	0.80	+	+	+	+	+	+
Tr_{gl} VII	0.90	+	-	-	-	-	-

Tabelle 4.1 Charakterisierung der *Trichophyton rubrum*-Glykolipide

Die nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung extrahierten Glykolipide wurden mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC), Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase D (GPI-PLD) und salpetriger Säure (HNO₂) behandelt, sowie einer alkalischen Hydrolyse (KOH) unterzogen.

Tr_{gl}: *Trichophyton rubrum*-Glykolipid;

+: sensitiv gegenüber der Behandlung;

-: insensitiv gegenüber der Behandlung

Aus der Tabelle kann man entnehmen, dass alle getesteten *Trichophyton rubrum*-Glykolipide (Tr_{gl}), ausser dem Glykolipid VII (Tr_{gl} VII), gegenüber der Behandlung mit PI-PLC und mit GPI-PLD sensitiv sind. Da die Spaltbarkeit mit PI-PLC von einem unsubstituierten Inositol in der Struktur abhängig ist, lässt sich daraus schliessen, dass sich in der Struktur der Tr_{gl} I-VI ein nicht-acylierter Inositolring nachweisen lässt. Des Weiteren lässt sich aus der Tab. 4.1 entnehmen, dass die Tr_{gl} I-VI durch die Behandlung mit HNO₂ gespalten wurden, also ebenfalls sensitiv reagieren. Diese Spaltung erfolgt nur, wenn ein nicht-acetyliertes Glukosamin in der Struktur vorhanden ist, sodass man für die Tr_{gl} schlussfolgernd sagen kann, dass sich ein solches nicht-acetyliertes Glukosamin in deren Struktur vorfindet. Um den hydrophoben Anteil der Glykolipide zu analysieren, wurde eine alkalische Hydrolyse (KOH) durchgeführt. Die Verseifbarkeit der gebundenen Fettsäuren bei Tr_{gl} I-VI zeigt, dass diese in einer Esterbindung vorliegen. Die Bindung der Fettsäuren erfolgt dabei an ein Glycerol.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass *Trichophyton rubrum* sechs Glykolipide synthetisiert, deren Strukturen aus einem nicht-acetylierten Glukosamin, aus einem Inositolphosphat, sowie aus einem an Glycerol estergebundenem Fettsäureanteil

bestehen. Die *T. rubrum*-Glykolipide I-VI konnten somit als GPI-Strukturen identifiziert werden.

4.3 Charakterisierung des „Glykolipids VII“

Das Glykolipid VII konnte nur mit GDP-[³H]Mannose markiert werden. Es weist keine Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit PI-PLC, GPI-PLD, salpetriger Säure (HNO₂) und der alkalischen Hydrolyse auf (s. Tab. 4.1). Auch die chromatographische Auswertung in Abbildung 4.2 zeigt, dass keine Spaltung mit salpetriger Säure (HNO₂, Abb. 4.2 A) stattfand, auch keine Spaltung mit PI-PLC, wie in Abb. B dargestellt ist. Zusätzlich wurde eine Spaltung der metabolisch markierten Glykolipide mit α -Mannosidase Jack bean durchgeführt (s. 3.2.6.1). Die dünnschichtchromatographische Auftrennung (Abb. C) zeigt, dass infolge der Spaltung mit Mannosidase der VII. Gipfel vollständig eliminiert wurde.

Aufgrund dieser sensitiven Spaltung durch α -Mannosidase Jack bean und des chromatographischen Verhaltens ($R_f=0.90$), sowie des insensitiven Spaltungsverhaltens gegenüber HNO₂ und PI-PLC liegt es nahe, dass es sich bei dem Glykolipid VII um Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man) handelt, welche als Donor bei der GPI-Biosynthese tätig ist. Um die Vermutung zu bestätigen, wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

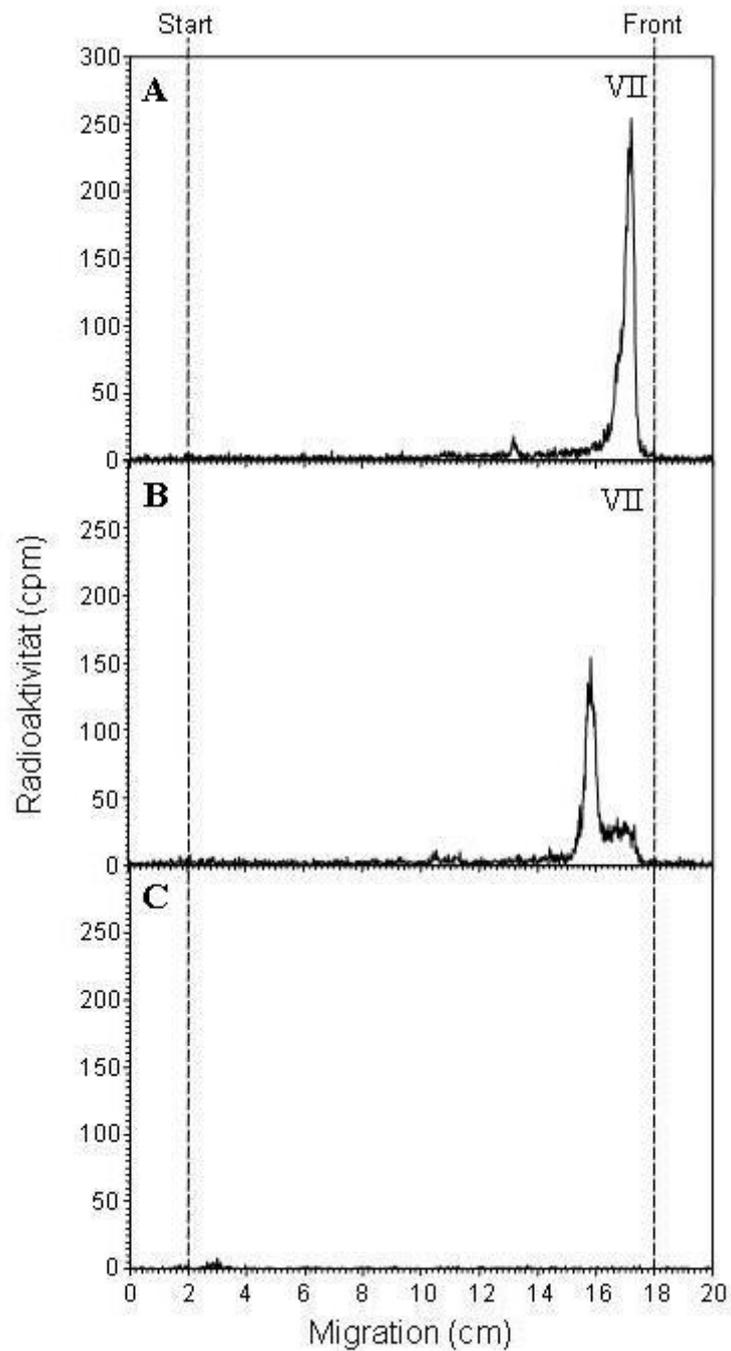


Abb. 4.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der GDP-Man markierten Glykolipide nach Spaltung mit A) salpetriger Säure (HNO_2), mit B) PI-PLC und C) nach Spaltung mit α -Mannosidase Jack bean

Die Abb. A) und B) zeigen die Unempfindlichkeit des Glykolipids VII ($R_f = 0.90$) gegenüber der Behandlung mit HNO_2 und PI-PLC. In der Abb. C) ist die Spaltbarkeit mit α -Mannosidase Jack bean dargestellt. Am ehesten spricht das Spaltungsverhalten für das Vorliegen von Dol-P-Man.

Radioaktivität. Daraus lässt sich schliessen, dass durch Amphomycin die Dol-P-Man-Synthetase fast vollständig inhibiert wurde, wodurch weniger Material an Dol-P-Man für den Einbau von radioaktivem Material in die GPIs zur Verfügung stand.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die GPI-Biosynthese durch die Inhibition der Dol-P-Man-Synthetase durch den Zusatz von Amphomycin beeinflusst bzw. gehemmt wird. Das Chromatographieverhalten in der Abb 4.4 B spricht dafür, dass es sich bei dem *T. rubrum*-Glykolipid VII (Tr_{gl} VII) um Dol-P-Man handelt.

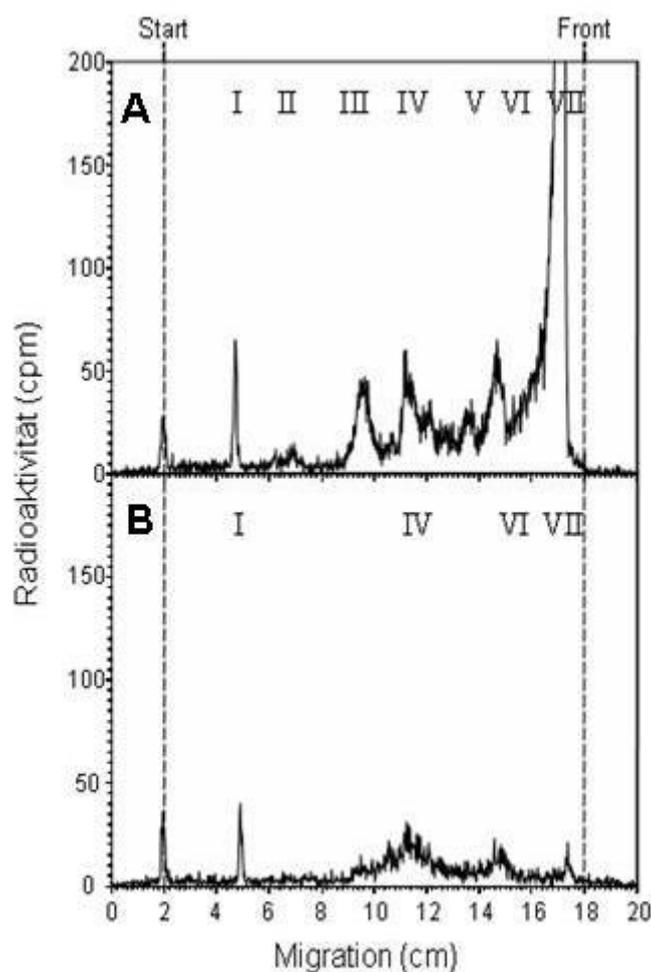


Abb. 4.4 Dünnschichtchromatographische Auswertung der metabolischen Markierung mit GDP- ^{3}H Man mit Zugabe von Amphomycin

Die Abb. A) zeigt das Spektrum nach metabolischer Markierung mit GDP- ^{3}H Man. In der Abb. B) stellt sich ein verändertes Spektrum nach Zugabe von Amphomycin dar. Das Glykolipid VII ($R_F=0.90$) wird fast vollständig in seiner Synthese gehemmt.

4.3.2 Auswertung der Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose ist ein Verfahren, durch das Dolichol-Phosphat-Mannose gereinigt werden kann. Zum einen wird mit 0.2 M Ammoniumacetat Dolichol-Phosphat (Dol-P⁻) aus der Säule eluiert, zweitens wird mit 0.4 M Ammoniumacetat Dolichol-Diphosphat (Dol-PP⁻) aus der Säule eluiert. Die Eluate werden im Fraktionskollektor gesammelt, es wird ein Aliquot aus jeder Fraktion entnommen und mittels Flüssigkeitsszintillationszähler wird die Radioaktivität bestimmt (s. 3.2.6.3).

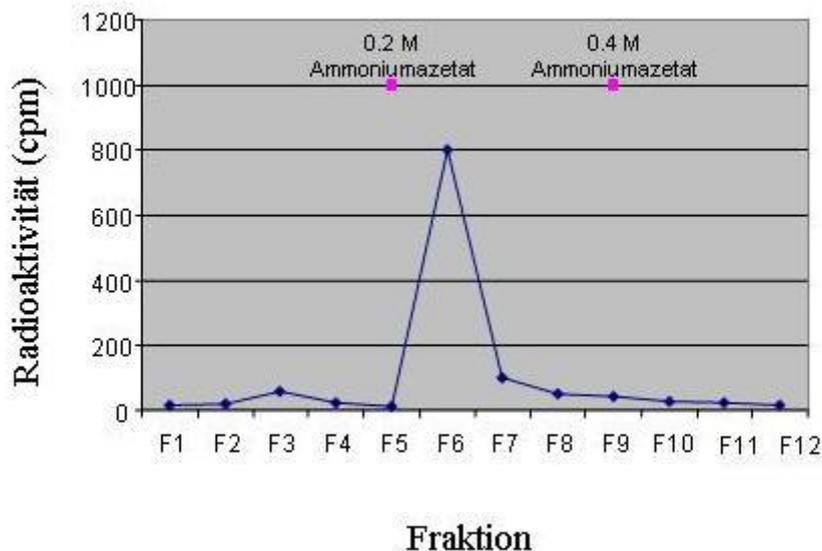


Abb. 4.5 Auswertung der Analyse von Dolichol-Phosphat-Monosacchariden durch Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose

Um Dol-P-Man untersuchen zu können, wurden die *Trichophyton rubrum*-Glykolipide im zellfreien System mit GDP-Man markiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Der zu untersuchende Gipfel VII wurde aus der Kieselgel-Platte ausgeschabt, aufgereinigt und in die Säule aufgetragen. Das Eluat wird dabei in Fraktionen gesammelt. Es folgt eine Waschung der Säule mit 0.2 M Ammoniumazetat bei Fraktion 5 und mit 0.4 M Ammoniumazetat bei Fraktion 9. Mittels Radioaktivitätsmessung konnte festgestellt werden, dass die Fraktion 6 die höchste Aktivität aufweist. Daraus kann man schlussfolgern, dass es sich hierbei um das Dol-P handelt, welches mittels 0.2 M Ammoniumazetat aus der Säule gewaschen wurde.

In der Abbildung 4.5. ist die Auswertung der Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose dargestellt. Aus dieser kann man entnehmen, dass das Eluat in 12 Fraktionen gesammelt wurde. Ab der Fraktion 5 wurde 0.2 M Ammoniumazetat als Waschsubstanz auf die Säule aufgetragen und ab der Fraktion 9 0.4 M Ammoniumazetat. In der Fraktion sechs wurde die höchste Radioaktivität gemessen. Demzufolge wurde mit Hilfe des 0.2 M Ammoniumazetat das Dolichol-Phosphat⁻ aus der Säule eluiert, was dafür spricht, dass es sich bei der Probe um Dolichol-Phosphat-Mannose handelt.

4.4 Analyse der durch Spaltung mit wässriger Flusssäure dargestellten neutralen Core-Glykane der GPIs

4.4.1 Dionex-HPAEC Analyse

Bei der Dionex-HPAEC Analyse handelt sich um eine Anionenaustauschchromatographie, bei der Oligosaccharide sehr spezifisch aufgetrennt werden können (s. 3.2.7.5). Man erhält somit Informationen über die Struktur und Bindungsverhältnisse der verschiedenen Core-Glykane.

Da nur geringe Mengen an radioaktiv markiertem Material zu weiterführenden Untersuchungen zur Verfügung stehen, wurde das gesamte Material an extrahierten Glykolipiden analysiert. Dabei wurden die von *T. rubrum* synthetisierten Glykolipide mit GDP-[³H]Mannose im zellfreien System markiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und der Spaltung mit wässriger Flusssäure (HF) unterzogen (s. 3.2.7.1). Die über Mischbettionenaustauscher entsalzten und filtrierten neutralen Core-Glykane können nun auf der Dionex-HPAEC-Anlage analysiert werden.

Die Analyse der Core-Glykane sind in der Abbildung 4.6 dargestellt. Die Gipfel in Abbildung 4.6 zeigen die Positionen an, an denen die neutralen Core-Glykane eluieren. Anhand der Elutionspositionen von Standards bekannter Strukturen können die eluierten Glykolipide genau analysiert werden, d. h. es lässt sich auf die genaue Struktur der einzelnen Core-Glykane schließen. Gleichzeitig wurde mit der Probe ein Glukose-Oligomer Standard injiziert, so dass man auch im Vergleich dazu die genaue Elutionsposition bestimmen kann.

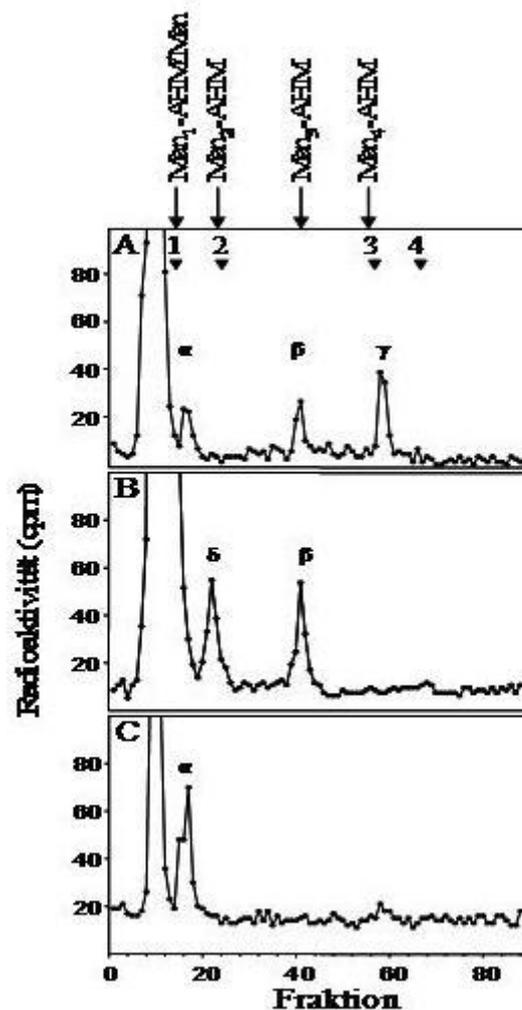


Abb. 4.6 Dionex HPAEC-Analyse der dephosphorylierten, deaminierten und reduzierten Core-Glykane von *Trichophyton rubrum*

Die zu untersuchenden Glykolipide wurden mit GDP- ^3H Mannose im zellfreien System markiert. Die durch Dephosphorylierung, Deaminierung und Reduktion dargestellten Core-Glykane der gesamten Menge an markierten Glykolipiden sind in (A) dargestellt, ein Teil der Probe wurde mit der *Aspergillus saitoi* α -1-2Mannosidase gespalten (B) und der Rest der Probe wurde mit einer Jack bean α -Mannosidase gespalten (C). Zum Vergleich wurden als Standards die Elutionspositionen von Mannose (Man), Mannose₁-anhydromannitol (Man₁-AHM), Man₂-AHM, Man₃-AHM und Man₄-AHM der *P. falciparum* Core-Glykane verwendet. Ebenfalls sind die Elutionspositionen der Glukose-Oligomer Standards eingezeichnet.

Die Untersuchung der gesamten Menge an Core-Glykanen (Abb. A) zeigt, dass diese an drei verschiedenen Positionen eluieren, bei 1,1, 2,5 und 3,0 Glukose-Einheiten (GU). Vergleicht man nun diese Werte mit den Elutionspositionen der Standards bekannter Strukturen, z. B. von *P. falciparum* GPIs, so kann man sagen, dass das erste Fragment

(α) mit Man_1 - anhydromannitol coeluiert, das zweite Fragment (β) mit Man_3 -anhydromannitol und das dritte Fragment (γ) mit Man_4 -anhydromannitol des *P. falciparum*-Standards coeluiert (Gerold *et al.*, 1994). Der Gipfel am Anfang wird als Injektionspeak (IP) bezeichnet. Dass dieser am grössten ist lässt sich dadurch erklären, dass die gesamte Menge an radioaktiv markierten Glykolipiden in die HPAEC-Dionexanlage injiziert wurde.

Um zu prüfen, wie sich das Elutionsverhalten durch Mannosidase-Spaltungen ändert, wurde ein Teil der Probe mit *Aspergillus saitoi* α -1-2- Mannosidase gespalten (Abb.B) und der andere Teil mit Jack bean α -Mannosidase (Abb. C). Die Spaltung mit der *A. saitoi* α -1-2-Mannosidase zeigt zwei Fragmente, welche bei 1.9 DU eluieren und bei 3.0 DU (β). Das erste Fragment (δ) coeluiert mit dem Man_2 -AHM Standard, sodass es im Vergleich zur Abb. A den Anschein hat, dass zwei endständige α -1-2 verbundene Mannosen durch die Mannosidase abgespalten wurden. Das zweite Fragment coeluiert wie in Abb. A mit dem Man_3 -AHM Standard. Die HPAEC-Auswertung nach der Spaltung mit Jack bean α -Mannosidase zeigt ein Hauptfragment (α), welches bei 1.1 DU eluiert und damit mit dem Mannose-Standard (Man_1 -AHM) coeluiert. Die Spaltung ist sensitiv, d. h. dass das Core-Glykan aus drei freien Mannosen aufgebaut ist, welche durch die Jack bean α -Mannosidase abgespalten wurden, sodass nur noch ein Fragment mit einem Mannose-anhydromannitol eluiert (C).

Die bisher gewonnenen Ergebnisse lassen aufgrund des Elutionsverhaltens der Core-Glykane an der Dionex-HPAEC und der Sensitivität der Glykane gegenüber der α -Mannosidase-Spaltungen den Schluss zu, dass die Struktur der evolutionär hochkonservierten Core-Glykane der in *T. rubrum* synthetisierten GPIs im Vergleich zu Core-Glykan-Strukturen anderer eukaryontischer Zellen (Man_α 1-2- Man_α 1-6- Man_α 1-4AHM) zusätzlich eine Mannose in einer α -1-2 Verknüpfung besitzt.

4.4.2 Auswertung der Core-Glykane mit Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie

Bei dieser Gelfiltrationschromatographie erfolgt eine Auftrennung der Glukosepolymeren nach Grösse (s. 3.2.7.6). Dafür wurde ein Dextranhydrolysat als interner Standard verwendet. Für diese Analyse wurden die von *T. rubrum* synthetisierten Glykolipide mit GDP- ^3H]Mannose radioaktiv markiert und anschliessend durch eine wassergesättigte n-Butanol-Wasser Verteilung extrahiert. Die

Gesamtheit der radioaktiv markierten Glykolipide wird dann der Spaltung mit wässriger Flusssäure (HF-Säure) unterzogen. Die Glykolipide werden also mittels HF-Säure dephosphoryliert, durch die anschließende Deaminierung wird das Inositol vom Glukosamin abgespalten. Das Glukosamin wird dann zu einem Anhydromannitol reduziert. Nach erfolgter Dephosphorylierung, Deaminierung und Reduktion wird das Core-Glykanfragment entsalzt und über Filter gereinigt. Dieses Fragment wird dann gleichzeitig mit einem internen Glukosestandard auf die Bio-Gel P4 Säule aufgetragen. Im Fraktionssammler werden die Eluate gesammelt. Anhand des internen Standards können die Elutionspositionen der einzelnen Fragmente bestimmt werden. Gleichzeitig wird die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

In der Abbildung 4.7 ist die Auswertung der Gelfiltrationschromatographie dargestellt. Es sind hier drei Hauptfragment der Core-Glykane zu sehen (α , β und γ), welche an den Positionen 1.5 (α), 4.1 (β) und 5.6 (γ) Glukoseeinheiten (GU) eluieren. Des Weiteren coeluieren sie an der gleichen Position wie die entsprechenden *P. falciparum*-GPIs bekannter Struktur, welche als Standards zur Verfügung stehen. Das *T. rubrum* Core-Glykan Fragment α coeluiert mit Man₁-AHM, das Core-Glykan Fragment β coeluiert mit Man₃-AHM und das Fragment γ coeluiert mit Man₄-AHM.

Anhand der dargestellten Ergebnisse der Dionex-HPAEC-Analyse und der Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie lässt sich eine vorläufige Struktur der neutralen Core-Glykane von *Trichophyton rubrum* ableiten. Es ist davon auszugehen das es sich um eine Tetramannosylstruktur handelt.

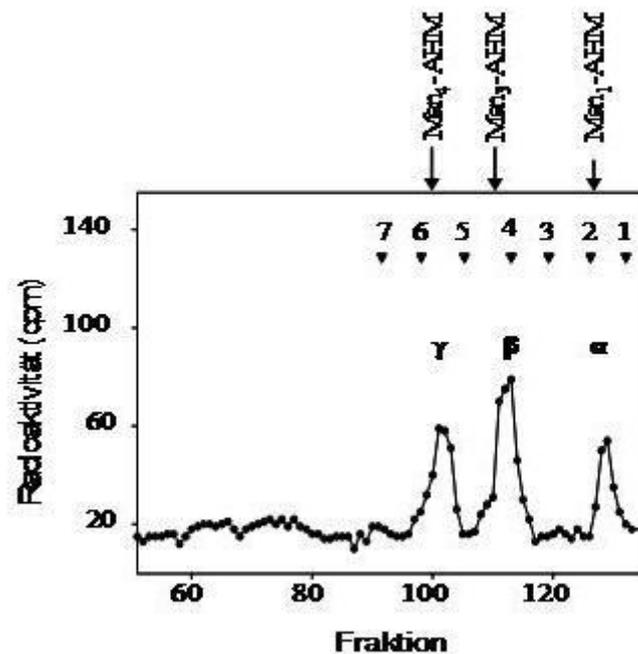


Abb. 4.7 Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie der durch Spaltung mit wässriger Flusssäure dargestellten neutralen Core-Glykane

Trichophyton rubrum-Glykolipide wurden im zellfreien System mit GDP-[³H] Mannose radioaktiv markiert und der Spaltung mit wässriger Flusssäure (HF) unterzogen. Die so dargestellten neutralen Core-Glykane wurden dann auf die Säule aufgetragen. Die einzelnen Fragmente wurden im Fraktionssammler aufgefangen und mittels Flüssigkeitsszintillationszähler wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Durch Vergleiche mit internen Standards kann die Elutionsposition der einzelnen Fragmente ermittelt werden. Als interner Standard wurden Glukose-Oligomere verwendet, welche über dem Chromatogramm eingezeichnet sind (GU). Des Weiteren kamen GPI-Standards von *P. falciparum* zur Anwendung (Man₁-AHM= Mannose₁-anhydromannitol, Man₃-AHM und Man₄-AHM).

4.5 Untersuchung zum Einbau von Galaktose als mögliche Modifikation

Brennan und Roe beschrieben bei *Aspergillus niger* ein wasserlösliches phosphoryliertes Glykosphingolipid, welches aus Inositol, Mannose, Galaktose und Glukosamin aufgebaut ist (Brennan und Roe, 1975). Um zu prüfen, ob *Trichophyton rubrum* ebenfalls Galaktose in die Struktur der GPIs einbaut, wurde eine metabolische Markierung mit UDP-[³H]Galaktose vorgenommen (s. 3.2.2.2). Anschliessend erfolgte die Extraktion der Glykolipide (s. 3.2.3) und die dünnschichtchromatographische Auftrennung, deren Spektrum in der Abbildung 4.1 (C) dargestellt ist. Bei dieser

Dünnschichtchromatographie ist die Auftrennung dreier Glykolipide (Tr_{gl} I-III) zu erkennen und einem kleinen unscheinbaren vierten Glykolipid (Tr_{gl} I*). Vergleicht man die R_f-Werte der drei Glykolipide (s. Tab. 4.2) mit den R_f-Werten der mit GDP-Mannose markierten Glykolipide (s. Tab. 4.1), so kann festgestellt werden, dass Tr_{gl} I-III cochromatographieren und es sich somit um die gleichen Glykolipide handelt. Die Tr_{gl} I-III lassen sich sowohl mit Mannose als auch mit Galaktose markieren, was dafür spricht, dass sie sowohl Mannose als auch Galaktose in ihre Struktur einbauen. Das es sich bei den UDP-Galaktose markierten Glykolipide um GPIs handelt, beweist auch, dass die Glykolipide mit Hilfe salpetriger Säure (HNO₂), mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) und mit Glykosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D (GPI-PLD) gespalten wurden. Um zu untersuchen, ob die Grundstruktur der Glykolipide Galaktose enthält, wurde das Tr_{gl} III, welches aufgrund der höchsten Einbaurate an radioaktivem Material ausgewählt wurde, einer Spaltung mit α - und β -Galaktosidase unterzogen. Diese Spaltungsergebnisse sind in der Tabelle 4.2 zusammengestellt.

	R _f -Wert	GPI-Struktur sensitiv gegenüber der Behandlung mit:				
		PI-PLC	GPI-PLD	HNO ₂	α -Galaktosid.	β -Galaktosid.
Tr _{gl} I	0.20	+	+	+	n.u.	n.u.
Tr _{gl} II	0.36	+	+	+	n.u.	n.u.
Tr _{gl} III	0.48	+	+	+	+	+

Tabelle 4.2 Charakterisierung der mit UDP-Galaktose markierten Glykolipide

Die Glykolipide wurden mit UDP-[³H]Galaktose markiert und dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Die extrahierten Glykolipide wurden mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC), Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase D (GPI-PLD) und salpetriger Säure (HNO₂) behandelt. Ebenfalls wurden Spaltungen mit α - und β -Galaktosidase durchgeführt.

n. u.: nicht untersucht; +: sensitiv gegenüber der Behandlung

Tr_{gl}: *Trichophyton rubrum* -Glykolipid

Des Weiteren wurden die neutralen Core-Glykane des gesamten markierten Materials einer Jack bean α -Mannosidase Spaltung unterzogen. Die GPI-Struktur zeigte sich sensitiv gegenüber der Behandlung (Ergebnisse nicht dargestellt).

Aufgrund der gesamten Ergebnisse (Markierbarkeit mit Galaktose und Spaltungsverhalten) lässt sich schlussfolgern, dass in die neutralen Core-Glykane der GPIs von *Trichophyton rubrum* Galaktose eingebaut wird. Durch die Spaltbarkeit mit wässriger Flusssäure wird verdeutlicht, dass Galaktose nicht als festes Strukturbestandteil in die neutralen Core-Glykane der Tr_{gl} I-III eingebaut wird. Es ist aufgrund des Spaltungsverhaltens davon auszugehen, dass Galaktose über eine säurelabile Verbindung an das Core-Glykan gebunden ist, da die Behandlung mit wässriger Flusssäure eine Auflösung labiler Bindungen zur Folge hat.

5. Diskussion

Um die Entwicklung von neuen und effektiven Therapiestrategien in der antifugalen Therapie weiter voranzutreiben, ist es wichtig, Strukturen und Funktionsabläufe bei diesen pathogenen Organismen genau zu analysieren und zu verstehen. Die Biosynthese von Zellwandbestandteilen wie zum Beispiel Glykanen, Mannoproteinen und anderen Makromolekülen spielen dabei eine grosse Rolle (Lartey und Moehle, 1997). Bisherige Untersuchungen zu Polysaccharidstrukturen der Zellwand bei *Trichophyton*-Spezies wurden in unterschiedlichsten Weisen durchgeführt. Man fand hierbei Zellwandbestandteile wie Mannan oder Galaktomannan, welche eine grosse immunologische Rolle spielen (Blake *et al.*, 1991; Grando *et al.*, 1992a; Grando *et al.*, 1992b) und deren Strukturen genau analysiert wurden (Ikuta *et al.*, 1997). Zahlreiche Untersuchungen an Hefen und Pilzen haben u. a. gezeigt, dass die posttranslationale Modifikation von Oberflächenproteinen durch GPIs für die Synthese der Zellwand erforderlich zu sein scheint (Mouyna *et al.*, 2000; Popolo und Alberghina, 1984; Popolo *et al.*, 1986; Conzelmann *et al.*, 1988; Nuoffer *et al.*, 1991; Muhlschlegel und Fonza, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Bisherige Untersuchungen von GPIs wurden vor allem an Parasiten, Hefen oder anderen Pilzen, wie zum Beispiel an *Aspergillus fumigatus* vorgenommen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich erstmals mit der Darstellung und Charakterisierung von Glykosylphosphatidylinositolen bei dem anthropophilen Pilz *Trichophyton rubrum*.

***Trichophyton rubrum*-Glykolipide konnten im zellfreien System effektiv markiert werden**

Die Untersuchungen wurden *in vitro* durchgeführt, da *T. rubrum* eine relativ langsame Wachstumsgeschwindigkeit aufweist, was die Untersuchungen erschwert. Um den gesamten Biosyntheseweg untersuchen zu können, ist es wichtig, alle beteiligten Vorläufermoleküle zu analysieren. Dies ist nur im zellfreien System möglich. Die Kultivierung von *T. rubrum* erfolgte bisher mit Hilfe von standardisierten Agarplatten. Da eine Materialgewinnung aus diesen nicht möglich erschien wurde ein bisher nicht standardisiertes Flüssignährmedium angefertigt. Um eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen zu verhindern, wurde dem Medium Chloramphenicol zugefügt. Durch die Anfertigung von Kontrollausstrichen konnte eine Besiedelung mit anderen

Mikroorganismen geprüft werden. Eine mögliche Fehlbesiedelung kann jedoch auch nach Anfertigung von Kontrollausstrichkulturen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei den von mir verwendeten angezüchteten Kulturen um eine reine *Trichophyton*-Kultur handelt.

Mit dem gewonnenen Material wurde versucht, durch hypotone Lyse ein zellfreies System zu schaffen, in dem die aufgeschlüsselten Membranbestandteile mit verschiedenen radioaktiven Komponenten in Anwesenheit von Tunikamycin, einem kompetitiven Inhibitor des ersten Schrittes im Dolichol-Zyklus (Elbein, 1987) und von Nikkomycin Z, einen Inhibitor der Chitin-Biosynthese (Gaughran *et al.*, 1994), markiert wurden. Die Glykolipide wurden anschliessend extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Es ergaben sich hierbei sieben in der Kieselgel-Platte migrierende Glykolipide (Tr_{gl} I-VII). Die Bereitstellung einer ausreichend grossen Zellzahl gestaltet sich als schwierig, da bisher keine standardisierten Protokolle zur Aufbearbeitung von *Trichophyton rubrum*-Zellen zur Verfügung stehen. Es zeigte sich insgesamt im Vergleich zu anderen Untersuchungen unter Verwendung von Protozoenmaterial ein geringerer Einbau an tritierten Zuckern. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass während der Aufbearbeitung der Zellen ein Grossteil der Membranstrukturen zerstört wurde oder durch die Anwesenheit von nicht vollständig eliminierten unbekanntem Inhibitoren der Einbau gestört wurde.

Glykosylphosphatidylinositole mit einem nicht-acylierten Inositolring

Die Charakterisierung der GPIs erfolgt nach Elution und Reinigung aus der Kieselgel-Platte. Anschliessend erfolgt die Behandlung mit HNO₂, PI-PLC und GPI-PLD. Die hier vorgelegten Daten zeigen eine Sensitivität gegenüber der Behandlung bei sechs der sieben dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Glykolipide (Tr_{gl} I-VI). Daher kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um GPIs handelt. Da die Spaltbarkeit mit PI-PLC von einem unsubstituierten Inositol in der Struktur abhängig ist, lässt sich daraus schliessen, dass bei den uns vorliegenden Glykolipiden ein solcher nicht-acylierter Inositolring vorhanden ist. Im Gegensatz dazu finden sich Modifikationen am Inositolring bei GPIs von Säugetieren sowie bei Hefen (McConville, 1996), als auch bei *Aspergillus fumigatus*-GPIs (Fontaine *et al.*, 2004). Bei *T. b. brucei* wurde zum Beispiel das GPI-Lipid P3 näher beschrieben (Mayor *et al.*, 1990b).

Identifizierung von Dolichol-Phosphat-Mannose

Wie bereits erwähnt, konnte bei dem Glykolipid VII (Tr_{gl} VII) keine Sensitivität gegenüber der Behandlung mit PI-PLC, GPI-PLD, HNO_2 und der alkalischen Hydrolyse festgestellt werden. Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich hierbei um Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man) handelt, welche als Mannose-Donor bei der GPI-Biosynthese fungiert, wurde eine Mannosidase-Spaltung durchgeführt. Das Glykolipid VII zeigte eine Sensitivität gegenüber dieser Spaltung. Auch eine radioaktive Markierung mit GDP- $[\text{}^3\text{H}]$ Mannose plus dem Zusatz von Amphomycin, welches die Synthese von Dol-P-Man inhibiert, zeigt, dass wesentlich geringere Mengen an Mannose eingebaut werden, so dass man annehmen muss, dass es sich bei dem Glykolipid um Dol-P-Man handelt. Diese Ergebnisse lassen auch vermuten, dass Dol-P-Man eine wesentliche Rolle als Donor bei der Biosynthese der GPIs bei *T. rubrum* spielt. Dahingegen fand man bei *A. fumigatus* zwei Biosynthesewege. Dabei werden zum einen Mannosereste mit Hilfe von Dol-P-Man auf GlcN-(acyl)PI übertragen, dagegen in einem zweiten Weg gezeigt, dass ohne Dol-P-Man als Donor eine Übertragung von Mannoseresten auf GlcN-PI stattfindet (Fontaine *et al.*, 2004). Dies wurde bisher erstmals bei Pilzen beschrieben.

Identifizierung des hydrophoben Anteils als Diacylglycerol

Um den hydrophoben Anteil der Glykolipide genauer zu identifizieren, d. h. um zu prüfen ob die Fettsäuren über ein Diacylglycerol oder ein Ceramid, wie zum Beispiel bei Sphingolipiden, am Glykan gebunden sind, wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Deren Ergebnis erlaubt die Vermutung, dass der hydrophobe Anteil der *T. rubrum* Glykolipide I-VI über eine Esterbindung am Diacylglycerol gebunden ist. Vergleicht man dies mit Untersuchungen zu einem phosphorylierten Glykosphingolipid bei *Aspergillus niger*, so zeigt sich, dass hier der hydrophobe Anteil über ein Ceramid mit dem Glykananteil verbunden ist (Brennan und Roe, 1975). Und auch bei Untersuchungen an Sphingolipiden bei dem Pilz *Sporothrix schenckii* hat man gezeigt, dass der hydrophobe Anteil über ein Ceramid gebunden ist (Toledo *et al.*, 2001).

Identifizierung einer zusätzlich an das Trimannosylglykan gebundenen Mannose als Modifikation

Die hydrophilen Anteile der Glykolipide wurden mit Hilfe des Dionex-HPAEC Analyseverfahrens genauer untersucht. Dieses ist ein, für die Strukturanalyse der

Oligosaccharide, hochselektives Verfahren und erlaubt ebenfalls eine Aussage über deren Bindungsverhältnisse. Für eine Grössenanalyse steht die Bio-Gel P4 Gelfiltrationschromatographie, auch als Größenausschlusschromatographie bezeichnet, zur Verfügung. Für diese beiden Untersuchungen standen nur geringe Mengen an radioaktiv markiertem Material zur Verfügung, sodass das gesamte Material an markierten und extrahierten Glykolipiden verwendet wurde. Für die geringe Markierbarkeit (dies gilt auch für die Markierung mit Glukosamin) sind verschiedenste Ursachen zu diskutieren. Zum einen wäre es möglich, dass die Markierungen und damit der Einbau der tritiierten Zucker nicht effizient genug verlaufen. Weiterhin könnten keine optimalen Bedingungen für die enzymatische Aktivität vorliegen, wie zum Beispiel bei dem Vorliegen suboptimaler Temperaturbedingungen. Die Enzyme selbst könnten nicht effektiv genug arbeiten. Auch könnte eine Kontamination mit GPIs aus dem intrazellulären Pool zu einer geringeren Markierungseffizienz beitragen. Diese Probleme treten auch bei anderen Systemen, wie z. B. bei *Plasmodien* oder bei *Trypanosomen* auf. Trotz der geringen Anzahl an Counts reichen diese jedoch aus, um Untersuchungen zur Charakterisierung der GPIs durchzuführen, wie diese Arbeit zeigen konnte.

Um die neutralen Core-Glykane zu erhalten, wurde das Untersuchungsmaterial einer Spaltung mit wässriger Flusssäure unterzogen, es folgte eine Deaminierung und Reduktion. Um nun eine genaue Aussage über die spezielle Struktur und Grösse der *T. rubrum*-Core-Glykane treffen zu können, wurde deren Elutionsverhalten in beiden Chromatographiesystemen mit denen von GPI-Standards aus *P. falciparum* verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass *T. rubrum*-Glykane an 3 Positionen mit den Standardsubstanzen coeluierten. Das heisst, ein Fragment (α) coeluiert mit Man₁-anhydromannitol, ein zweites Fragment (β) mit Man₃-anhydromannitol und ein drittes Fragment (γ) mit Man₄-anhydromannitol (Gerold *et al.*, 1994). Damit unterstützt es die Annahme, dass es sich um vier Mannosen in der Struktur der Core-Glykane der GPIs bei *T. rubrum* handelt. Um deren genauen Bindungsverhältnisse zu analysieren, wurden Spaltungen der Core-Glykane, zum einen mit *A. saitoi* α -1-2Mannosidase und zum anderen mit Jack bean α -Mannosidase durchgeführt und anschliessend die Fragmente der Dionex-Chromatographie-Analyse unterzogen. Die Sensitivität der Spaltungsverfahren, sowie deren Elutionsverhalten lassen darauf schliessen, dass es sich bei allen *T. rubrum*-Glykolipiden um die evolutionär hochkonservierte Trimannosyl-Glykanstruktur handelt, welche man bei allen GPIs findet, Man α 1-2-Man α 1-6-Man α

1-4AHM (McConvell und Freguson, 1993; Field und Menon, 1992). Aus diesem Grund ist es anzunehmen, dass der Biosyntheseweg für das Core-Glykan bei *T. rubrum* ebenfalls konserviert und damit identisch der Biosynthese anderer Organismen ist. Dabei könnte dieser wie in Abbildung 5.1 gezeigt aussehen.

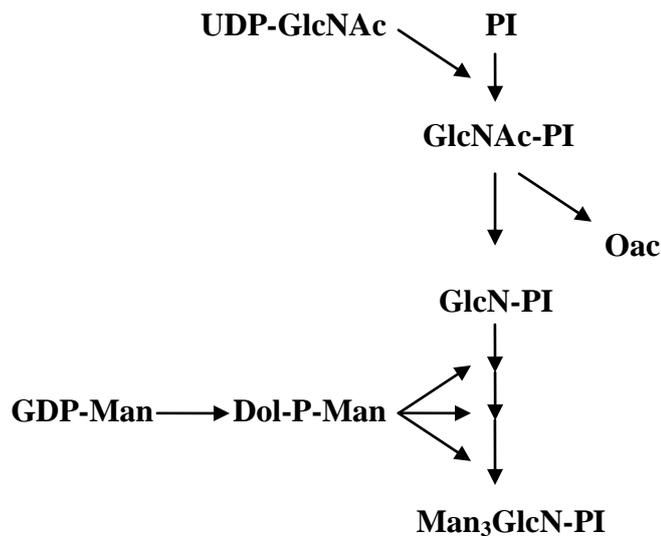


Abb. 5.1 Hypothetischer Biosyntheseweg des GPI-Core-Glykans von *T. rubrum*

Übertragung eines aktivierten N-acetyl-Glukosamins (UDP-GlcNAc) auf Phosphatidylinositol (PI). Nach Abspaltung eines N-Acetylrestes (Oac) werden mit Hilfe von Dolichol-Phosphat-Mannose als Donor 3 Mannosen auf das Glukosamin übertragen. Es entsteht das Trimannosyl-Core-Glykan (Man₃GlcN-PI).

Zusätzlich liegt es nahe, dass man bei *T. rubrum* Modifikationen am neutralen Core-Glykan vorfindet. Dabei konnten die Untersuchungen zeigen, dass es sich hierbei um eine α 1-2 gebundene Mannose handelt. Um deren genaue Position kann bisher nur spekuliert werden, es ist aber anzunehmen, dass diese Mannose endständig am Core-Glykan gebunden ist. Auch am Beispiel von *P. falciparum* GPIs zeigt sich eine vierte Mannose als Rest mit dem Core-Glykan verbunden (Gerold *et al.*, 1996b). Bei *A. fumigatus* fand man dagegen 2 Typen von GPIs. Erstens ein Glucosamininositolphosphat mit ein bis zwei gebundenen Mannosen, des Weiteren ein Glucosamin-(acyl)inositolphosphat mit ein bis fünf gebundenen Mannosen als Reste (Fontaine *et al.*, 2004).

Inkorporation von Galaktose

Es stellt sich ebenfalls die Frage nach weiteren Modifikationen an der Glykanstruktur, wie zum Beispiel dem Vorhandensein von Galaktose, wie man dies in der Struktur des Glycosphingolipids bei *A. niger* beschrieb (Brennan und Roe, 1975). Hierzu wurde eine metabolische Markierung der *T. rubrum*-Glykolipide *in vitro* mit UDP-[³H]Galaktose durchgeführt, die Glykolipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Das Glykolipidspektrum zeigt vier Glykolipide, wovon drei mit den *T. rubrum*-Glykolipiden I, II und III der mit GDP-[³H]Mannose und UDP-[³H]N-acetyl Glucosamin markierten Glykolipide comigrieren. Daraus lässt sich vermuten, dass es sich hierbei um GPIs handelt. Um die Vermutung zu bestätigen, wurden GPI-sensitive Spaltungen mit PI-PLC, GPI-PLD und HNO₂ durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen, dass alle mit Galaktose markierten Glykolipide spaltbar sind und es sich damit um GPIs handelt. Anschliessend wurde eine Spaltung mit wässriger Flusssäure durchgeführt. Da durch diese Behandlung der Galaktoserest vom Glykan abgespalten wird, ist es denkbar, dass die Galaktose indirekt, zum Beispiel über eine Diesterbindung, an dem Core-Glykan gebunden ist. Möglich ist aber auch der Einbau einer Galaktofuranose, wie man sie am Beispiel von Lipopeptidophosphoglykanen bei *Leishmania*-Spezies vorfindet (de Lederkremer und Colli, 1995) oder bei einem Glykolipid bei *Paracoccidioides brasiliensis* (Levery *et al.*, 1996). Hier wurde eine endständige Galaktofuranose beobachtet, welche mit grosser Wahrscheinlichkeit eine immundominante Rolle bei der Pathogenität spielt. Es bedarf deshalb noch weiterer Untersuchungen, um die genaue Position, Struktur und Funktion der Galaktose bei *T. rubrum* zu ermitteln.

Vergleiche mit dem bei *Aspergillus niger* beschriebenen wasserlöslichen phosphorylierten Glycosphingolipid (Brennan und Roe, 1975) zeigen, dass *T. rubrum*-Glykolipide ebenso Glukosamin, Mannose und Galaktose in die Struktur einbauen, die Fettsäuren jedoch auf unterschiedlichen Weisen am hydrophilen Teil gebunden sind. Bei *A. niger* erfolgt die Bindung über ein Ceramid, wohingegen bei *T. rubrum* die Fettsäuren über ein Glycerol am nicht-acylierten Inositol gebunden sind. Aus den nun vorliegenden Untersuchungsergebnissen lässt sich ein vorläufiges Model der Struktur der GPIs bei *T. rubrum* erstellen. Diese könnten wie in Abbildung 5.2 gezeigt aussehen.

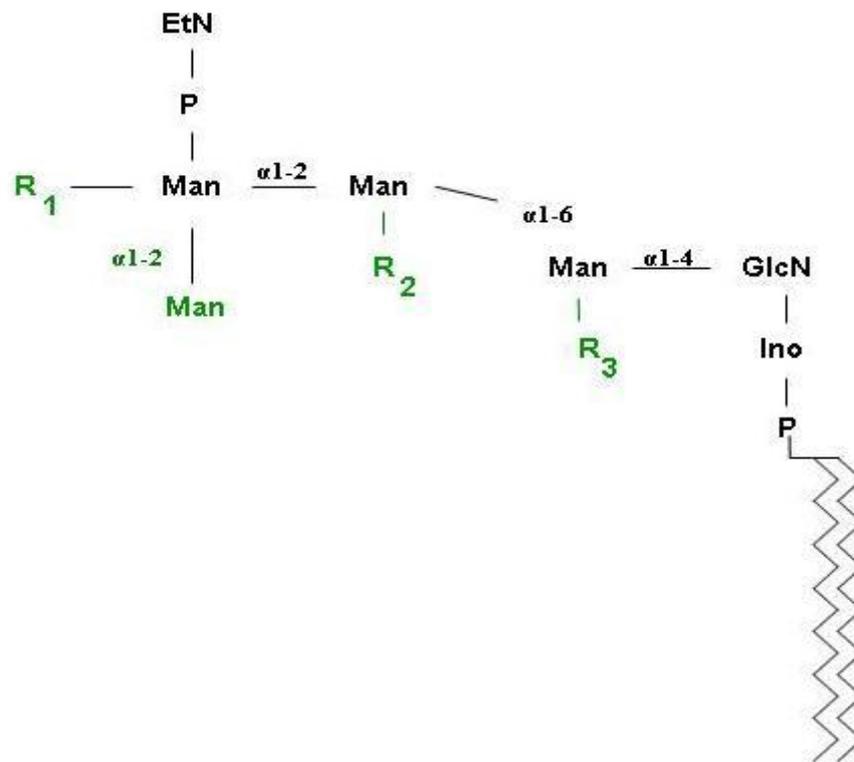


Abb. 5.2 Vorläufiges Strukturmodell der Glykosylphosphatidylinositole bei *T. rubrum*

Darstellung des möglichen Strukturmodells der *T. rubrum*-GPIs. Eine vierte Mannose könnte dabei eine Modifikationen darstellen. Der Einbau von Galaktose stellt ebenfalls eine Erweiterung dar. Die genaue Position muss dabei jedoch noch näher untersucht werden.

R₁₋₃: mögliche Bindung von Galaktose evtl. auch in Form von Galaktofuranose oder Galaktopyranose

Ausblick

Unter Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse ergibt sich als erstes die Frage, wie die einzelnen GPI-Biosyntheseschritte blockiert werden könnten. Hierzu gibt es Untersuchungen, welche zeigen, dass ein Metabolit der Pilze (YW 3548), ein Terpinoid-Lakton, in der Lage ist, die Biosynthese der GPIs in Hefen und Säugetierzellen zu hemmen, indem es die Übertragung der dritten Mannose auf das Core-Glykan blockt. Gleichfalls wird der Einbau von [³H]myo-inositol in die zu verankerten Proteine gehemmt und verhindert ebenfalls den Transport der GPI-gebundenen Proteine zum Golgi-Apparat. Die Untersuchungen ergaben jedoch, dass YW 3548 keinen, beziehungsweise nur einen geringen Einfluss auf die GPI-Biosynthese bei Protozoen hat (Sutterlin *et al.*, 1997). Auch synthetische GPI Analoga, welche am Inositolring durch

Hydroxylgruppen modifiziert sind, sind in der Lage im zellfreien System die GPI Biosynthese bei *Trypanosoma brucei* und *Leishmania mexicana* zu inhibieren. Dabei konnte jedoch kein Effekt in den HeLa-Zellen festgestellt werden (Smith *et al.*, 1997, 1999, 2001). Die vorliegenden Erkenntnisse können hilfreich in der Untersuchung der einzelnen Abläufe der GPI Synthese und der Verankerung der GPI-gebundenen Proteine eingesetzt werden. Erwähnt sei an dieser Stelle 2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose, ein Inhibitor der Dolichol-*P*-Mannose-Synthese. Dabei wird die Mannosylierung der GPI Zwischenprodukte gehemmt (Takami *et al.*, 1992). GTP-Gamma-S (Guanosin-5-O-[Thiotriphosphat]) hemmt ebenfalls die Mannosylierung, indem die Synthese der Dolichol-Phosphat-Mannose inhibiert wird. Die Dol-P-Mannose dient als Überträger der Mannose auf den GPI-Vorläufer (Azzouz *et al.*, 2001). Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), ein Serin-Protease-Inhibitor, verhindert durch die spezifische Hemmung des Acylierungsprozesses des Inositols in *Trypanosoma brucei* die Umwandlung des Glykolipidvorläufers A in das Vorläuferglykolipid C wodurch die Voraussetzung für das Übertragen von Ethanolaminphosphat nicht mehr gegeben ist (Güther *et al.*, 1994, Güther und Ferguson, 1995). In Säugetierzellen wurde dieser Effekt nicht nachgewiesen (Güther *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse lassen somit auch den Schluss zu, dass der Biosyntheseweg der GPIs in den einzelnen Organismen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies aufweist, sodass dies als ein neuer Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Therapiestrategien gesehen werden kann. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen diese Inhibitoren auch auf die Biosynthese von *T. rubrum*-GPIs haben könnten. Daraus könnten sich auch hier erste Ansatzpunkte für die Entwicklung weiterer effektiver Therapeutika ergeben.

Ein weiterer interessanter Punkt wäre, Untersuchungen zu verschiedenen Katalysatoren und Überträgerstoffen, wie zum Beispiel zur Galaktosyltransferase, durchzuführen. Diese Enzymgruppe ist in der Lage, unterschiedliche Übertragungswege von Galaktose zu katalysieren. So wurde zum Beispiel bei dem VSG, einem GPI-verankerten Oberflächenprotein bei *T. brucei*, eine α 1,3-Galaktosyltransferase beschrieben, welche die Übertragung von einer α -Galaktose-Seitenkette auf das Core-Glykan katalysiert. Dabei erfolgt die Bindung über Gal α 1-3Mannose (Pingel *et al.*, 1995). Auch bei *T. rubrum* kann die Existenz einer spezifischen Galaktosyltransferase angenommen werden, welche die Übertragung von Galaktose katalysiert. Deren Clonierung, Expression und Reinigung könnte zur Durchführung von *in vitro* Enzym-Assays sowie zu Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren herangezogen werden. Dies könnte

Aufschluss über deren Funktion in der GPI-Biosynthese bei *T. rubrum* geben und wäre damit gegebenenfalls ein weiterer Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika. Auch Untersuchungen bei *Saccharomyces cerevisiae* zeigten die Beteiligung verschiedener Enzyme an der GPI Biosynthese. So zum Beispiel von Gpi13p, einer Phosphoryltransferase, welche die Übertragung des Phosphoethanolamins auf die dritte Mannose des Core-Glykans vermittelt und damit die Voraussetzung für die Proteinbindung schafft (Taron *et al.*, 2000). Flury *et al.* zeigten, dass bei Mutationen im MCD4 Gen, sowie im GPI7 Gen die Übertragung der Proteine an den GPI-Anker gestört wird und damit ein Ungleichgewicht der an GPI gebundenen Proteine in der Membran vorliegt was eine Membranstabilität zur Folge hat. Wie bereits erwähnt, sind Glykosylphosphatidylinositole unter anderem für eine Vielzahl von Proteinverankerungen in der Zellmembran bei höheren und niederen Organismen verantwortlich. So zum Beispiel bei *A. fumigatus*, wo man neun GPI-verankerte Proteine identifizierte, wobei fünf mit denen bei Hefen übereinstimmen (Csa1p, Crh1p, Crh2p, Ecm33p und Gas1p). Die genaue Funktion dieser ist bisher noch nicht bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese eine wesentliche Rolle bei der Morphogenese und des Wachstums bei Pilzen spielen (Bruneau *et al.*, 2001). Auch für das Wachstum bei Parasiten und Hefen ist die GPI Biosynthese essentiell, wie auch die Beteiligung der GPIs an der Proteinmodifikation (Ferguson, 1999; Leidich *et al.*, 1994; Stevens, 1995). Daraus ergeben sich interessante Fragen nach GPI gebundenen Proteinen bei *T. rubrum*, sowie deren Funktionen. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass neben einer Vielzahl an Oberflächenproteinen auch Oligo- und Polysaccharide bei Protozoen, Pflanzen und Säugetieren über GPIs verankert werden. Costachel *et al.* zeigten erstmalig bei *Aspergillus fumigatus*, dass auch Polysaccharide via GPIs verankert werden. Galaktomannan ist ein Polysaccharid, welches über das β 1-3 Glykan kovalent in der Membran verankert ist, und somit an der Organisation der Membranstruktur beteiligt ist (Fontaine *et al.*, 2000). Unter zu Hilfenahme von monoklonalen Antikörpern gegen einzelne Strukturbestandteile dieses Galaktoamannans können unter anderem diagnostische Aussagen über das Vorliegen einer Aspergillose getroffen werden (Stynen *et al.*, 1995). Auch bei *T. rubrum* wurde Galaktomannan als eines der Membranbausteine beschrieben (Ikuta *et al.*, 1997). Interessant zu erfahren wäre, ob auch hier eine Verankerung über GPIs vorliegt und ob über eine selektive Hemmung der GPIs die Membranstruktur so verändert werden kann,

dass ein Überleben von *T. rubrum* im menschlichen Wirt unmöglich gemacht werden kann.

Es sind noch eine Vielzahl an Untersuchungen notwendig um die Struktur, Biosynthese und genaue Funktion der GPIs bei *Trichophyton rubrum* zu analysieren und zu verstehen.

Mit den hier vorgelegten Untersuchungen konnten jedoch erstmals die Grundzüge der Struktur der *Trichophyton rubrum*-GPIs geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

Ajello, L. (1962) Present day concepts in the dermatophytes. *Mycopathol Mycol Appl*, **17**, 315-24.

Ajello, L. und Georg, L.K. (1957) In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol Mycol Appl*, **8**, 3-17.

Al-Hasan, M., Fitzgerald, S.M., Saoudian, M. und Krishnaswamy, G. (2004) Dermatology for the practicing allergist: Tinea pedis and its complications. *Clin and Molecular Allergy*, **2**, 1186/1476-7961-2-5.

Apodaca, G. und McKerrow, J.H. (1989) Purification and characterization of a 27.000-M, extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Infect Immun*, **57**, 3072-80.

Auger, P., Marquis, G., Joly, J. und Attye, A. (1993) Epidemiology of tinea pedis in marathon runners: prevalence of occult athlete`s foot. *Mycosis*, **36**, 35-41.

Azzouz, N., Gerold, P., Kedees, M.H., Shams-Eldin, H., Werner, R., Capdeville, Y. und Schwarz, R.T. (2001) Regulation of *Paramecium primaurelia* glycosylphosphatidyl-inositol biosynthesis via dolichol phosphate mannose synthesis. *Biochemie*, **83**, 801-9.

Azzouz, N., Striepen, B., Gerold, P., Capdeville, Y. und Schwarz, R.T. (1995) Glycosylinositol-phosphoceramide in the free-living protozoan *Paramecium primaurelia*: modification of core glycans by mynnosyl phosphate. *EMBO*, **14**, 4422-33.

Balfour, J.A. und Faulds, D. (1992) Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycosis. *Drugs*, **43**, 259-84.

Bangs, J.D., Doering, T.L., Englund, P.T. und Hart, G.W. (1988) Biosynthesis of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*: processing of the glycolipid membrane anchor and N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem*, **263**, 17697-705.

Bastert, J., Schaller, M., Korting, H.C. und Evans, E.G.V. (2001) Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *J Antimicrobial Agents*, **17**, 81-91.

Bernard, M. und Latge, J.P. (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and

biosynthesis. *Med Mycol*, **39**, 9-17.

Blake, J.S., Cabrera, M.R., Dahl, M.V., Herron, M.J. und Nelson, R.D. (1991) Comparison of the immunoinhibitory properties of cell wall mannan glycoproteins from *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis*. *J Invest Dermatol*, **96**, 601.

Blake, J.S., Dahl, M.V., Herron, M.J. und Nelson, R.D. (1991) An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol*, **96**, 657-661.

Brennan, P.J und Roe, J. (1975) The occurrence of a phosphorylated glycosphingolipid in *Aspergillus niger*. *Biochem J*, **147**, 179-80.

Bruneau, J.M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M.C. und Latge, J.P. (2001) Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to wall biosynthesis. *Electrophoresis*, **22**, 2812-23.

Cabrera, R.M., Blake, J.S., Dahl, M.V., Herron, M.J. und Nelson, R.D. (1991) Inhibition of keratinocyte proliferation by a mannan glycoprotein isolated from *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol*, **96**, 616.

Calderon, R.A. (1989) Immunoregulation of dermatophytosis. *Crit Rev Microbiol*, **16**, 338-368.

Cardoso de Almeida, M.L. und Turner, M.J. (1983) The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **302**, 349-52.

Castellani, A. (1910) Observation on a new species found in tinea cruris. *Br J Dermatol*, **5**, 148-50.

Clark, I.A. und Chandhry, G. (1988) Tumor necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Brit J of Haematology*, **70**, 99-103.

Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C. und Bron, C. (1988) A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *Embo J*, **7**, 2233-40.

Costachel, C., Coddeville, B., Latge, J.P. und Fontaine T. (2005) Glycosylphosphatidylinositol-anchored fungal polysaccharide in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*, **280**, 39835-842.

Dahl, M.V. (1993) Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J Am Acad Dermatol*, **28**, 19-23.

Dahl, M.V. (1994) Dermatophytosis and the immune response. *J Am Acad Dermatol*,

31, 34-41

Darai, G., Handermann, M., Hinz, E. und Sonntag, H.G. (1998) Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Springer, 692.

Davitz, M.A., Hereld, D., Shak, S., Krakow, J., Englund, P.T. und Nussenzweig, V. (1987) Glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase D in human serum. *Science*, **238**, 81-84

de Lederkremer, R.M. und Colli, W. (1995) Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids. *Glycobiology*, **5**, 547-52.

Debierre-Grockiego, F., Azzouz, N., Schmidt, J., Dubremetz, J.F., Geyer, H., Geyer, R., Weingart, R., Schmidt, R.R. und Schwarz, R.T. (2003) Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor- α production in macrophages. *J Biol Chem*, **278**, 32987-993.

Dei Cas, E. und Vernes, A. (1986) Parasitic adaption of pathogenic fungi to mammalian hosts. *Crit Rev Microbiol*, **13**, 173-218.

Detandt, M. und Norland, N. (1988) Dermatophytes and swimming pools. Seasonal fluctuations. *Mycoses*, **31**, 495-500.

Diaz Sanchez, C. und Lopez Vina, A. (2004) Pulmonary Aspergillosis. *Arch Bronconeumol*, **40**, 114-22.

Doering, T.L., Masterson, W.J., Englund, P.T. und Hart, G.W. (1989) Biosynthetics of the glycosyl phosphatidylinositol membran anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J Biol Chem*, **264**, 11168-73.

Douglas, C.M. (2001) Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol*, **39**, 55-66.

Eckert, V., Gerold, P. und Schwarz, R.T. (1997) GPI anchor: structure and function. In Gabius, H.J. und Gabius, S. (Hrsg.), *Glycosciences: Status and Perspectives*. Chapman & Hall, Weinheim, pp. 223-243.

Elbein, A.D. (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Ann Rev Biochemistry*, **56**, 497-534.

Elewski, B.E. und Schwartz, H.J. (1999) Asthma induced by allergy to *Trichophyton rubrum*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **12**, 250-53.

Emmons, C.W. (1934) Dermatophytes: natural groupings based on the form of the spores and accessory organs. *Arch Dermatol Syphilol*, **30**, 337-62.

English, M.P. (1980) Ecological aspects of dermatophytes regarded essentially as anthropophilic. *Mcd Mycol*, **8**, 53-59.

- Englund**, P.T (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem*, **62**, 121-38.
- Ferguson**, M.A. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contribution of trypanosome research. *J Cell Sci*, **112**, 2799-809.
- Ferguson**, M.A., Haldar, K. und Cross, G.A. (1985) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membran anchor at ist COOH terminus. *J Biol Chem*, **260**, 4963-8.
- Ferguson**, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A. und Rademacher, T.W. (1988) Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, **239**, 753-9.
- Field**, M.C. und Menon, A.K. (1992) Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. In Hooper, N.M. und Turner, A.J. (eds), *Lipid modification of proteins*. Oxford University Press, Oxford, pp. 155-90.
- Field**, M.C. und Menon, A.K. (1993) Glycolipid anchoring of cell surface proteins. In Schlesinger, M.J. (ed.) *Lipid Modifications of Proteins*. CRS Press, Boca Raton, pp. 84-114.
- Fitzpatrick**, T.B., Johnson, R.A., Wolff, K. und Suurmond, D. (2001) Fungal infection of the skin and hair. In Cooke, D., Englis, M.R. und Morriss, J.M. (eds.), *Color atlas and synopsis of clinical dermatology common and serious diseases 4 edition*. McGraw Hill Medical Publishing Division, 684-707.
- Flury**, I., Benachour, A. und Conzelmann, A. (2000) YLL031c belongs to a novel family of membrane proteins involved in the transfer of ethanolaminephosphate into the core structure of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J Biol Chem*, **275**, 24458-65.
- Fontaine**, T., Magnin, T., Melhert, A., Lamont, D., Latge, J.P. und Ferguson M.A. (2003) Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins. *Glycobiology*, **13**, 169-177.
- Fontaine**, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M. und Latge, J.P. (2000) Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol. Chem*, **275**, 27594-607.
- Fontaine**, T., Smith, T.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S., Latge, J.P. und Ferguson, M.A. (2004) *In vitro* biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol in *Aspergillus fumigatus*. *Biochem*, **43**, 15267-75.

- Gaughran**, J.P., Lai, M.H., Kirsch, D.R. und Silverman, S.J. (1994) Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol*, **176**, 5857-60.
- Georg**, L.K. (1960) Epidemiology of the dermatophytoses: sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann N Y Acad Sci*, **89**, 69-77.
- Gerold**, P., Schuppert-Dieckmann, A. und Schwarz, R.T. (1994) Glycosylphosphatidyl-inositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem*, **269**, 2597-2606.
- Gerold**, P., Schoefield, L., Blackman, M.J., Holder, A.A. und Schwarz, R.T. (1996a) Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **75**, 131-43.
- Gerold**, P., Striepen, B., Reitter, B., Geyer, H., Geyer, R., Reinwald, E., Risse, H.J. und Schwarz, R.T. (1996b) Glycosyl-phosphatidylinositols of *Trypanosoma congolense*: Two common precursors but a new protein-anchor. *J Mol Biol*, **261**, 181-94.
- Grando**, S.A., Hostager, B.S., Herron, M.J., Dahl, M.V. und Nelson, R.D. (1992a) Binding of *Trichophyton rubrum* mannan to human monocytes *in vitro*. *J Invest Dermatol*, **98**, 876-80.
- Grando**, S.A., Herron, M.J., Dahl, M.V. und Nelson, R.D. (1992b) Binding and uptake of *Trichophyton rubrum* mannan by human epidermal keratinocytes: a timecourse study. *Acta Derm Venerol*, **72**, 273-76.
- Grant**, S.M. und Clissold, S.P. (1990) Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs*, **39**, 877-916.
- Grappel**, S.F. und Blank, F. (1972) Role of keratinases in dermatophytosis. I. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. *Dermatologica*, **145**, 245-55.
- Güther**, M.L.S. und Ferguson, M.A. (1995) The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *Embo*, **14**, 3080-3093.
- Güther**, M.L.S., Masterson, W.J. und Ferguson, M.A. (1994) The effect of phenylmethylsulfonyl fluoride on inositol-acylation and fatty acid remodeling in

African trypanosomes. *J Biol Chem*, **269**, 18694-701.

Hainer B.L. (2003) Dermatophyte infections. *Am Fam Physicans*, **67**, 101-8.

Hardy, M.R. und Townsend, R.R. (1988) Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 3289-93.

Hartland, R.P., Fontaine, T., Debeaupuis, J.P., Simenel, C., Delepierre, M. und Latge, J.P. (1996) A novel β -(1-3)-glycanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*, **271**, 26843-9.

Hay, R.J. (1982) Chronic dermatophyte infections. I. Clinical and mycological features. *Br J Dermatol*, **106**, 1-7.

Hirschmann, J.V. und Raugi, G.J. (2000) Pustular tinea pedis. *J Am Acad. Dermatol*, **42**, 132-33.

Holder, A.A. und Cross, G.A. (1981) Glycopeptides from variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. C-terminal location of antigenically cross-reacting carbohydrate moieties. *Mol Biochem Parasitol*, **2**, 135-50.

Hooke, R. (1665) Micrographia: Some physiological description of minute bodies made by magnifying glasses. Martyn J. und Allestry J. (eds), London.

Horner, W.E. Helbling, A. Salvaggio, J.E. und Lehrer, S.B. (1995) Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev*, **8**, 161-79.

Hurlimann, A. und Fah, J. (2001) Asthma, rhinitis and dermatitis triggered by fungal infection: therapeutic effects of terbinafine. *Dermatology*, **202**, 330-32.

Ikuta, K., Shibata, N., Blake, J.S., Dahl, M.V., Nelson, R.D., Hisamichi, K., Kobayashi, H., Suzuki, S. und Okawa, Y. (1997) NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem J*, **323**, 297-305.

Jones, H.E. (1986) Cell mediated immunity in the immunopathogenesis of dermatophytosis. *Acta dermato Venereol Suppl*, **121**, 73-83.

Jones, H.E. (1993) Immune response and host resistance to human dermatophyte infection. *J Am Acad Dermatol*, **28**, 12-18.

Jones, H.E., Reinhardt, J.H. und Rinaldi, M.G. (1973) A clinical, mycological and immunological survey for dermatophytosis. *Arch Dermatol*, **108**, 61-65.

Kanda, N., Tani, K., Enomoto, U., Nakai, K. und Watanabe, S. (2002) The skin fungus-induced Th1-and Th2-related cytokine, chemokine and prostaglandin E2 production in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis

and psoriasis vulgaris. *Clin Exp Allergy*, **32**, 1243-50.

Kane, J. und Fischer, J.B. (1975) The effect of sodium chloride on the growth and morphology of dermatophytes and some other keratolytic fungi. *Can J Microbiol*, **21**, 742-49.

Kane, J., Sigler, L. und Summerbell, R.C. (1987) Improved procedures for differentiating *Microsporum persicolor* from *Trichophyton mentagrophytes*. *J Clin Microbiol*, **25**, 2449-52.

Kapteyn, J.C., Van den Ende, H. und Klis, F.M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochem Biophys Acta*, **1426**, 373-83.

Kern, P., Hemmer, C.J. Van Damme, J. Gruss, H.-J. und Dietrich, M. (1989) Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J of Med*, **87**, 139-143.

King, R.D., Khan, H.A., Foye, J.C., Greenberg, J.H. und Jones, H.E. (1975) Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. *J Clin Med*, **86**, 204-12.

Krakow, J.L., Hereld, D., Bangs, J.D., Hart, G.W. und Englund, P.T. (1986) Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem*, **261**, 12147-53.

Lartay, P.A. und Moehle, C.M. (1997) Recent advances in antifungal agents. In Annual Reports in Medicinal Chemistry, Plattner, J.J. (eds.), Academic Press, pp. 151-160.

Leidich, S.D., Drapp, D.A. und Orlean, P. (1994) A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem*, **269**, 10193-6

Leverly, S.B., Toledo, M.S., Suzuki, E., Salyan, M.E., Hakomori, S., Strauss, A.H. und Takahashi, H.K. (1996) Structural characterization of a new galactofuranose-containing glycolipid antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **222**, 639-45.

Leyden, J.J. und Kligman A.M. (1977) Interdigital athlete`s foot: new concepts in pathogenesis. *Postgrad Med*, **61**, 113-116.

Link, J.H.F. (1809) Nachträge zu den Grundlehren der Anatomie und Physiologie der Pflanzen.

Lisanti, M.P., Caras, I.W., Gilbert, T., Hanzel, D. und Rodriguez-Boulan, E. (1990)

Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid-anchored fusion protein in transfected MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 7419-23.

Low, M.G. (1990) Degradation of glycosyl-phosphatidylinositol anchors by specific phospholipase. In Turner, A.J. (ed.) *Molecular and cell biology of membrane proteins-glycolipid anchors of cell-surface proteins*. Ellis Horwood Ltd., London, pp. 35-63

Low, M.G. und Finean, J.B. (1977) Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem J*, **167**, 281-4.

Majstorovic, R. (1996) Therapie von Hautkrankheiten. *Pharma-Kritik*, **17**.

Masterson, W.J., Doering, T.L., Hart, G.W. und Englund, P.T. (1989) A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell*, **56**, 793-800.

Mayor, S., Menon, A.K. und Cross, G.A. (1990a) Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. II. Lipid structures of phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J Biol Chem*, **265**, 6174-81.

Mayor, S., Menon, A.K. und Cross, G.A., Ferguson, M.A., Dwek, R.A. und Rademacher, T.W. (1990b) Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. I. Can structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J Biol Chem*, **265**, 6164-73

Mayr, A. (1989) Infections with humans in the household transmit to dogs and cats. *Zentralbl. Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser B*, **187**, 508-26.

Mazhari-Tabrizi, R., Eckert, V., Blank, M., Müller, R., Mumberg, D., Funk, M. und Schwarz, R.T. (1996) Cloning and functional expression of glycosyltransferases from parasitic protozoans by heterologous complementation in yeast: the dolichol phosphate mannose synthase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem J*, **16**, 853-58.

McConville, M.J. (1996) In Smith, D.F. and Parsons, M. (eds.), *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*, Oxford University Press, Oxford UK, pp. 205-28.

McConville, M.J. und Ferguson, M.A. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*, **294**, 305-24.

McDowell, W. und Schwarz, R.T. (1988) Lipid-mediated protein glycosylation: assembly of lipid linked oligosaccharides and post-translational oligosaccharide

trimming. In Brodbeck, U. and Bordier, C. (eds), *Post-translational modification of proteins by lipids*. C. Springer, Berlin, pp. 99-118.

Menon, A.K. und Vidugiriene, J. (1994) Topology of GPI biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Braz J Med Biol Res*, **27**, 167-75.

Menon, A.K., Eppinger, M., Mayor, S. und Schwarz, R.T. (1993) Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosylphosphatidylinositols. *Embo J*, **12**, 1907-14

Menon, A.K., Mayer, S. und Schwarz, R.T. (1990a) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: involvement of mannosylphosphoryldolichol as the mannose donor. *Embo J*, **9**, 4249-58.

Menon, A.K., Schwarz, R.T., Mayor, S. und Cross, G.A. (1990b) Cell-free synthesis of glycosyl-phosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. Structural characterization of putative biosynthetic intermediates. *J Biol Chem*, **265**, 9033-42.

Miescher, G. (1928) Trichophytien und Epidermophytien. In: Jadassohn J. (ed). *Handbuch der Haut-und Geschlechtskrankheiten*. Band XI, pp. 378-564.

Moossavi, M., Bagheri, B. und Scher, R.K. (2001) Systemic antifungal therapy. *Dermatol Clin*, **19**, 35-52.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. und Latge, J.P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem*, **275**, 14882-9.

Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B. und Latge, J.P. (2000) Identification of the catalytic residue of the first family of beta(1-3)glucanoyltransferases identified in fungi. *Biochem J*, **347**, 741-7.

Muhlschlegel, F.A. und Fonzi, W.A. (1997) PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol*, **17**, 5960-67.

Niewerth, M. und Korting, H.C. (2000) The use of systemic antimycotics in dermatotherapy. *E J of Derm*, **10**, 155-60.

Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A. und Riezman, H. (1991) Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol*, **11**, 27-37.

Pingel, S., Field, R.A., Güther, L.S., Duszenko, M. und Ferguson, M.A.J. (1995) The

hydrophobic mannoside $\text{Man}\alpha 1\text{-6Man}\alpha 1\text{-S-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH}_3$ acts as an acceptor for the UDP-Gal: glycosylphosphatidylinositol anchor $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J*, **309**, 877-882.

Popolo, L. und Alberghina, L. (1984) Identification of a labile protein involved in the G1-to-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 120-4.

Popolo, L. und Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochem Biophys Acta*, **1426**, 385-400.

Popolo, L., Vai, M. und Alberghina, L. (1986) Identification of a glycoprotein involved in cell cycle progression in yeast. *J Biol Chem*, **261**, 3479-82.

Rebell, G. und Taplin, D. (1970) Dermatophytes, their recognition and identification. Univ of Miami Press, Coral Gables, Fla.

Rinaldi, M.G. (2000) Dermatophytosis: epidemiological and microbiological update. *J Am Acad Dermatol*, **43**, 120-24.

Rippon, J.W. (1988) The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In Saunders, W.B. (ed), *Medical mycology*, Philadelphia.

Roberts, W.L., Myher, J.J., Kuksis, A., Low, M.G. und Rosenberry, T.L. (1988) Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem*, **263**, 18766-75

Sabouraud, R. (1910) Les teignes. *Masson*, Paris

Saltiel, A.R. (1991) The role of glycosyl-phosphoinositides in hormone action. *J Bioenerg Biomembr*, **23**, 29-41.

Saporito-Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S. und Fonzi, W.A. (1995) PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol*, **15**, 601-13.

Schoenlein, J.L. (1939) Zur Pathogenie der Impetigines. *Arch Anat Physiol Wiss Mcd*, p. **82**

Schofield, L. und Hackett, F. (1993) Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*, **177**, 145-53.

Schofield, L., Gerold, P., Schwarz, R.T. und Tachado, S. (1994) Signal transduction in host cells mediated by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa, or why do the parasitic protozoa have so many GPI molecules? *Braz J Med Biol Res*, **27**, 249-54.

Semel, J.D. und Goldin, H. (1996) Association of athlete's foot with cellulitis of the

lower extremities: diagnostic value of bacterial cultures of ipsilateral interdigital space samples. *Clin Infect Dis*, **23**, 1162-64.

Shetsiruli, L.T. und Apridonidze, K.G. (1977) Ontogenetic changes in the ultrastructure of *Trichophyton rubrum* based on scanning electron microscopy. *Vestn Dermatol Venerol*, **10**, 30-35.

Sinski, J.T. und Flouras, K. (1984) A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1979 to 1981 with chronological listings of worldwide incidence of five dermatophytes often isolated in the United States. *Mycopathologia*, **85**, 97-120.

Smith, K., Skelton, H.G., Yeager, J., Ledsky, R., McCarthy, W., Baxter, D., Turiansky, G.W., Wagner, K.F. und Turianski, G. (1994) Cutaneous findings in HIV-1-positive patients: a 42-month prospective study. Military Medical Consortium for the Advancement of retroviral Research (MMCARR). *J Am Acad Dermatol*, **31**, 746-754.

Smith, T.K., Crossman, A., Borissow, C.N., Paterson, M.J., Dix, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A.J. (2001) Specificity of GlcNAc-PI de-N-acetylase of GPI biosynthesis and synthesis of parasite-specific suicide substrate inhibitors. *Embo J*, **20**, 3322-32.

Smith, T.K., Sharma, D.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A.J. (1999) Selective inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **18**, 5922-30

Smith, T.K., Sharma, D.K., Crossman, A., Dix, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A.J. (1997) Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *Embo J*, **16**, 6667-75.

Stevens, V.L. (1995) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *J Biochem*, **310**, 361-70.

Stockdale, P.M. (1953) Nutritional requirements of dermatophytes. *Biol Rev*, **28**, 84-104.

Striepen, B., Zinecker, C.F., Damm, J.B., Melgers, P.A., Gerwig, G.J., Koolen, M., Vliegthart, J.F., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1997) Molecular structure of the „low molecular weight antigen“ of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1-4 n-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic. *J Mol Biol*, **266**, 797-813.

Stynen, D., Goris, A., Sarfati, J. und Latge, J.P. (1995) A new sensitive sandwich

enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, **33**, 497-500.

Summerbell, R.C., Kane, J. und Kraiden, S. (1989) Onychomycosis, tinea pedis and tinea manuum caused by non-dermatophytic filamentous fungi. *Mycosis*, **32**, 609-19.

Sutterlin, C., Horvath, A., Gerold, P., Schwarz, R.T., Wang, Y., Dreyfuss, M. und Riezman, H. (1997) Identification of a specie-specific inhibitor of glycosylphosphatidylinositol synthesis. *Embo J*, **16**, 6374-83.

Tachado, S.D., Gerold, P., McConville, M.J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R.T. und Schofield, L. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol*, **156**, 1897-1907

Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R.T., Novakovic, S. McConville, M. und Schofield, L. (1997) Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinases C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 4022-7.

Tachado, S.D., Mazhari-Tabrizi, R. und Schofield, L. (1999) Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* *Parasite Immunol*, **21**, 609-17.

Takami, N. Oda, K. und Ikehara, Y. (1992) Aberrant processing of alkaline phosphatase precursor caused by blocking the synthesis of glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem*, **267**, 1042-47.

Taron, C.H., Wiedman, J.M., Grimme, S.J. und Orlean, P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in Gpi11p- and Gpi13p-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate gpi13p in phosphoethanolamine transfer to the third mannose. *Mol Biol Cell*, **11**, 1611-30

Toledo, M.S., Lavery, S.B., Strauss, A.H. und Takahashi, H.K. (2001) Sphingolipids of the mycopathogen *Sporothrix schenckii*: identification of a glycosylinositol phosphorylceramide with novel core GlcNH(2)alpha1-2Ins motif. *FEBS Lett*, **493**, 50-6.

Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1992b) Cell-free synthesis of glycolipid candidate precursor(s) for glycosyl-phosphatidylinositol anchors of

- Toxoplasma gondii* surface proteins. *Biochem Soc Trans*, **20**, 166S.
- Tse**, A.G., Barclay, A.N., Watts, A. und Williams, A.F. (1985) A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes. *Science*, **230**, 1003-8.
- Udenfried**, S. und Kokudula, K. (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem*, **64**, 563-91.
- Vidugiriene**, J. und Menon, A.K. (1993) Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J Cell Biol*, **121**, 987-96.
- Vidugiriene**, J. und Menon, A.K. (1994) The GPI anchor of cell-surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **127**, 333-41
- Weinstein**, A. und Berman, B. (2002) Topical treatment of common superficial tinea infections. *Am Fam Physicans*, **65**, 2095-102.
- Weitzman**, I. und Kane, J. (1991) Dermatophytes and agents of superficial mycoses. In Balows, A., Hausler Jr., P.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. und Shadomy, H.J.(eds.), *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 601-16.
- Weitzman**, I. und Summerbell, R. (1995) The Deramtophytes. *Clin Microbiol Rev*, **8**, 240-59.
- Weitzman**, I., Rosenthal, S.A. und Silva-Hutner, M. (1988) Superficial and cutaneous infections caused by molds: dermatophytoses. In Wentworth, B.B. (ed.), *Diagnostic procedures for mycotic and parasitic infections*. American Public Health Association, Washington D.C., p. 33-97.
- Woodfolk**, J.A. und Platts-Mills, T.A. (1998) The immune response to dermatophytes. *Res Immunol*, **149**, 436-445.
- Woodfolk**, J.A. und Platts-Mills, T.A. (2001) Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reaction: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce th1-and th2-dominated responses. *J Immunol*, **167**, 5412-29.
- Woodfolk**, J.A., Slunt, J.B., Deuell, B., Hayden, M.L. und Platts-Mills, T.A. (1996) Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG 4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J Immunol*, **156**, 1695-1701.

Woodfolk, J.A., Wheatley, L.M., Piyasena, R.V., Benjamin, D.C. und Platts-Mills, T.A. (1998) *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol. Chem.*, **273**, 29489-96.

Yamashita, K., Mizuochi, T. und Kobata, A. (1982) Analysis of oligosaccharides by gel filtration. *Methods Enzymol.*, **83**, 105-26.

7. Abkürzungen

Abb	Abbildung
C/M	Chloroform/Methanol
C/M/W	Chloroform/Methanol/Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
Dol-P-Man	Dolicholphosphat-Mannose
DU	Dionex-Einheiten (Dionex units)
etc	et cetera
EtN	Ethanolamin
EtN-P	Ethanolamin-Phosphat
Gal	Galaktose
GalNAc	N-acetyl-Galaktosamin
Glc	Glukose
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-Glukosamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GPI-PLD	Glykosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D
GU	Glukose-Einheiten (Glucose units)
HF	wässrige Flusssäure
HNO ₂	salpetrige Säure
HPAEC	high pH anion exchange chromatography
Ino	Inositol
LSC	Flüssigkeitsszintillations-Zähler
Man	Mannose
min	Minute
PBS	phosphate buffered saline
PI	Phosphatidylinositol
PI-PLC	Phosphatidyl-spezifische Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
TLCK	Na-Tosyl-L-lysinchloromethylketon-Hydrochlorid
Tab	Tabelle
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Tr _{gl}	<i>Trichophyton rubrum</i> Glykolipide

8. Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg waren folgende Damen und Herren:

Arnold; Aumüller; Basler; Barth; Baum; Bien; Bolm; Cetin; Czubayko; Daut; Feuser; Fruhstorfer; Geuss; Gotzen; Griss; Grzeschik; Happle; Hasilik; Hellinger; Hesse; Hofmann; Kaiser; Kern; Klenk; Kleine; Klose; Koch; Koolman; Kretschmer; Krieg; Kuhn; Lang; Lange; Maisch; Moll; Mossdorf; Mueller; Neubauer; Oertel; Rehder; Renschmidt; Röhm; Rothmund; Schäfer; Schmidt; Schnabel; Schöffler; Seitz; Seyberth; Slenczka; Steininger, Suske; Vohland; Weihe; Werner; Westermann; Wilhelm

8.2 Danksagung

Zum Schluss sei all denen gedankt, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt, gefördert, beraten und begleitet haben. Sie alle haben, jeder auf seine Weise, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen:

Herrn Prof. Dr. R. T. Schwarz als meinen Doktorvater danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgemeinschaft anfertigen zu können, für die Geduld, das Interesse am Verlauf dieser Arbeit sowie seine produktiven und kritischen Ratschläge.

Für die Vergabe des interessanten Themas danke ich Herrn Prof. Dr. Effendy, welcher die Zusammenarbeit zwischen der Dermatologie der Philips-Universität Marburg und der AG Parasitologie, Institut für Virologie, ermöglichte.

Besonders möchte ich Herrn Dr. Nahid Azzouz für die hervorragende Betreuung und wissenschaftliche Begleitung danken. Er hat wesentlich zum Gelingen der Versuche beigetragen.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der AG Parasitologie danken für die freundliche Aufnahme im Institut sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Stets standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite und machten den Laboralltag lebendig.

Danken möchte ich auch meinem Computerspezi Michael Schwarplies, ohne ihn wäre ich wahrscheinlich verzweifelt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne welche dieses Vorhaben erst gar nicht möglich gewesen wäre. Ihr stetes Interesse an meiner Arbeit, ihre psychische Unterstützung und ihr Vertrauen haben mich ermutigt und Kraft gegeben, diese Arbeit auf die Beine zu stellen.

Mein grösster Dank gilt meinem lieben Ehemann Patrick und meinem kleinen Sonnenschein Ruben, welche mich einige Stunden entbehren mussten. Sie wussten mich stets zu motivieren. Danke für die grenzenlose Liebe und Geduld. Euch sei diese Arbeit gewidmet.