Universität Hamburg

Screening einheimischer Pflanzen und Pilze mittels dünnschichtchromatografischer Bioassays und Hochdurchsatz-Screening auf pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Wurzelschwammes Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Universität Hamburg

vorgelegt von
Astrid Sievers
aus Hamburg

Hamburg 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Juli 2003 unter der Leitung von Herrn PD Dr. W. Schultze am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: PD. Dr. W. Schultze
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Heisig

Tage der mündlichen Prüfungen: 11.-13.2.2004

Für meine Eltern

Forschung ist das simple Vergnügen, etwas zu finden, was man früher nicht wusste.

(Carl Friedrich Freiherr von Weizsäcker)

Danksagung

Herrn PD Dr. W. Schultze, meinem Doktorvater, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seiner steten Diskussionsbereitschaft sowie seinen fachlichen und technischen Hilfestellungen.

Herrn Prof. Dr. P. Heisig danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Übernahme des Korreferates sowie die freundliche Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe.

Der Firma EVOTEC OAI Hamburg möchte ich für die Kooperation danken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei der Firma CAMAG für die Bereitstellung der dünnschichtchromatografischen Ausrüstung bedanken.

Ein großes Dankeschön sage ich Herrn Apotheker Lawrence Oshinowo, ohne den ich bis heute keinen unserer PC bedienen könnte, für die gemeinsamen Kellerstunden mit hilfreichen Tipps und Tricks.

Tatjana Claussen und Kai Haacker-McLaughlin möchte ich für Durchführung der vielen, oft mühseligen Laborarbeiten danken.
Rita Richter und Frau Dr. Koch ein Dankeschön für die Hilfestellung bei den DC-Problemen.
Bei Frau Meiners, Herrn Preusse und Herrn Dr. S. Franke aus der Organik bedanke ich mich für die Erstellung der verschiedenen Massenspektren.
Frau Angela Schäffer von der Lebensmittelchemie gilt mein Dank für die Einarbeitung und Hilfe bei den HPLC/MS-Messungen.
Herrn Sinnwell und seinen Mitarbeitern vielen Dank für die Erstellung der zahlreichen NMR-Daten.
Elisabeth Ban ein Dankeschön für Ihren unermüdlichen Einsatz und die Unterstützung.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei all meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren immer wieder daran erinnert haben, dass es außer der Forschung auch noch andere wichtige Dinge im Leben gibt.

Besonders meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit wohl nie etwas geworden wäre und meinem lieben Thomas für seine Geduld mit mir, gilt mein allerherzlichster Dank.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Allgemeines	6
1.2. Pilzinhaltsstoffe	9
1.3. Zielsetzung der Arbeit	12
2 Spezieller Teil	
2.1 Highthroughput-Screening	14
2.2 Strategien zur Objektauswahl	29
2.3 Heterobasidion annosum Systematik, makroskopische und mikroskopische Merkmale	32
2.4 Dünnschichtchromatografie der Pilzextrakte	
2.4.1 Fließmitteloptimierung für Heterobasidion annosum (Extrakt und Wasserdampfdestillat)	38
2.4.2 Instrumentelle Dünnschichtchromatografie	42
2.5 Dünnschichtchromatografische Bioassays	
2.5.1 Einleitung/Allgemeines	51
2.5.2 Biotests der untersuchten Pilz- und Pflanzenextrakte	70
2.5.3 Bioautographie von *Heterobasidion annosum* (Extrakt und Wasserdampfdestillat)	84

Seite

2.6 Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Komponenten 90

2.6.1 Extrakt-Fraktion 1 92

2.6.2 Extrakt-Fraktion 3 100

2.6.3 Extrakt-Fraktion 5 105

2.6.4 Highthroughput-Screening mit der HPLC/EVOscreen-Einheit 128

2.6.5 Untersuchung der wasserdampfflüchtigen Fraktion von *Heterobasidion annosum* 132

3. Ergebnisse und Diskussion 145

4. Zusammenfassung / Summary 161

5. Material und Methoden

5.1 Verwendeten Organismen

5.1.1 Allgemein 166

5.1.2 Herkunft 169

5.1.3 Mikroskopische Bestimmung von *Heterobasidion annosum* 169

5.2 Verarbeitung des Pilzmaterials

5.2.1 Aufarbeitung und Lagerung 170

5.2.2 Extraktionsmethoden 170

5.2.3 Wasserdampfdestillation 171

Seite

5.3 Chromatographische Trennmethoden

5.3.1 Dünnschichtchromatografie (DC)

5.3.1.1 Material 171

5.3.1.2 Fließmittelsysteme 172

5.3.1.3 Instrumentelle Dünnschichtchromatografie 172

5.3.2 Säulenchromatographie (SC) 173

5.3.3 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) 174

5.3.4 Gaschromatographie (GC) 175

5.4 Spektroskopische Methoden

5.4.1 Massenspektrometrie (MS) 176

5.4.1.1 GC/MS-Kopplung 177

5.4.1.2 HPLC/MS-Kopplung 178

5.4.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR) 178

5.4.3 Infrarotspektroskopie (IR) 178

5.5 Bioaktivitätsbestimmungen

5.5.1 Highthroughput-Screening (HTS) 179

5.5.2 Dünnschichtchromatografische Bioassays 180

6. Gefahrstoffanhang 189

7. Literatur 190

Verwendete Abkürzungen

ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
ATP	Adenosintriphophat
ATS	Automatic thin-layer sampler
CATS	CAMAG TLC Auswertesoftware
CoA	Coenzym A
DAD	Dioden-Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatografie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPH	Diphenylpicrylhydrazin
EA	Ethylacetat
E. coli	Escherichia coli
EI	Electronic Impact
ESI	Electrospray-Ionisation
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FID	Free Induction Decay
GC	Gaschromatographie
GMP	Good manufacturing practices
^{1}H-COSY	zweidimensionale homonukleare (H,H)-korrelierte NMR-Spektroskopie
HIR	Humaner Insulinrezeptor
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPTLC	High-Performance-Thinlayer chromatography
HR	High resolution
HTS	Highthroughputscreening
k.A.	nicht getestet
Int.	Intensität

IR	Infrarotspektroskopie
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
MeOH	Methanol
MO	Mikroorganismen
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
PDA	Photodioden-Array Detektor
Rf	Retentionsfaktor
RP	Reversed phase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Retention time
S. aureus	Staphylococcus aureus
SC	Säulenchromatographie
T	Toluol
TIC	Totalionenstrom (total ion count)
TLC	Thin-layer chromatography
µHTS	Ultra- Highthroughputscreening
UV	Ultraviolett
WD	Wasserdampfdestillat

Tabelle 1: verwendete Abkürzungen

1. Einleitung

1.1 Allgemeines[1-4]

Pilze sind eukaryotische (kernhaltige) Organismen, die durch das Fehlen von Plastiden d.h. eine C-heterotrophe Ernährungsweise gekennzeichnet sind. Die einzelnen systematischen Gruppen weisen z.T. sehr heterogene Eigenschaften auf wie z.B. Nahrungsaufnahme durch Absorption oder Phagocytose von amöboid beweglichen, zellwandlosen polyenergiden Systemen (Plasmoiden) bis zu vielzelligen Thalli aus Hyphen mit chitinhaltigen Zellwänden von komplexem Bau.

Entsprechend sind die Pilze als polyphyletische Verwandschaftsgruppe aufzufassen, wobei die systematische Stellung der einzelnen Pilztaxa noch nicht völlig geklärt ist.

Nach einer neueren Auffassung (Agerer [3]) werden die sog. Echten Pilze (= Chitinpilze mit Chitin als Zellwandbaustein) im Reich der Pilze (= Fungi) zusammengefasst, welches dem der Pflanzen und Tiere zur Seite gestellt wird.

Die sog. Unechten Pilze (= Cellulosepilze mit Cellulose-Zellwänden) gehören zum Reich der Pflanzen (Plantae) während Schleimpilze zum Reich der Tiere (Animalia) gezählt werden.

Eine etwas abweichende jedoch prinzipiell ähnliche Auffassung wird in der neuen Auflage des Standard-Lehrbuches der Botanik (Strassburger) vertreten, wo die Pilze im Regnum (= Domäne) der Eucarya eingeordnet sind und in vier Unterreiche (1. Acrasiobionten = zelluläre Schleimpilze; 2. Myxobionta = Schleimpilze; 3. Heterokontobionta [enthält neben Cellulosepilzen autotrophe Algen]; 4. Mycobionta = Chitinpilze) und zwei Anhänge (Fungi imperfecti und Flechten) gegliedert werden.

Auch was die Artenzahl betrifft, gibt es deutlich differierende Meinungen. Es muss mindestens von 100000 Arten ausgegangen werden. Neuere Schätzungen von der Deutschen Gesellschaft für Mykologie belaufen sich auf 1,5 Mio. Arten, d.h. die Anzahl der Pilze würde die Zahl aller anderen Pflanzen (ca. 500000) beträchtlich übertreffen.
Von dieser großen Zahl vermuteter Pilze kennt man bis heute jedoch nur ca. 75000, d.h. die Pilze sind trotz ihrer großen Bedeutung eine noch sehr unerforschte Organismengruppe.

Da Pilze durch das Fehlen von Chlorophyll keine Photosynthese betreiben können, sind sie zur Energiegewinnung auf den Abbau organischen Materials angewiesen.
Dies geschieht entweder saprophytisch durch den Aufschluss abgestorbener Organismen oder Teilen von diesen, durch Parasitismus, wobei gesunde Lebewesen befallen und die benötigten Nährstoffe aus dem lebenden Wirt entnommen werden oder durch Symbiose mit anderen Lebewesen, wie zum Beispiel Algen in Form von Flechten oder mit Bäumen als Mykorrhizapilze. Die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt in gelöster Form aus dem umgebenden Substrat.
Ca. 80% aller Pflanzengattungen leben mit Pilzen in einer Symbiose.
Pilze spielen in der Natur eine wichtige Rolle als Destruenten und Reduzenten.
Pilze gehören vom Bau ihres Vegetationskörpers zu den Thalluspflanzen, es sind alle Übergänge von Einzellern über fädige Strukturen bis zu vielzelligen Thalli von komplexem Bau vertreten.
Echte Gewebe werden nicht ausgebildet, vielmehr werden die Fruchtkörper durch ein Scheingewebe, dem Plektenchym, aus verflochtenen, agglutinierten Hyphen gebildet.

Die Hyphen sind einreihige, oft verzweigte Fäden von 0,5 – 100 µm Durchmesser, die z.B. bei den Asco- und Basidiomyceten durch mit einem zentralen Porus ausgebildete Septen zellartig unterteilt werden.
Sie bilden ein zusammenhängendes Röhrensystem .
Die Gesamtheit der Hyphen bezeichnet man als Mycel (Pilzgeflecht), welches funktional als eine polyenergide Zelle aufgefasst werden kann.
Seine Ausbreitung kann bis zu 300 m und mehr erreichen.
Die Verbreitung der Pilze erfolgt durch Sporen; dies sind Gebilde unterschiedlichen Aussehens und verschiedener Herkunft, die für den Mykologen oft ein wichtiges Merkmal bei der Bestimmung der Pilze darstellen.
Ungefähr 98% aller Pilze gehören zur Abteilung der Eumycota, also der echten Pilze (Chitinpilze), hierzu zählen folgende Klassen: Zygomycetes, Chytridiomycetes, Ascomycetes und Basidiomycetes.
Daneben werden als Anhänge zu den Eumycota die beiden Gruppen der Deuteromycetes (= Fungi imperfecti) und Lichenes (= Flechten) geführt.
Zu den Basidiomyceten gehört auch die Ordnung der Porlinge oder Polyporales, zu der viele wichtige holzzerstörende Pilze zählen, u.a. auch der in dieser Arbeit untersuchte Wurzelschwamm (*Heterobasidion annosum*).

1.2 Pilzinhaltsstoffe[1, 2, 5-10]

Die Vielfältigkeit im Bau und Verhalten der Pilze spiegelt sich auch in den von ihnen gebildeten Inhaltsstoffen wieder.

Als Reservestoffe findet man anstelle von Stärke häufig Glucane, die strukturell dem Glykogen entsprechen, aber auch lösliche Kohlenhydrate wie Trehalose oder Mannitol. Daneben speichern die Pilze sehr oft Lipide oder sie akkumulieren organische Säuren, weshalb man sie für deren technische Gewinnung einsetzten kann (z.B. Cetylzitronensäure aus *Fungus laricis*).

Im Sekundärstoffwechsel der Pilze reichern sich Substanzen des Polyacetatstoffwechsels an, wie Mono- und Sesquiterpene, phenolische Grundkörper vom Chinon-, Anthrachinon- oder Xanthontyp oder Sterole sowie Polysaccharide.

Diese strukturelle Vielfältigkeit macht deutlich, warum Pilze in vielerlei Hinsicht eine bedeutende Rolle in unserem Leben spielen.

Als Speisepilze dienen vor allem Champignon, Pfifferling, Steinpilz u.a., aber auch Vertreter der Baumpilze, denen in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit gewidmet wird, können verzehrt werden (*Laetiporus sulphureus*).

Neben der Verwendung als Lebensmittel nutzten schon die Römer die Giftwirkung der Pilze.

Und bei der 1991 entdeckten Gletschermumie „Ötzi“ fanden sich der zur Blutstillung genutzte Birkenporling (*Piptoporus betulinus*), sowie der Zunderschwamm (*Fomes fomentarius*), der wegen seiner Fähigkeit, lange nachzuglimmen, zum Feuermachen verwendet wurde.

Die heilende Wirkung von Pilzen ist schon mindestens seit dem 5 Jh. v. Chr. bekannt, so wurde der Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) bei

Geschwüren, Tuberkulose oder Epilepsie eingesetzt, aber auch die halluzinogene Wirkung wurde bereits ca. 1000 v. Chr. in Mittelamaerika für rituelle Zwecke ausgenutzt, wie der Fund prähistorischer Pilzsteine vermuten lässt.

In unser heutigen Zeit spielen die Pilze, sei es als Extrakt oder als aus ihnen isoliertes Arzneimittel, besonders in der traditionellen chinesischen Medizin eine ganz besondere Rolle.

Bereits 1951 wurde festgestellt, dass eine Vielzahl von Basidiomyceten antibiotische Aktivität aufweisen und auch zytostatische und immunmodulatorische Eigenschaften kann man bestimmten Pilzen zuschreiben.

Im Einzelnen sind bisher aus Pilzen unterschiedlicher Gattungen Substanzen mit folgenden Aktivitäten hervorgegangen: antibakteriell, antimykotisch, antiviral, cytostatisch, immunstimulatorisch, antiallergisch, antilipämisch, hypotensiv, antidiabetisch und zentral aktiv.

Ein noch heute gebräuchliches Mittel sind die Sklerotien von *Claviceps purpurea*, dem Mutterkornpilz. Die enthaltenen Alkaloide wurden in der Frauenheilkunde zur Weheneinleitung oder als Abortivum, sowie zur Blutstillung nach der Geburt verwendet. In der heutigen Medizin werden die Lysergsäurealkaloide vor allem bei der Therapie der Migräne, aber auch noch zur Blutstillung nach der Geburt, durch die uteruskontrahierende Wirkung, eingesetzt. Allerdings erfolgt ihre Gewinnung mittlerweile durch saprophytische Submerskulturen in Bioreaktoren (Fermenterkulturen).

Weithin bekannt ist natürlich das primär aus *Penicillium notatum* gewonnene Penicillin, ein Antibiotikum, welches durch einen Zufall 1928 von Flemming entdeckt wurde.

In der heutigen Zeit werden die Penicilline zur Therapie von Infektionskrankheiten eingesetzt. Der Bedarf liegt in einer Größenordnung

von ca. 17000 Tonnen pro Jahr, wobei die Ausbeute bei der Gewinnung durch die Fermentierung um ein Vielfaches gesteigert werden konnte.
In der Gegenwart werden jedoch nicht mehr die Pilze als Ganzes, sondern die isolierten, wirksamen Substanzen benutzt.
Hier sei vor allem auf das Immunsuppressivum Cyclosporin A aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* hingewiesen wie auch auf das aus *Lentinula edodes*, dem Shiitake-Pilz, durch Heißwasserextraktion isolierte Lentinan, einem (1,3)-β-D-Glucan. Dieses aktiviert Makrophagen, T-Zellen und natürliche Killerzellen und stärkt damit bei Tumorpatienten die Infektabwehr; ausserdem steigert es den natürlichen Angriff auf die Tumorzellen. In ähnlicher Weise wirkt Schizophyllan, ebenfalls ein (1→3)-β-D-Glucan, aus *Schizophyllum commune*, welches auch antineoplastischer Aktivität zeigt.
Da in dieser Arbeit vor allem Baumpilze besonders untersucht wurden, sei hier noch kurz auf deren derzeitige arzneiliche Verwendung eingegangen.
In China werden Baumpilze der Gattung Ganoderma in unterschiedlichen Formen für eine Vielzahl an Krankheitsbildern eingesetzt und es ist gelungen, diese traditionellen Anwendungen weitestgehend wissenschaftlich zu belegen. So konnte eine tumor- und entzündungshemmende, blutdruck- und blutzuckersenkende Wirkung auf Polysaccharide und Triterpene zurückgeführt werden. Daneben wurde festgestellt, dass Extrakte die Thrombozytenaggregation hemmen und sich positiv auf die Leberfunktionen auswirken.
Auch bei einer Reihe anderer Baumpilze konnte pharmakologische Aktivität festgestellt werden. Hierzu zählen *Trametes versicolor, Albatrellus cristatus, Inonotus obliquus, Inonotus radiatus, Grifola frondosa*.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits in einem generellen Screening Gesamtextrakte aus Vertretern zahlreicher Pflanzen- und Pilzfamilien gegen bestimmte krankheitsrelevante Targets zu testen und zum anderen anhand ausgewählter Pilzextrakte die Leistungsfähigkeit einer innovativen HPLC/Screening-Kopplung bei der direkten, spezifischen Determinierung bioaktiver Komponenten in komplexen Naturstoffextrakten auszuloten.

Mit dieser Thematik war die Arbeit eng in ein BMBF-Leitprojekt mit dem Titel *„Validierte Lead/Target-Systeme – eine horizontal integrierte Verbundstruktur zur automatisierten Pharma-Wirkstofffindung“* eingebunden, in dem zehn Arbeitsgruppen aus Universitäten, Forschungseinrichtungen und Industrie zusammengeschlossen waren.

Bei meinen Untersuchungen sollte primär eine neuentwickelte Variante des Highthroughput-Screenings (HTS) zum Einsatz kommen.

Generell gestattet das HTS in relativer kurzer Messzeit mit extrem wenig Probenmaterial Aussagen über die Wirksamkeit der Untersuchungslösungen im getesteten Assay. Die speziell von der Firma EVOTEC OAI entwickelte Kopplungstechnik des HTS mit der HPLC erlaubt erstmals eine direkte Bioaktivitätsmessung einzelner Peaks direkt aus einem HPLC-Run heraus, wodurch eine aufwändige Vortrennung und Fraktionierung der Extrakte entfällt, d.h. eine Komponente wird gezielt erst dann isoliert, wenn vorher ihre Bioaktivität festgestellt worden ist.

Ferner kann „On-Line“ eine Kopplung mit einer HPLC/MS-Anlage erfolgen, so dass neben Aktivitäts- auch Strukturinformationen von den einzelnen HPLC-Peaks eines Naturstoffgemisches erhalten werden können.

Da das Highthroughput-Screening noch sehr arbeitsintensiv ist, sowohl was die Messtechnik betrifft, als auch die Auswertung der riesigen Datenmengen, sollten zur Präselektionierung der einzubringenden Extrakte möglichst einfache und kostengünstig durchzuführende Bioassays entwickelt werden, mit deren Hilfe schon im Vorfeld Informationen über eine gewisse Bioaktivität von Extrakten bzw. einzelnen Extraktkomponenten erhalten werden.

Die Etablierung dieser dünnschichtchromatografischen Bioassays, sowie die Sammlung von Strukturinformationen der so entdeckten pharmakologisch aktiven Verbindungen soll speziell am Beispiel des Pilzes *Heterobasidion annosum* detailliert untersucht werden.

2. Spezieller Teil

2.1 Highthroughput-Screening[11-18]

Die heutige Wirkstoffsuche ist geprägt durch die Fortschritte auf den Gebieten Genomics und Proteomics, d.h. der Aufklärung der biochemischen, molekularbiologischen und pathobiochemischen Prozesse der fraglichen Krankheitsbilder, wodurch molekulare Zielstrukturen, sog. Targets gezielt entwickelt werden können. Diese Zielstrukturen, beispielsweise klonierte Proteine oder gentechnisch veränderte Zellen, werden nun als Grundlage eines rationalen Screening-Systems benutzt, welches dazu dient, neue Leitstrukturen mit spezifischer pharmakologischer Wirkung, aber möglichst wenig Nebenwirkungen zu finden.

Als Quellen für diese Screeningtechnologie bieten sich Naturstoffe bzw. Naturstoffbibliotheken, chemisch modifizierte Naturstoffe oder kombinatorisch-chemische Produkte an; sogar Peptide oder peptidähnliche Strukturen lassen sich mit diesen Assays detektieren.

Diese Vielfältigkeit fordert einen hohen Automatisierungsgrad, eine große Empfindlichkeit sowie eine große Schnelligkeit, da es zur Zeit ca. 500.000 bekannte Pflanzen mit einer zahllosen Menge möglicher Wirkstoffen gibt.

Nimmt man einmal an, es gäbe pro Organismus nur 100 zu testende Substanzen und es stünden nur 100 Testsysteme zur Verfügung, wären bereits 5 Milliarden Tests für alle bekannten Pflanzen vonnöten. In der Realität liegen die Zahlen weitaus höher.

Nur durch das HTS ist eine solch große Menge zu bewältigen, da schätzungsweise mindestens 3000 Testsysteme nötig sind, um die gängigsten Krankheiten abzudecken.

Eine weitere Notwendigkeit für das Highthroughput-Screening liegt auch in der Gefahr, dass viele Pflanzen vom Aussterben bedroht sind. Hier sei nur an die zahlreichen Arten des tropischen Regenwaldes erinnert. Durch das HTS können viele dieser Pflanzen in kurzer Zeit in den unterschiedlichsten Assays untersucht werden.

Eine ideale Screeningeinheit muss in der Lage sein, sich den vielfältigen Komponenten anzupassen, diese in möglichst kurzer Zeit zu testen und mit möglichst geringer Substanzmenge auszukommen.

Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die Miniaturisierung der Assays.

Die sich aus diesen Vorgaben entwickelte Technologie bezeichnet man als ultra-Hochdurchsatz-Screening (µHTS).

Die von uns genutzte Anlage ist das EVOscreen –System der Firma EVOTEC OAI, das als miniaturisiertes Highthroughput-System mehr als 100.000 Proben pro Tag verarbeiten kann.

Es zeichnet sich aus durch kurze Messzeiten, einheitliche Assays, einer Echtzeit-Aufzeichnung der Daten, Handling der Proben im Nanoliter-Massstab und einen hohen Automatisierungsgrad. Ebenso werden unwirksame „Compounds“ und solche, die hochaktiv sind und damit als Leitstrukturen fungieren können, zu einem sehr frühen Zeitpunkt herausgefiltert.

Möglich wurde die Miniaturisierung vor allem durch den Einsatz eines Nanocarriers als Probenträger. Hierbei handelt es sich um abgewandelte Mikrotiterplatten, die jedoch statt 96 Einzelproben 2080 Proben á 1µl Volumen tragen.

Während in dem 96er Format bei der Untersuchung von Naturstoffextrakten häufig Substanzgemische in einem Well zu finden sind, steigen die Chancen auf der Nanotiterplatte, aufgrund der sehr

geringen Mengen an Extrakt pro Well einzelne Komponenten in diesem zu finden,d.h. es wird nur noch eine Komponente gegen ein Target getestet.
Die Mikrotiterplatten dienen gleichzeitig als Mikroreaktorsystem, da in einem Well Compound und Target miteinander zur Reaktion gebracht werden und alle notwendigen Zusatzstoffe wie z.B. Fluoreszenzmarker ebenfalls in das Well mit eingebracht werden können.
Damit wird eine Homogenität der Assays gewährleistet, da kein Lösen, Konzentrieren oder Trennen der Bestandteile notwendig sind.
Das Prinzip der Messtechnik des EVOscreen-Systems beruht auf der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS).
Hierbei wird ein konfokaler Laserstrahl in die Probe eingestrahlt, der ein Messvolumen von der Größe eine Bakterienzelle (10^{-15} l) ausleuchtet. Die zu untersuchenden Substanzen werden vor der Messung mit einem Fluoreszenzfarbstoff behaftet, der bei Durchtritt durch den Laserstrahl angeregt wird und Fluoreszenzlichtblitze abgibt.
Aufgrund von Diffusion bewegen sich die kleinen Compoundmoleküle sehr schnell durch den Messbereich. Interagieren diese kleinen Teilchen mit den wesentlich größeren Targetmolekülen, wird die Diffusionsbewegung stark gebremst. Dadurch verlängert sich die Dauer des ausgesendeten Fluoreszenzlichtes, da das Molekül länger im Laserstrahlfokus verweilt (Abbildung 1).

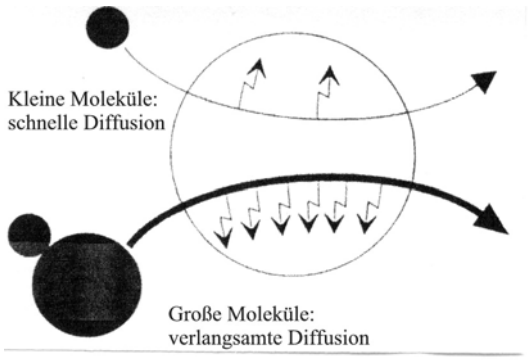


Abb. 1 Die obere Hälfte der Grafik stellt schematisch dar, wie schnell die kleinen Compoundmoleküle durch den Laserstrahlfokus (Kreis) diffundieren; in der unteren Hälfte hat das Compoundmolekül mit einem wesentlich größeren Targetmolekül reagiert, wodurch die Diffusionsbewegung durch den Fokus verlangsamt und die Verweildauer erhöht ist.

Durch Bindungen der fluoreszenzmarkierten Targetmoleküle mit den Compoundmolekülen kann es zusätzlich zu einer Verschiebung der Wellenlänge kommen. Über einen Computer werden die ausgesendeten Photonenschauer kontinuierlich aufgezeichnet. In Echtzeit werden daraus biophysikalische Daten wie z.B. Bindungskonstanten ermittelt. Aus diesen Daten kann man bereits zu diesem Zeitpunkt die Qualität und Eignung des Compoundmoleküls als potentiellen Wirkstoff ermitteln.

Eine weitere Verbesserung der FCS-Technik ist die sog. FCS^{+}-Technik, die in der Lage ist die molekulare Helligkeit der Fluoreszenz zu messen.

Mit Hilfe dieser Detektion ist es möglich praktisch alle löslichen und zellulären Assays zu detektieren, wobei der In-vivo-Status der Testsysteme sehr gut simuliert wird.

Im Folgenden wird noch einmal der Aufbau und Ablauf des Screenings dargestellt (Abbildung 2).

Die Aufbewahrung und Lagerung der Compounds bzw. von Testgemischen, Naturstoffextrakten u.ä. erfolgt in herkömmlichen 96er-well-Platten, die in Kühlschränken oder Tiefkühltruhen gelagert werden.
Nach dem Auftauen der Compounds in ihren Mikrotiterplatten werden diese in eine robotergeführte, computergesteuerte Pipettieranlage eingebracht. Hier werden aus einer 96er Platte 4 identische Nanotiterplatten im 2080er Format erzeugt. Ein bis zwei Platten werden als Rückstellmuster eingefroren, damit bei möglicher Aktivität eines Compounds eine zweite Testung im selben Assay zur Absicherung des Ergebnisses erfolgen kann.
Zu den Compounds in der Nanotiterplatte werden nun, ebenfalls in einer vollautomatischen Pipettierstation, der Fluoreszenzmarker zugegeben, sowie die Targets, sofern diese nicht bereits an die Oberfläche der Mikroreaktoren der Nanotiterplatte adhäsiert sind.
Die so fertiggestellten Platten gehen jetzt ohne weitere Bearbeitung in die EVOscreen- Einheit ein, wo sie wie oben beschrieben den konfokalen Laserstrahl durchlaufen und die Daten aufgezeichnet werden.

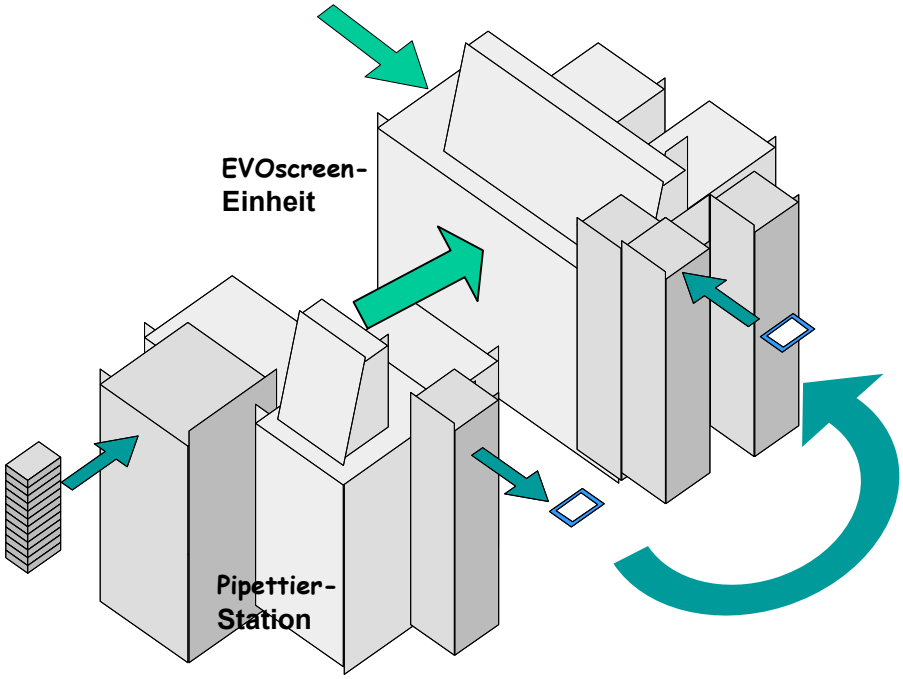


Abb. 2 Pipettierstation und EVOscreen-Einheit

Ein wichtiger Assay, der für dieses Screening-System entwickelt wurde ist der Caspase-Assay, gegen den eine Vielzahl der von uns erzeugten Extrakte getestet wurde.

Im folgenden soll dieser Assay näher erläutert werden.

Bei der Caspase handelt es sich um eine Enzymfamilie aus der Gruppe der Proteasen, also proteinspaltenden Enzymen.

Die Caspasefamilie besteht insgesamt aus 9 Caspase-Subtypen, die eine zentrale Rolle bei der Apoptose, dem spontanen Zelltod, spielen.

Die Apoptose einer Zelle wird in den Mitochondrien reguliert, von dort wird Cytochrom c, ein wichtiger Elektronenträger in der Atmungskette, ins Cytosol freigesetzt und fungiert nun als Signalmodulator, indem es an das Regulatormolekül der Caspaseaktivität Apaf-1 bindet und so die

Initiatorcaspase-9 aktiviert. Diese Anregung löst eine proteolytische Kaskade aus, bei der durch die Initiatorcaspase eine Effektorcaspase aktiviert wird, die ihrerseits unterschiedliche Proteine spaltet, wodurch letztlich der Zelltod induziert wird.
Initiatorcaspasen sind die Subtypen 8 und 9, zu den Effektorcaspasen gehören die Subtypen 3, 6 und 7.
Eine Fehlregulation der Caspasen, und damit eine Fehlsteuerung der Apoptose, spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese zahlreicher Krankheiten. Vor allem bei degenerativen Erkrankungen, wie z.B. Tumoren, Neurodegeneration, Hepatitis, rheumatoide Arthritis und Infarkte, spielt vermutlich eine übermäßige Aktivierung von Caspasen eine zentrale Rolle.
Daher sollen mit Hilfe des Caspase-Assays effektive pharmakologische Inhibitoren der Enzyme gefunden werden.
Hierzu wurden zunächst von anderen Arbeitsgruppen die Caspasen 3 und 7 in Bakterien (E.coli) exprimiert und aufgereinigt. Dadurch gelang es, aktive Enzyme zu erhalten, die direkt für ein Screeningsystem verwendet werden konnten.

Der Assay zur Detektion von Caspase-Inhibitoren basiert auf der Umsetzung des fluorogenen Caspase-Substrates Aspartat-Rhodamin 110, welches relativ spezifisch die Aktivierung von Caspasen nachweist.
Setzt man einer, das Enzym und sein Substrat enthaltenen, Lösung ein apoptoseinduzierenden Stoff zu, kann man einen Anstieg der Fluoreszenz-intensität beobachten, der durch erhöhte Caspaseaktivität und damit einen vermehrten Umsatz des Substrates hervorgerufen wird. Durch die Zugabe eines Hemmstoffes des Enzyms wird die Intensität der Fluoreszenz wieder verringert.

Die Abbildung 3 zeigt die Messung der Fluoreszenzänderung mittels Durchflusszytometrie.

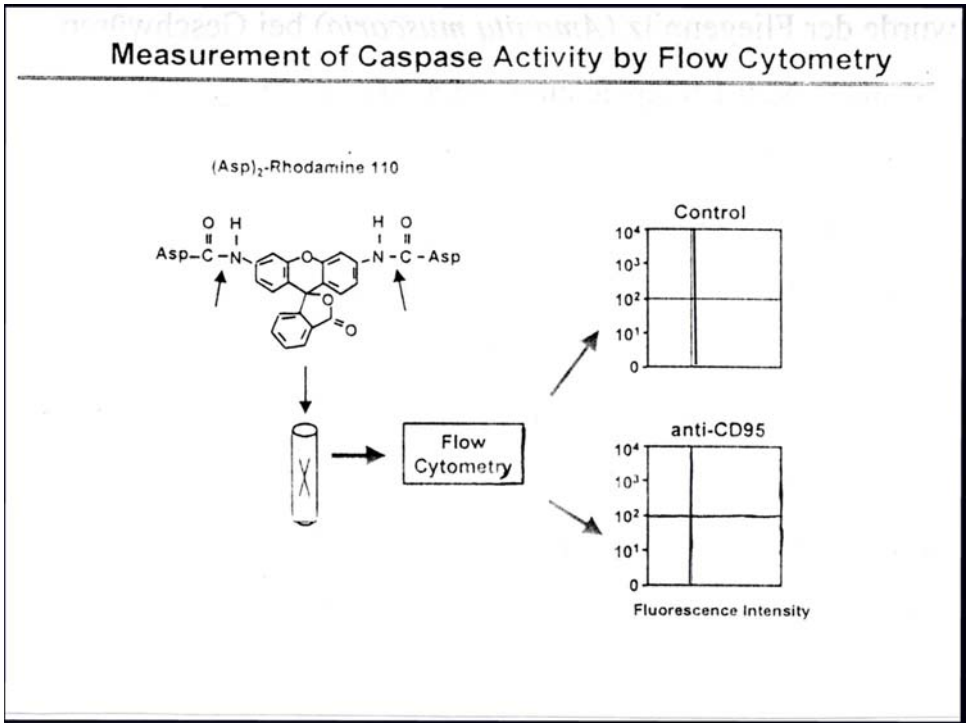


Abb. 3 Darstellung der Messung der Caspaseaktivität durch Durchflusszytometrie; das fluorogene Substrat Aspartat-Rhodamin 110 reagiert mit dem Enzym, wobei ein Anstieg der Floureszenzintensität messbar ist

Bei EVOTEC OAI wurde anstelle dieser Technik die weiter oben beschriebene FCS-Technik angewendet.

Gibt man einer Lösung von Caspase 3 bzw. 7, die zusätzlich Aspartat-Rhodamin 110 enthält, einen Pflanzenextrakt hinzu, kann man über die Auswertung der Fluoreszenzänderung im Vergleich zum „Blindwert“, einem extraktfreien Ansatz, eine Aussage darüber treffen, ob der Extrakt Inhibitoren der Caspase enthält.

Spezifizieren kann man das Ergebnis noch dadurch, dass man die Restaktivität der Caspase angibt, also quantitativ das Ausmaß der Hemmung bestimmt.

Eine besondere gerätetechnische Entwicklung der Firma EVOTEC OAI ist für die Analytik komplexer Naturstoffgemische, wie man sie in Pflanzen- bzw. Pilzextrakten normalerweise vorfindet, von besonderem Nutzen: es ist die Kopplungsmöglichkeit einer HPLC-Anlage mit der EVOscreen-Einheit (NACONA).

Der große Vorteil dieser Technik liegt darin, dass eine Bioaktivität direkt aus dem Extrakt bestimmt werden kann und damit eine aufwändige Isolierung eventuell unwirksamer Komponenten vermieden wird.

Die HPLC/HTS-Kopplung erlaubt also eine wesentlich effizientere und ökonomischere Arbeitsweise.

Der Ablauf dieses Kopplungsverfahren sieht so aus, dass zunächst der Naturstoffextrakt über die HPLC unter speziellen Bedingungen aufgetrennt wird.

Das Eluat aus der Säule wird an einem Beam-Splitter vorbeigeführt, der die Flüssigkeit auf 4 Dispenser verteilt die eine Dispensiereinheit bilden . Die Dispenser bestehen aus einem Piezokristall, der Tropfen von unter 1µl Volumen erzeugen kann.

20% des ankommenden Eluates werden über diese Dispensiereinheit auf 4 Nanotiterplatten verteilt. Die verbleibenden 80 % des Eluates werden über den UV-Detektor in den Abfall geleitet.

Pro Platte werden bis zu 4 unterschiedliche Extrakte aufgebracht und es werden je 4 identische Platten erzeugt, so dass auch hier bei einem möglichen Hit eine Verifizierung stattfinden kann. Es ist aber auch

möglich, 4 verschiedene Assays (z.B. pro Platte einen) aus einem HPLC-Lauf heraus zu testen.

Die Dispenser arbeiten mit einem Fluss von 10 – 40 µl/min, d.h. bei der gegebenen Flussrate der HPLC von 400 µl/min oder entsprechend 6,67 µl/sec kann ein Probenvolumen von 26,7 µl in vier Sekunden gesammelt werden. 21,4 µl (80%) hiervon werden in den Abfall geführt, während 5,3 µl (20%) in dem Dispenser auf die Nanotiterplatten verteilt werden. Somit gelangen ca. 1µl des HPLC-Eluates in jedes Well.

Es bleibt jedoch zu bedenken, dass in diese Berechnungen die Viskosität der chromatografierten Lösungen noch nicht einbezogen werden, so dass sich die tatsächliche Menge an Eluat pro Well zwischen 50 und 1000 nl bewegt. Diese große Variabilität stellt immer noch ein nicht-gelöstes Problem dar.

Man beachte, dass das System kontinuierlich in Blöcken von 4 Sekunden Eluat für die Assays sammelt, d.h. auch Verbindungen ohne Chromophor, die im UV-Detektor kein Signal geben, werden bei den Biotests miterfasst. Bei einer derartigen Analyse fällt eine ungeheure Datenmenge an. Deshalb ist aus technischen Gründen z.Zt. die Sammelperiode auf einen Zeitraum von 2-20 Min. beschränkt, d.h. der HPLC-Gradient muss so gewählt werden, dass alle zu vermessenden Peaks innerhalb dieser Zeitspanne eluieren.

Von essentieller Bedeutung ist bei derartigen Messungen mit der HPLC/EVOscreen-Kopplung die exakte Korrelation zwischen FCS-Signal und HPLC-Peak, die technisch schwierig zu realisieren war und viel Entwicklungszeit gekostet hat. Letztendlich konnte dieses Problem jedoch gelöst werden wie Abbildung 4 verdeutlicht.

Diese zeigt den Zusammenhang von PDA-Signal des Photodioden-Array-Detektors und dem FCS-Signal der EVOscreen-Einheit anhand einer 4-Komponenten-Mischung bekannter Hemmsubstanzen.

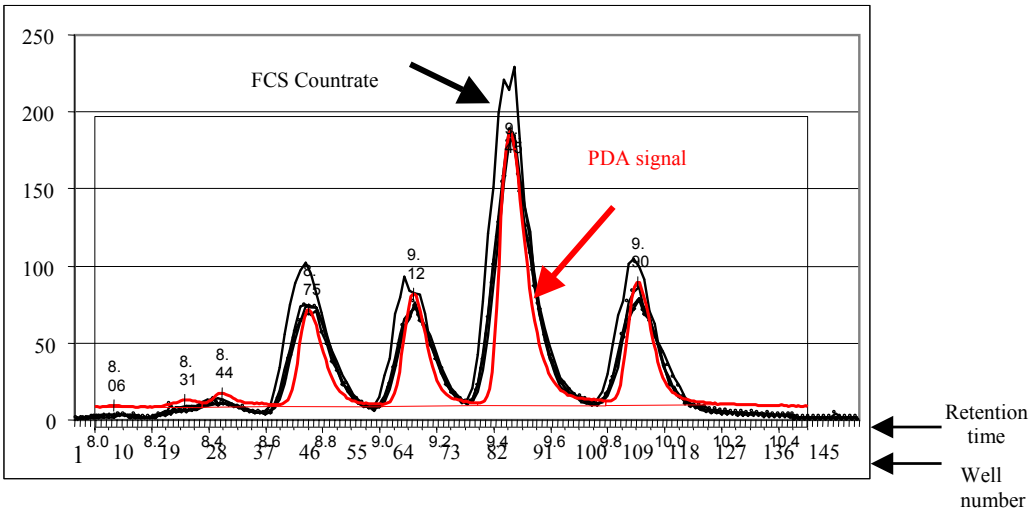


Abb. 4 Korrelation zwischen HPLC- Kurve (rote Kurve; PDA-Signal) und Assay-Signal (schwarze Kurve; FCS Countrate);
Ordinate: Inhibition in %
Abszisse: Retentionszeit (obere Zeile) und Wellnummer (untere Zeile)

Nach der Verteilung des Extraktes auf die Nanotiterplatten wird das Laufmittel durch eine 120-minütige Evaporation im Stickstoffgasstrom abgezogen. Anschließend wird nun das jeweilige Target, sowie der Fluoreszenzmarker hinzupipettiert. Je nach verwendetem Assay kann entweder direkt das Screening erfolgen oder aber es muss noch eine Inkubation zur Aktivierung stattfinden.

Bei dem Assay, den unsere Proben durchlaufen haben, handelt es sich um einen humanen Insulinrezeptor-Kinase-Assay (HIR) der bei der Entstehung des Diabetes Typ 2 eine entscheidende Rolle spielt.

Der menschliche Insulinrezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, alpha und beta. Die alpha-Untereinheit ist auf der Zelloberfläche lokalisiert, die beta-Untereinheit befindet sich in der Cytoplasmamembran.

Die beta-Untereinheit hat in der Membran eine Domäne, die die Funktion einer Tyrosinkinase ausübt.

Bindet Insulin an der Zelloberfläche an die alpha-Einheit, löst dieses ein Autophosphorylierung aus, bei der drei Tyrosinbausteine im aktiven Zentrum phosphoryliert werden. Dadurch kann nun die beta-Untereinheit unter ATP-Verbrauch weitere Proteine im Glucosestoffwechsel durch Anbindung von Phosphat aktivieren. Die wichtigsten Proteine in dieser Reihe bezeichnet man als Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS), die über mehrere Stufen den Glucosemetabolismus regulieren.

Beim Diabetes vom Typ 2 besteht häufig ein Mangel in der Phosphorylierung dieser IRS.

Der zugrunde liegende Assay basiert auf der indirekten Bestimmung der Phosphorylierung eines peptidischen Substrates durch den humanen Insulin-Rezeptor.

Der HIR phosphoryliert ein Substrat, das aus dem Pool der IRS der menschlichen Tyrosinkinase stammt.

Ein Messsignal wird erzeugt durch die Bindung von fluoreszenz-markierten, phosphorylierten Peptiden, die an nicht phosphorylierte Antikörper binden. Eine solche Bindung kommt jedoch nur zustande, wenn keine natürlichen Substrate aus der Probe durch den HIR phosphoryliert werden. Mit steigender Aktivität des HIR, also mit wachsender Zahl natürlicher Substrate aus der Probe, nimmt auch die Anzahl

phosphorylierter, nicht-markierter Peptide zu, welche ihrerseits nun mit den vorhandenen Antikörpern eine Bindung eingehen.
Die beschriebene Reaktion ist abhängig von der Menge an Substrat und ATP, wobei das Substrat im Überschuss vorhanden ist, während die Menge an ATP gerade ausreicht, eine geringe Aktivität zu gewährleisten.
In der Positivkontrolle wird ein Aktivator dieser Kaskade durch eine hohe Menge ATP simuliert.
Gemessen wird letztendlich durch eine Fluoreszenz-Polarisation mittels eines 2D-FID der Grad der Bindung zwischen Antikörper und markiertem, phosphorylierten Peptid. Ist dieses gering kann man davon ausgehen, dass sich in der Probe ein natürliches Substrat für den humanen Insulinrezeptor befindet, der seinerseits mit den Antikörpern eine Bindung eingegangen ist, auf das Signal jedoch keinen Einfluss ausübt, da sich kein Fluoreszenzmarker an ihm befindet.
Die folgende Abbildung 5 stellt noch einmal schematisch das Prinzip des HIR-Kinase-Assays dar:
Das natürliche Substrat wird von dem HIR (hier: IRK) unter ATP-Verbrauch phosphoryliert und kann somit über eine Phosphatbindung mit den Antikörpern reagieren. Daneben reagieren aber auch die mit einem Fluorophor markierten, phosphorylierten Detektionspeptide mit den Antikörpern.

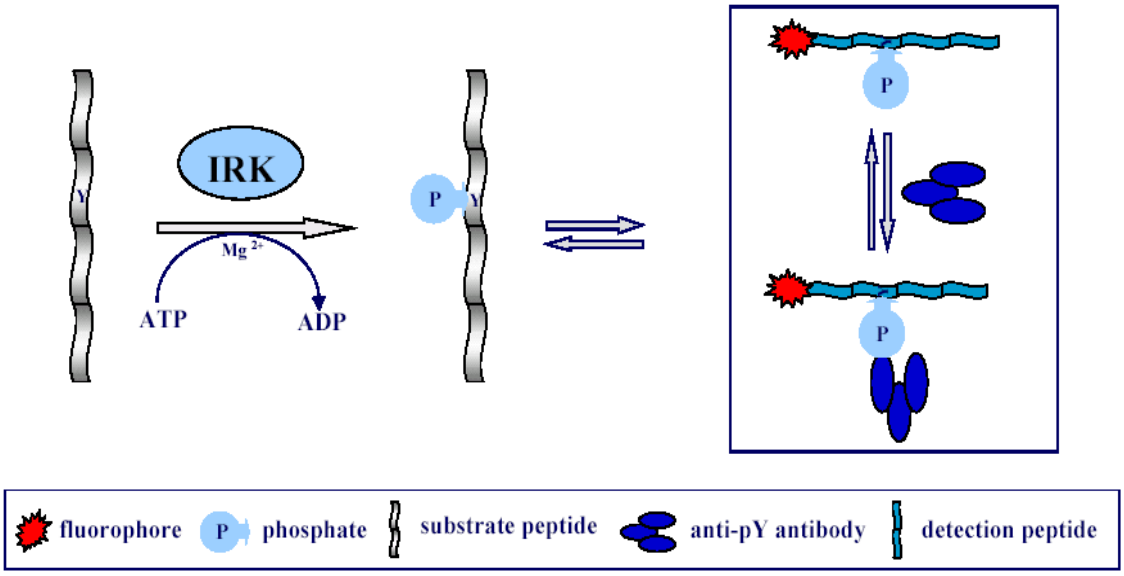


Abb. 5 Schema des HIR-Kinase-Assays
Phosphorylierung des Substratpeptids unter ATP-Verbrauch durch das Enzym (hier IRK) mit anschließender Interaktion mit den Antikörpern; ebenso kann eine Reaktion der markierten Detektionspeptide erfolgen (Einzelheiten vgl. Text)

In diesem Assay sind mittels der HPLC-EVOscreen-Kopplung (mit der sog. NACONA-Anlage) unterschiedliche Extrakte der drei Pilze *Scytinostroma portentosum, Lenzites betulinus* und *Heterobasidion annosum* gescreent worden. Dabei wurde jeweils ein Pentan-, ein Ethylacetat- und ein Methanolextrakt getestet.
Aktivität zeigten bei diesem Screening der EA-Extrakt von *Lenzites betulinus* als auch der von *Heterobasidion annosum*.

Abbildung 6 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Chromatogramm der HPLC und dem Inhibitionsprofil im HIR-Assay, sowie die Zuordnung zu den Einzelwells am Beispiel von *Heterobasidion annosum* (EA-Extrakt).

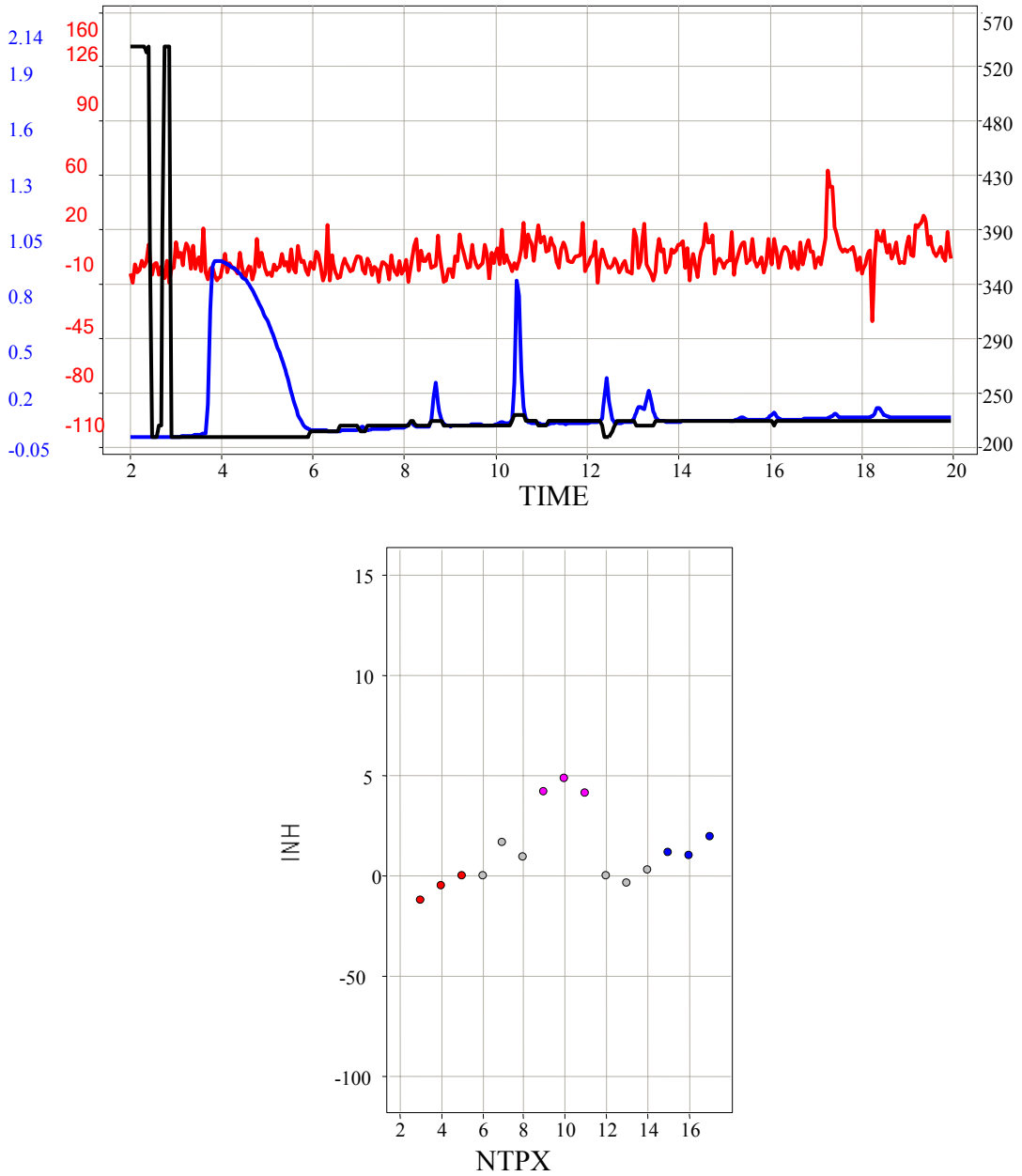


Abb. 6 HPLC-Chromatogramm eines EA-Extraktes von *H. annosum* mit korrelierendem Inhibitionsprofil und zugehörige Wells der Nanotiterplatte

Obere Grafik: Inhibitionsprofil (rote Kurve), HPLC-Chromatogramm (blaue Kurve), Durchschnitt der max. Werte aller Wellenlängen des HPLC-Chromatogramms (schwarze Kurve); auf der Ordinate sind in blau die Absorptionseinheiten und in rot die Inhibition in % dargestellt;

Untere Grafik: auf der Ordinate ist die Inhibition (Inh) dargestellt, auf der Abzisse ist die Wellnummer abzulesen (NTPX = Nanotiterplattennumerierung)

2.2 Strategien zur Objektauswahl[5, 12, 19-21]

Die Gewinnung neuer Arzneistoffe aus der Natur ist ein Ansatz, der schon seit Beginn der medizinischen Forschung verfolgt wird. Oft spielten dabei Überlieferungen oder Erfahrungen älterer, zum Teil als Scharlatane bewerteter, Menschen eine entscheidende Rolle.

1785 zum Beispiel wurde von dem englischen Arzt W. Withering die Einnahme von getrocknetem Fingerhut bei Wassersucht erstmals schriftlich belegt. Später stellte sich heraus, dass diese Krankheit auf eine verminderte Pumpleistung des Herzens zurückzuführen ist. Withering verdankt seine Entdeckung einer alten Frau in seiner Gegend, die vielen Patienten mit diesem Krankheitsbild helfen konnte, wenn alle üblichen Therapien versagten. Heute weiß man, dass es sich bei den wirksamen Substanzen aus Digitalis um Herzglykoside handelt, die immer noch Standard in der Therapie der Herzinsuffizienz sind.

Bis in die 50er Jahre lag ein Schwerpunkt der Arzneiforschung auf der Untersuchung der Gefäßpflanzen hinsichtlich ihres therapeutischen Nutzen und eine Vielzahl heute noch gebräuchlicher Medikamente entstammt diesen Forschungsansätzen, wenn auch ein Großteil heutzutage synthetisch hergestellt wird. Exemplarisch seien hier die Salicylsäure aus *Filipendula ulmaria*, Theophyllin aus *Camellia sinensis* oder Pilocarpin aus *Pilocarpus jaborandi* genannt. Doch auch noch heute können einige Wirkstoffe oder deren Vorstufen nur durch Isolierung aus der Pflanze gewonnen werden. Ein Beispiel ist das Alkaloid Taxol aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), welches partialsynthetisch aus dem in den Nadeln verschiedener Taxusarten vorkommenden Taxanderivat Baccatin III gewonnen wird und als Zytostatikum für die Behandlung von Ovarial-, Mamma- und Bronchialkarzinomen zugelassen ist.

Ab Mitte der 80er Jahre verschob sich einerseits die Strategie der Wirkstofffindung in Richtung kombinatorische Chemie und Molekularbiologie, zum anderen nahm das Interesse an Naturstoffen etwa aus Meeresorganismen massiv zu. Ein Jahrzehnt später etwa gewann die Einbeziehung ethnobotanischer Kenntnisse in Kombination mit modernen Screeningmethoden stark an Bedeutung, da es nun möglich wurde, heilkundlich verwendete Pflanzen oder Organismen ohne größeren Aufwand bezüglich Aufreinigung und Isolierung in Hinblick auf neue Behandlungsansätze zu testen.

Die höheren Pflanzen und Pilze stellen eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen her, die für den Organismus selber häufig als Abwehrstoff gegen Fraßfeinde und Krankheitserregern dienen. Von dieser Vielzahl an potentiellen Wirkstofflieferanten ist jedoch nur ein Bruchteil, nämlich nur ca. 10 %, bisher überhaupt auf seine chemische Zusammensetzung oder den therapeutischen Nutzen untersucht worden.

Für ein rationelles Arzneistoffscreening müssen daher Strategien entwickelt werden, um möglichst erfolgversprechende Kandidaten zu sammeln und den entsprechenden Vortests zuzuführen.

Die Überlegungen hierfür können ganz unterschiedlicher Natur sein. Es kann zum einen ein bestimmtes Areal festgelegt werden, in dem - mehr oder minder wahllos - eine definierte Anzahl an Organismen gesammelt wird, zum anderen können phylogenetische, also stammesgeschichtliche, ökologische oder traditionelle Aspekte berücksichtigt werden. Das oben erwähnte Taxol entstammt dem System der wahllosen Pflanzensammlung innerhalb eines festgelegten Gebietes. Es wurde vom Nationalen Krebsinstitut (NCI) in Amerika durchgeführt und führte zu dem bemerkenswerten Resultat, obwohl gemeinhin diese Strategie als die am wenigsten erfolgversprechende Variante angesehen wird.

Um die Screening-Untersuchungen auf eine möglichst breite Basis zu stellen, wurden zunächst relativ ziellos Pflanzen und Pilze gesammelt, die saisonal und regional bedingt zur Verfügung standen, ein sehr breites Spektrum unterschiedlicher Familien abdecken sollten und über die keine entsprechenden Bioaktivitätsinformationen vorlagen.

Deren Gesamtextrakte, dies war maßgeblich durch die noch nicht so weit fortgeschrittene Screening-Technologie bedingt, wurden dann im HTS gegen ausgewählte Targets gescreent.

Für unsere Untersuchungen mit der später entwickelten HPLC/EVOscreen-Kopplung wurden dagegen Baumpilze als Forschungsobjekte ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aufgrund der Tatsache, dass diese Organismengruppe einerseits bereits in früheren Zeiten in der europäischen Kultur als Heilmittel eingesetzt wurden (vgl. Abschnitt 1.2). Zum anderen gibt es vor allem im asiatischen Raum eine längere Tradition, was den Einsatz derartiger Pilze als Arzneimittel betrifft.

Hier sei vor allem auf die vielseitige Verwendung verschiedener Ganoderma-Arten, insbesondere *G. lucida*, hingewiesen.

Weitere wichtige Ansatzpunkte für die Objektauswahl waren für uns aber auch die Menge und saisonale Verfügbarkeit der Organismen, da bei einem möglichen Hit im Screening möglichst schnell weiteres Material in ausreichender Menge zur Substanzisolierung und Strukturaufklärung beschaffbar sein musste.

Der hier besonders untersuchte Baumpilz *Heterobasidion annosum* es sich kommt in vielen Sammelgebieten in ausreichenden Mengen vor und war bisher nicht Gegenstand systematischer pharmakologischer Untersuchungen, so dass er sich als ideales Screeningobjekt anbot.

2.3 *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., Wurzelschwamm

(Syn. Fomes annosus (Fr.) Cooke; Fomitopsis annosa (Fr.) Karst.; Polyporus annosus Fr.) [1, 2, 4, 22-27]

Systematik, makroskopische und mikroskopische Merkmale

Heterobasidion annosum gehört zur Klasse der Basidiomyceten und zur Ordnung der Poriales (früher zusammen mit den Cantharellales als Aphyllophorales geführt).

Sie stellt eine derzeit noch provisorische und heterogene Ordnung dar, die recht unterschiedlich umgrenzt wird und Vertreter mit gymnocarpen Fruchtkörpern beinhaltet, deren früh angelegtes, freiliegendes Hymenium bei Vergrößerung des Basidiocarps immer neuen Zuwachs erhält.

Bedingt durch unterschiedliche Autorenauffassungen bzw. Umbenennungen findet man als Familienangabe für diesen Pilz u.a. Heterobasidiaceae, Polyporaceae s.l. und Coriolaceae.

Neuerdings wird *Heterobasidion annosum* aufgrund von Merkmalen in der Mikrostruktur und in der DNA eher zu den Russulales und dort in die Familie der Bondarzewiaceae gestellt.

Die Gattung Heterobasidion besteht weltweit aus 6 Arten [25] die einzeln bei Stalpers [27] aufgeschlüsselt sind. Hiernach wurde unser Untersuchungsmaterial als *Heterobasidion annosum* (Hyphen ohne Schnallen, Skeletthyphen nicht amyloid, 3-4 Poren per Millimeter) bestimmt.

Der Wurzelschwamm ist der wirtschaftlich bedeutsamste pathogene Pilz in europäischen Nadelwäldern; seltener tritt er auch an Laubbäumen oder Sträuchern auf.

Seine Gefährlichkeit beruht einerseits auf seinem Vermögen, als Parasit lebende Wurzeln anzugreifen und abzutöten andererseits verursacht er eine im Stamm aufsteigende Weißfäule.

Hauptsächlich erfolgt die Infektion über Verletzungen an Wurzeln und Stammanläufen, aber auch über Kontakt von Sporen mit unversehrten, dünnrindigen Wurzeln und Wurzelkontakt mit einem infizierten Baum.

Das Pilzmycel dringt zuerst in den Bast und dann in den Holzkörper der Wurzeln ein, um schließlich stammaufwärts ins Kernholz vorzustoßen. Dort verursacht er eine besondere Form der Weißfäule (Abbau sowohl von Lignin als auch Cellulose und Hemicellulose), die als Rotfäule bezeichnet wird (braunrote Verfärbung des Kernholzes).

Das sicherste Indiz für einen Wurzelschwammbefall ist das Auftreten von Fruchtkörpern, meist an der Stammbasis, z.T. von Nadelstreu bedeckt. Diese erscheinen allerdings erst nach Absterben des Baumes bzw. am toten Holz. Sie wachsen einzeln bis dachziegelig neben- und übereinander (Abbildung 7).

Abb. 7 Fruchtkörper von Heterobasidion annosum; besonders gut sichtbar ist der dachziegelartige Wuchs, sowie das für Polyporaceae typische Umwachsen störender Gegenstände

Eine direkte Bekämpfung des Pilzes ist bisher noch nicht möglich, man muss sich deshalb meist auf vorbeugende Maßnahmen wie z.B. dem Pflanzen von Mischbeständen, chemische oder biologische (aufbringen einer Sporenlösung antagonistischer Pilze) Behandlung von Stubbenschnittflächen u.a. beschränken.

Der Pilz wurde bisher vor allem unter forstpathologischen Gesichtspunkten betrachtet, wobei hierbei kein Frischmaterial Verwendung fand, sondern Kulturfiltrate von auf Agarnährböden gezüchteten Pilzstämmen.

Makroskopische Beschreibung des Fruchtkörpers

Der Fruchtkörper ist resupinat (krustenförmig) semipileat bis pileat (hutförmig). Pileate Formen mit Hüten sind bis 150 mm breit und 100 mm vom Substrat abstehend, sowie bis 30 mm dick, konsolenförmig, halbrund bis langgestreckt und breit angewachsen. Die Oberseite ist höckerig, unregelmäßig wulstig konzentrisch gezont, im jungen Zustand etwas filzig, später kahl, hellbraun, graubraun bis dunkelbraun und alt schwärzlich. Der Rand ist wellig, scharf, rotbräunlich, mit einer sterilen Zone; junge Zuwachszonen sind weißlich. Die Unterseite ist feinporig, die Poren sind rundlich-eckig bis aufgeschlitzt an seitlich wachsenden Fruchtkörpern; 3-4 (5) Poren pro Millimeter, Röhrenlänge 3-6 mm, bei mehrjährigen Fruchtkörpern sind die Röhren übereinander geschichtet, weißlich, cremefarben bis ockerlich. Die Trama ist weißlich bis cremefarben. Die Konsistenz des Fruchtkörpers im frischen Zustand ist elastisch-zäh, im trockenen Zustand hart und holzig [24].

Der Pilz hat eine eigentümlichen Geruch, der z.T. als stark pilzartig beschrieben wird, nach unserem Empfinden allerdings durch eine charakteristische, stark säuerliche Note dominiert wird.

Dieser *Heterobasidion annosum* genannte Fruchtkörper repräsentiert die Telemorphe dieses Pilzes, also den Organismus, der Meiosporen (Basidiosporen) bildet. Es ist zu beachten, dass der Pilz jedoch an feuchtem, frischen Holz auch die sich nur asexuell vermehrende Anamorphe (die heute der Gattung Spiniger zugeordnet wird) zeigt, die Konidiosporen an ganz charakteristischen Trägern vom Oedocephalum-Typ ausbildet, die ebenfalls zur Verbreitung des Pilzes beitragen.

Verwechselt werden kann der Wurzelschwamm (beim Vorliegen etwas heller bräunlich gefärbter Formen) insbesondere mit der Reihigen Tramete

(*Antrodia serialis*), die ebenfalls an Stümpfen und abgestorbenen Stämmen von Nadelbäumen vorkommt. Dieser fehlt allerdings der charakteristische „Heterobasidion-Geruch“; außerdem ist sie durch eine Reihe von Mikromerkmalen (Septen mit Schnallen, Vorkommen von geschnäbelten Cystidiolen, glatte elliptische, nicht cyanophile Sporen) gut vom Wurzelschwamm zu unterscheiden.

Mikroskopische Merkmale

Das Hyphensystem des Heterobasidion-Fruchtkörpers ist dimitisch, d.h. es treten zwei Arten von Hyphen auf: generative Hyphen (bis etwa 4 µm breit; gemessen 1,3 – 3,5 µm [5 Messungen]), deren Septen keine Schnallen, aber gelegentliche Verzweigungen aufweisen und dickwandige, unseptierte Skeletthyphen (bis etwa 7 µm breit; gemessen 4,7 – 8,4 µm [5 Messungen]), die deutlich cyanophil sind (d.h. deren Wände sich in Baumwollblau blau anfärben) (Abbildung 8). Die generativen Hyphen waren nicht cyanophil.

Die keuligen Basidien sind deutlich cyanophil, tragen 4 Sterigmen und weisen keine Basalschnalle auf (Abbildung 9). Sie hatten (ohne Sterigmen) eine Größe von 9,1 – 11,0 x 5,9 – 7,0 µm [5 Messungen]. Zystiden oder andere sterile Hymenialelemente konnten keine gefunden werden.

Die Sporen sind rundlich (4,6-6 x 4-4,5 µm; beobachtet 4,0 – 5,4 x 4,0 – 5,6 µm [5 Messungen]), fein warzig, mit Tropfen und cyanophil.

Die Amyloidreaktion mit jodhaltigem Reagenz war negativ.

Abb. 8 Lichtmikroskopisches Bild der Trama-Skeletthyphen von *Heterobasidion annosum*, aufgenommen im differentiellen Interferenzkontrast (nach Normarski); Größenangaben vgl. Text

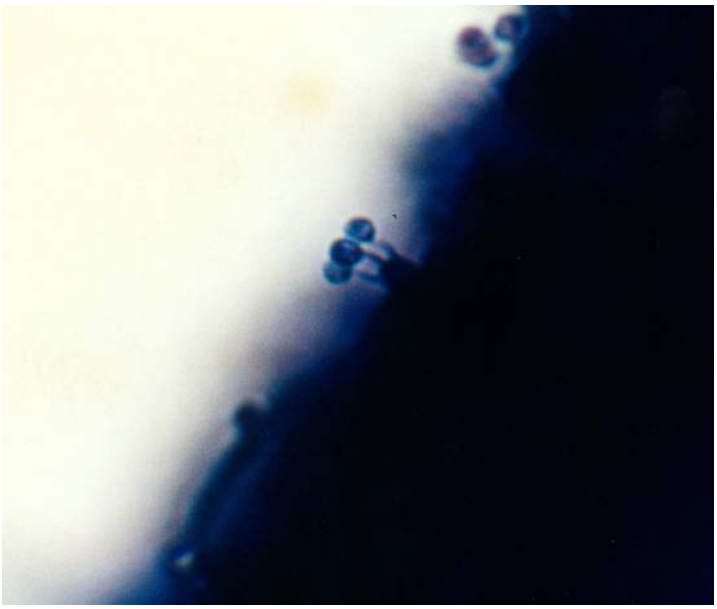


Abb. 9 Lichtmikroskopische Aufnahme der keuligen Basidien an dem Hymenium von *Heterobasidion annosum*; deutlich zu erkennen sind die Sterigmen und die an diesen sitzenden Sporen (Anfärbung mit Baumwollblau, Größenangaben s. Text)

2.4 Dünnschichtchromatografie der Pilzextrakte

2.4.1 Fließmitteloptimierung für *Heterobasidion annosum*[28]

Für unsere Untersuchungen wurden Extrakte der Pilze und Pflanzen mit drei verschiedenen Lösemitteln unterschiedlicher Polarität (Pentan, Methanol, Ethylacetat) hergestellt. Ein erster Überblick über die Zusammensetzung dieser Extrakte lieferte ein DC-„Pattern“ mit einem Fließmittel aus einer älteren Arbeit der TU München, bei dem es sich um ein Gemisch aus Chloroform:Methanol:Essigsäure im Verhältnis 75:20:5 handelt. Dabei stellte sich bei allen Untersuchungsobjekten der Ethylacetatextrakt als der geeignetste Extrakt heraus, da hier die meisten Komponenten detektiert werden konnten. Allerdings bestand trotz guter Trenneigenschaften bezüglich des zu untersuchenden Extraktes das Problem, dass das Fließmittel für die Biotests vollständig von der Platte entfernt werden musste; hierbei stellte der Essigsäureanteil ein erhebliches Problem dar. Ferner ist die Säure auch für eine mögliche Isolierung von der Platte eine schwierig zu entfernende Substanz.

Es sollte also ein Fließmittel mit möglichst guten Trenneigenschaften, jedoch ohne Säure- oder Wasseranteil gefunden werden.

Um eine optimale dünnschichtchromatografische Trennung des Ethylacetatextraktes von *Heterobasidion annosum* zu erhalten wurden umfangreiche Optimierungsarbeiten durchgeführt

Aus den Einzelkomponenten, die zur Wanderung der Extrakte vom Startfleck führten, wurden zunächst 1:1-Mischungen hergestellt; anschließend erfolgte mit den beiden Lösemitteln, die im Verhältnis 1:1 schon eine Trennung der vom Startfleck wegbewegten Substanzen erzielten 3:1-Mischungen; zur weiteren Verfeinerung wurde eine dritte Komponente

im Verhältnis 3:1:1 zugefügt, um eine breitere Trennung der Gemische zu erzielen; dies brachte jedoch noch kein befriedigendes Ergebnis; erst nach Zugabe einer vierten Komponente in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen konnte eine zufriedenstellende Trennung der Extrakte erzielt werden.

Eine graphische Übersicht über den Optimierungsvorgang gibt Abbildung 10.

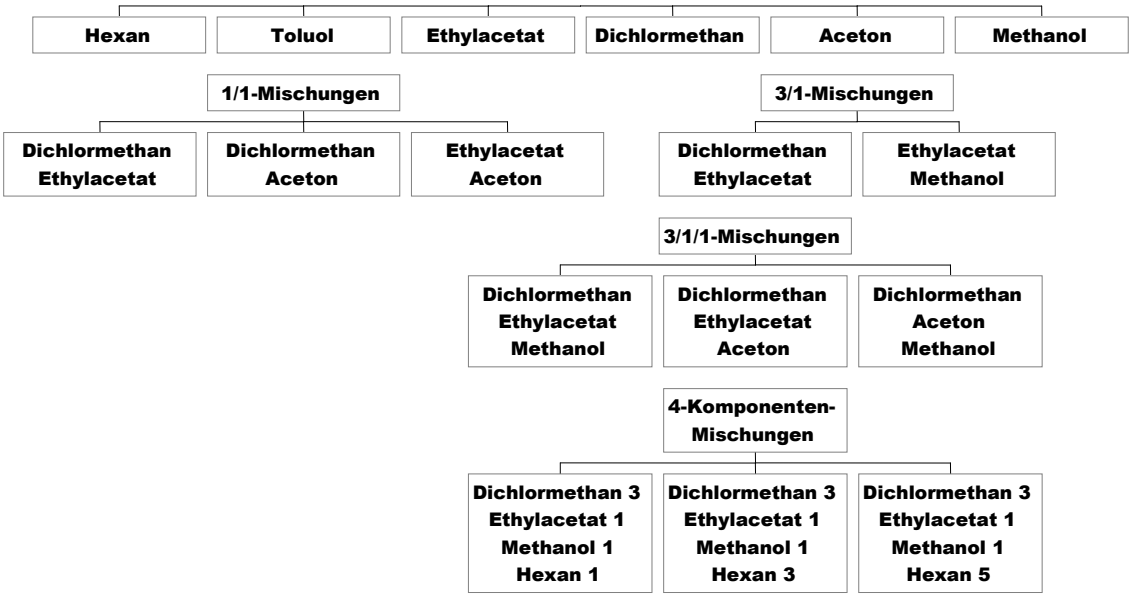


Abb. 10 Fließmitteloptimierungsschema zur Auffindung eines geeigneten Trennsystems für die untersuchten Pilzextrakte.
Die Einzelkomponenten dienten als Ausgangsstoffe für die unterschiedlichen 2-, 3- bzw. 4-Komponenten-Mischungen (vgl. obigen Text).

Als besonders geeignet für eine Trennung über einen weiten Polaritätsbereich stellte sich die 4-Komponenten Mischung
Dichlormethan / Ethylacetat / Methanol / Hexan 3/1/1/5

heraus, die im Weiteren für alle Trennungen sämtlicher Pilzextrakte Verwendung fand („Extraktfließmittel“).

Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Auftrennung des Ethylacetat-Gesamtextraktes von *Heterobasidion annosum* (EA) und der daraus durch Säulenchromatographie gewonnenen 11 Fraktionen F 1 – F 11 (vgl. Abschnitt 5.3.2).

Man kann vor allem im UV 366 erkennen, dass einzelne Banden deutlich abgegrenzt sind, so dass eine spätere Isolierung über die präparative DC gut möglich erscheint.

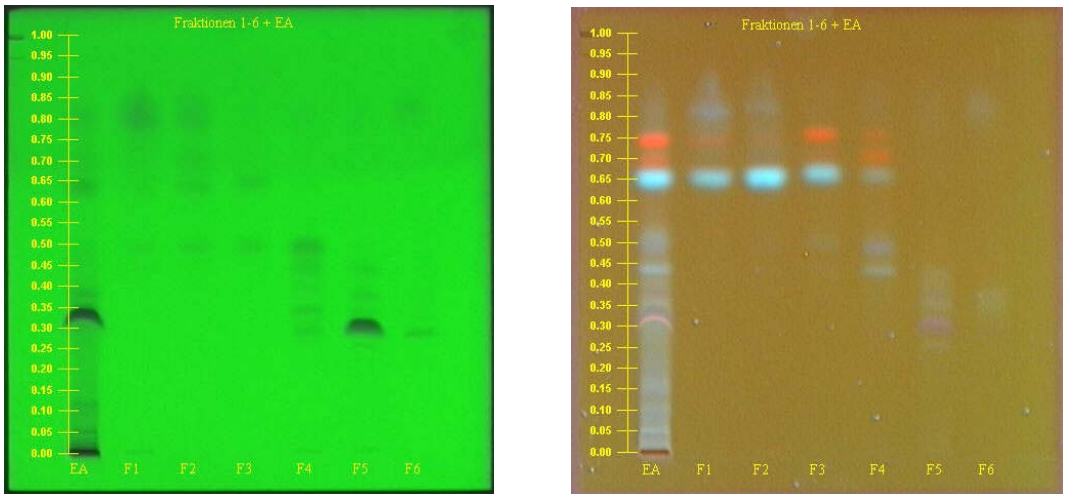


Abb.11 DC-Auftrennung eines Ethylacetat-Gesamtextrakt von *Heterobasidion annosum* und die säulenchromatographische Fraktionen 1-6 im UV 254nm (links) bzw. 366nm (rechts)

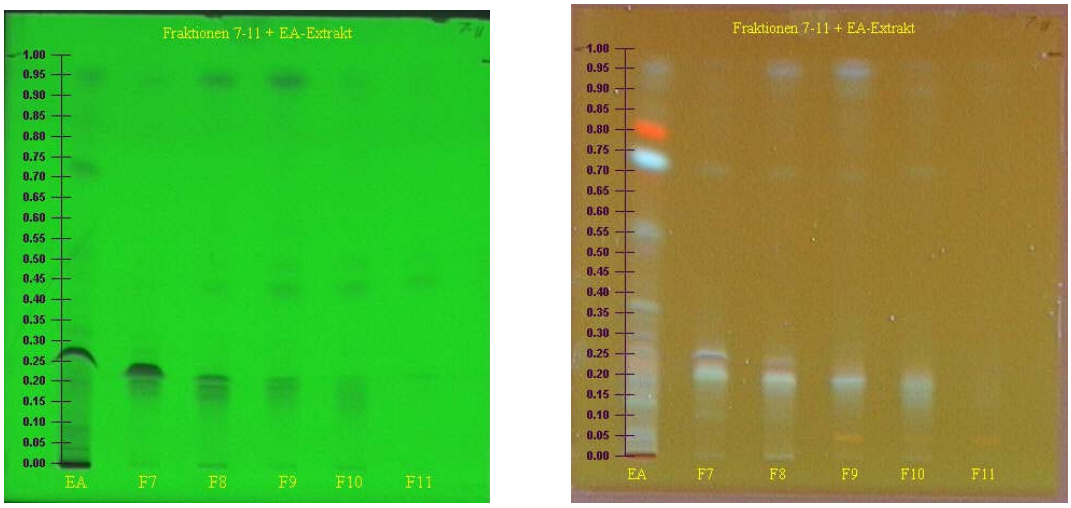


Abb.12 DC-Auftrennung eines Ethylacetat-Gesamtextrakt von *Heterobasidion annosum* und die säulenchromatographische Fraktionen 7-11 im UV 254nm (links) bzw. 366nm (rechts)

Das Wasserdampfdestillat (WD) von *Heterobasidion annosum* konnte durch ein System von Toluol/Ethylacetat 93/7 zufriedenstellend getrennt werden (Abbildung 13).

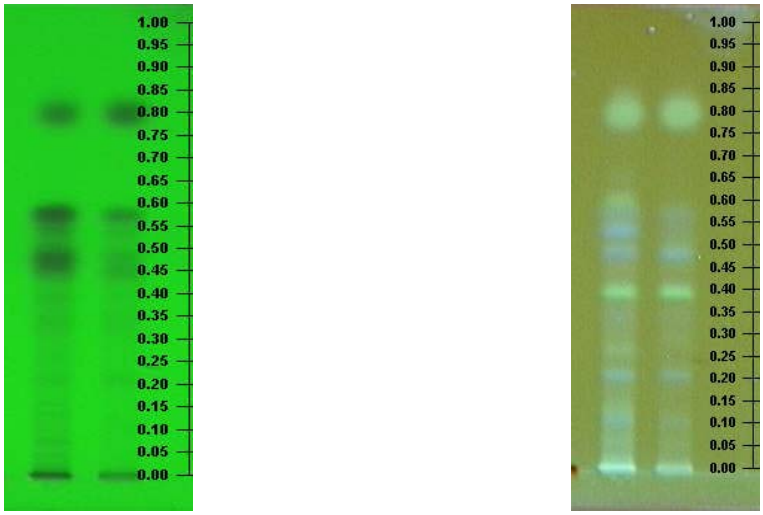


Abb.13 Dünnschichtchromatogramm eines WD von *Heterobasidion annosum* im UV 254 (links) bzw. 366 (rechts)

2.4.2 Instrumentelle Dünnschichtchromatografie

2.4.2.1 ATS III-Probenautomat

Für die Auftragung der Dünnschichtplatten konnte ein automatischer Probenautomat, der ATS III, der Firma Camag genutzt werden. Mit diesem Gerät ist es möglich, eine deutliche Verringerung des zeitlichen Aufwandes sowie eine wesentlich höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit beim Auftragen zu erzielen. Durch den weiten Einsatzbereich bezüglich der Lösungen und der aufzutragenden Mengen kann das Gerät sowohl in der quantitativen, qualitativen, sowie auch in der präparativen DC optimal eingesetzt werden. Der ATS III wird über einen PC gesteuert, deren Software über Windows oder DOS laufen kann. Die eingespeisten Daten stehen ohne Konvertierung gleichzeitig für den TLC Scanner 3 zur Verfügung.

Die Untersuchungslösungen können auf beliebig planare Medien, wie Alufolien, Glasplatten u.ä. mit den verschiedensten stationären Phasen (Kieselgel, Umkehrphasen) und Schichtdicken aufgebracht werden. Das Probenvolumen liegt zwischen 0,1µl und 50µl, je nach eingesetzter Spritze. Bezüglich der Lösungen gibt es nur geringe Einschränkungen, sie dürfen eine gewisse Viskosität nicht überschreiten und müssen möglichst partikelfrei sein, damit es nicht zum Verstopfen der Kapillare kommt.

Die Proben können entweder punktförmig auf die Schicht aufgebracht werden oder aber banden- bis rechteckförmig, wenn es sich um größere Probenvolumen pro Bahn handelt. Eine exakte Überlagerung einer Auftragezone mit einer zweiten Substanz ist möglich.

Für den Einsatz in den Biotests wurde die bandenförmige Auftragung gewählt, da es so möglich war, ohne Substanzverschleppung in den

Einzelzonen ein Probenvolumen von bis zu 25µl für die Fraktionen gleichmäßig aufzutragen. Da es sich bei den Extrakten zum Teil um recht viskose Flüssigkeiten handelt, wurde die Dosiergeschwindigkeit mit max. 100 nl/s möglichst gering gehalten, um schmale Banden zu erhalten, die zu einer verbesserten Trennleistung führen. Dadurch konnte außerdem sichergestellt werden, dass es nicht zu einer Spreitung der Lösung über die Auftragezone hinaus kommen kann, welche eventuell zu Untermischungen unter den Extrakten führen könnte.

Die Bandlänge der einzelnen Zonen betrug 6,0 mm, bei einer Höhe von 1,0 mm.

Pro Platte (bei Verwendung von 20 cm breiten Platten) können bis zu 16 verschiedene Untersuchungslösungen automatisch aufgetragen werden.

Durch die Steuerung über die Software konnten die Platten beliebig oft reproduzierbar erzeugt werden, so dass auch über diesen Punkt eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den Bioassays gegeben war.

2.4.2.2 TLC-Scanner 3

Zur densitrometrischen Auswertung der entwickelten Dünnschicht-chromatogramme stand der TLC Scanner 3 der Firma Camag mit der zugehörigen Auswertesoftware CATS zur Verfügung.
Dieses Gerät erlaubt neben der Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen auch die Analyse anderer planarer Schichten, wie z.B. Elektrophoresegelen bis zu einer Größe von
200 x 200 mm.
Die Messungen können in Remission oder Transmission erfolgen, wobei die Absorption oder die Fluoreszenz erfasst werden kann.
Die spektrale Bandbreite erstreckt sich von 190 nm bis 800 nm.
Das Gerät verfügt über drei unterschiedliche Lichtquellen, einer Halogen, einer Wolfram-, sowie einer Quecksilberhochdrucklampe, die den genannten Spektralbereich vollständig abdecken. Wird bei der Messung die Emissionsgrenze einer Lampe überschritten, wird automatisch die entsprechende Folgelampe gezündet, so dass ein stufenloser Messvorgang gewährleistet ist.
Über den PC ist es möglich, den Scanner mit dem Probenautomaten
ATS III zu verknüpfen, da beide Anwendungen auf die gleiche Datei zugreifen können. Die Koordinaten der Dünnschichtplatte, alle chromatographischen Parameter, sowie die Bahnbelegungen müssen somit nicht erneut eingegeben werden.
Der Scanner stellt sich automatisch auf die entsprechenden Plattenparameter der zu vermessenden DC-Platte ein, lediglich der Messspalt muss noch selbst eingestellt werden. Es sollte hier eine etwas geringere Breite als die der zu vermessenden Bahn gewählt werden, um Randeffekte zu vermeiden, bzw. sicher zu stellen, dass z.B. keine reinen

Kieselgelbereiche das Messergebnis verfälschen. Auch werden auf diese Weise bei schlecht getrennten Zonen entsprechende Messfehler minimiert.
Bei den vermessenen Platten wurde deshalb eine Spaltbreite von 5 mm Breite bei einer Höhe von 0,1 mm gewählt.
Manuell zu verstellende Parameter für die Analyse sind außerdem die Messgeschwindigkeit, die Auflösung, sowie der Start- und Endpunkt der Messung, wodurch es möglich ist, nur eine Zone einer bestimmten Bahn zu vermessen und die übrigen Zonen auszublenden. Bezüglich der einzelnen Einstellungen vgl. Material und Methoden (Abschnitt 5.3.1.3).
Der TLC Scanner bietet drei unterschiedliche Optionen der Analyse an.
So ist es möglich, eine Kalibrierung für die quantitative Analyse durchzuführen, es können Spektren über den gesamten UV-Bereich der Einzelzonen erzeugt werden oder es besteht die Möglichkeit, bei bis zu zehn festgelegten Wellenlängen die Spektren der einzelnen Zonen des Chromatogramms darzustellen.
Für unsere Zwecke waren nur die beiden letztgenannten Optionen von Bedeutung, da es sich bei unseren Extrakten um solche mit unbekannten Inhaltsstoffen handelt, so dass eine Kalibrierung gegen Standardlösungen nicht möglich war.
Von besonderem Interesse war die Aufnahme kompletter UV-Spektren direkt auf der DC-Platte im Falle bioaktiver DC-Zonen, da hier über einen Vergleich mit den DAD-UV-Spektren unserer HPLC-Anlage eine entsprechende Zuordnung zwischen DC-Bande und HPLC-Peak (und damit auch der Bioaktivität) getroffen werden konnte.
Dies war möglich, da die in-situ gemessenen UV-Spektren nach unseren Untersuchungen den Lösungsspektren sehr ähnlich sind und somit zu Identifizierungszwecken auch direkt mit den in Lösung aufgenommenen UV-Spektren von Datenbanken in der Literatur verglichen werden können.

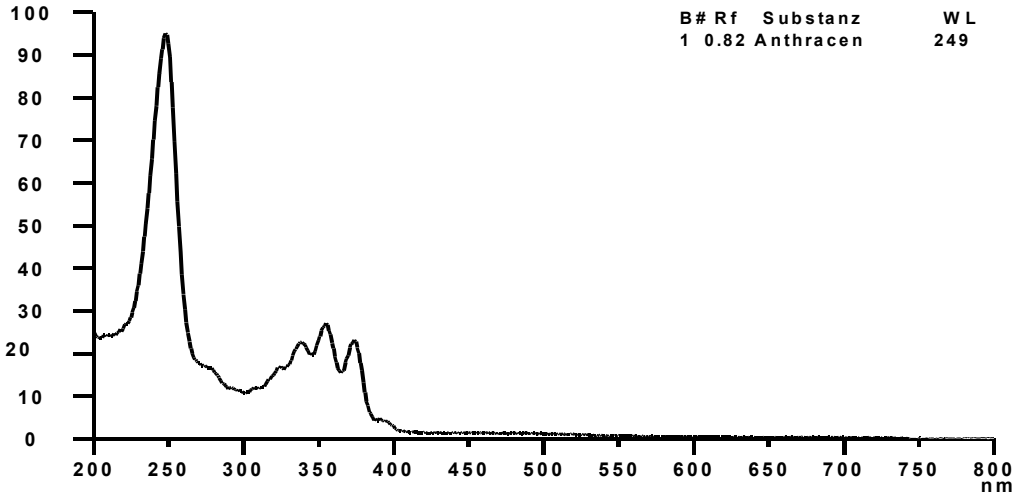
Dies veranschaulichen Abbildungen 14 und 15 am Beispiel von Anthracen, einer apolaren, stabilen Verbindung (aromatischer Kohlenwasserstoff) und Cumarin, einer polaren und unter bestimmten chromatografischen Bedingungen instabilen (Lactonring) Substanz.

Beide Stoffe wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf handelsübliche Kieselgelplatten aufgetragen und entwickelt.

Die im UV sichtbaren Zonen wurden mehrmals hintereinander mit dem Scanner abgetastet und die Spektren über einen Bereich von 200 nm bis 800 nm aufgezeichnet.

Zusätzlich dazu wurden die Lösungsspektren beider Verbindungen an einem Photometer aufgezeichnet.

Der Vergleich der erhaltenen Spektren zeigte keine signifikanten Unterschiede, so dass man die Feststellung treffen kann, dass die Identität einer Substanz über ein in-situ-Spektrum mit dem TLC Scanner nachgewiesen werden kann.



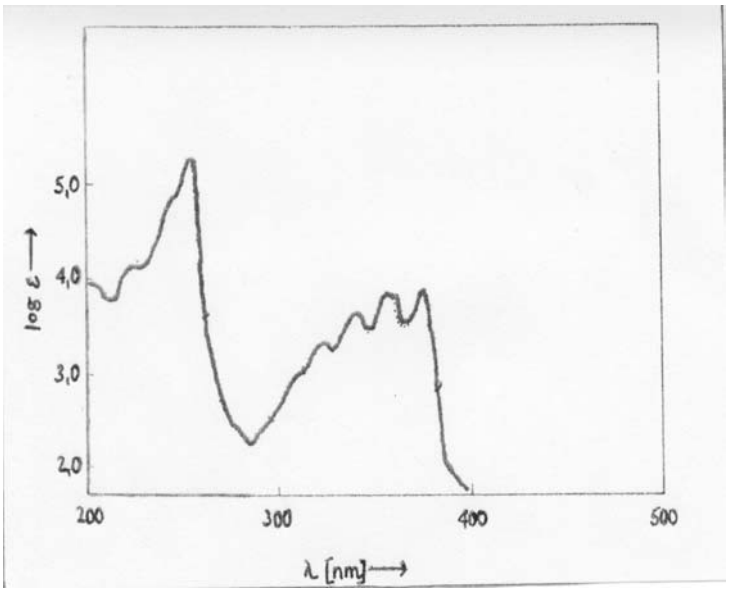
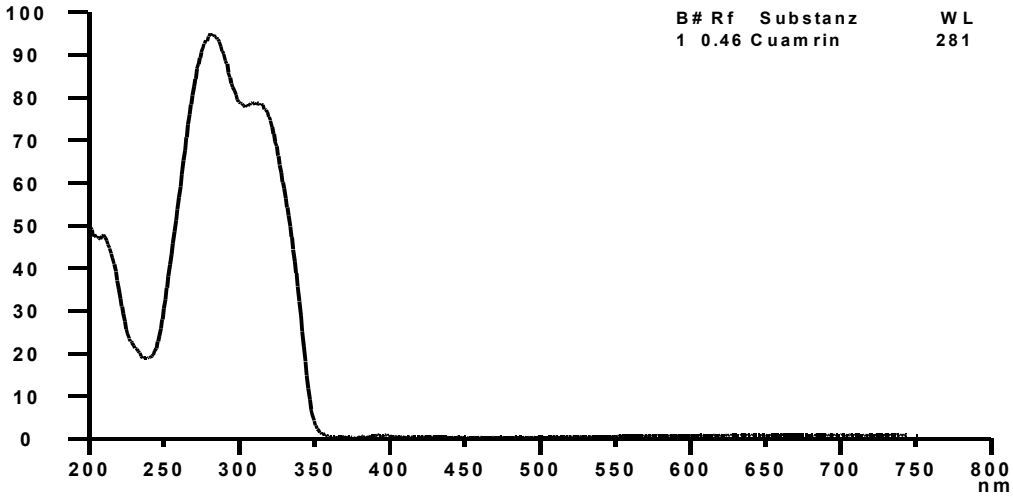


Abb. 14 obere Graphik: In-Situ-Spektrum von Anthracen (Rf 0,82) direkt auf der DC mit dem Scanner gemessen
(Fließmittel: EA: MeOH: H_2O 77:13:15; Kieselgelplatte 60 F 254nm)
Untere Graphik: Lösungsspektrum des Anthracens in Diclormethan (entnommen aus [29])
Die Maxima liegen bei 249, 340, 355 und 375 nm.



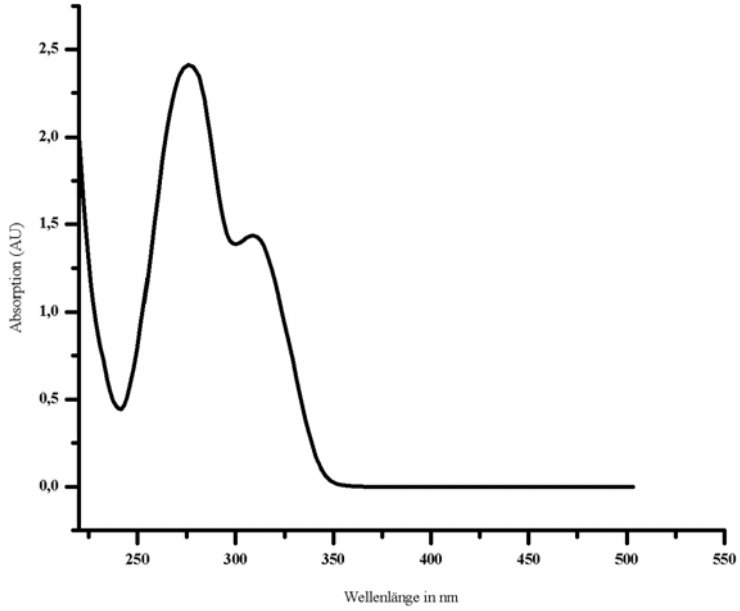


Abb.15 obere Graphik: In-Situ-Spektrum von Cumarin (Rf 0,46) direkt auf der DC mit dem Scanner gemessen (Kieselgelplatte 60 F 254 nm; Fließmittel: Toluol:Ethylacetat 85:15)

untere Graphik: DAD-Spektrum des Cumarins, aufgenommen während eines HPLC-Laufes (Säule Supersphere 100RP 18e-250 mm-2 mm Ø-
4 µm Partikel; Fließmittel H_2O:ACN 50:50; Flow 04 ml/min; Runtime 10 min); die Maximum liegt bei 281 nm.

2.4.2.3 DESAGA ProViDoc

Bei dieser Einheit handelt es sich um ein Dokumentationssystem für Dünnschichtchromatogramme, Elektrophoresegele und DNA/RNA-Fragmentdarstellungen im sichtbaren und ultravioletten Licht.
Das Gerät ist ausgestattet mit einer hochauflösenden CCD-Kamera mit einem eingebauten Hochauflösungsobjektiv.
Durch einen Bewegungszoom und einer Autofokusfunktion ist es möglich, selektiv die einzelnen Zonen, beispielsweise einer Dünnschichtplatte, extrem scharf abzubilden.
Die Kamera hat mit 1 Lux eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit und kann Bilder mit einer Auflösung von bis zu 440000 Pixel aufnehmen, so dass auch sehr schwache Fluoreszenzen dargestellt werden können.
Gesteuert und kontrolliert wird die Kamera über einen PC, die zugehörige Auswertesoftware erlaubt eine GLP-gerechte Verarbeitung der digitalisierten Bilder. Diese werden mit Datum, Benutzername und Kennnummer gespeichert, wodurch eine nachträgliche Veränderung des Bildes ohne ein erneutes Speichern mit neuer Kennung nicht möglich ist.
Zu den aufgenommenen Bildern können Kommentare eingegeben, sowie direkt Texte und Beschriftungen in das vorhandene Bild eingefügt werden. Die Kommentare erscheinen automatisch bei einem Ausdruck der Bilder zum entsprechenden Bild.

Durch das ProViDoc-System besteht eine hervorragende Möglichkeit, schnell und einfach Dünnschichtchromatogramme oder andere Medien aus den Bioassays abzubilden, zu archivieren und jederzeit für Vergleichs-zwecke wieder aufzurufen.

Gerade im Bereich der Naturstoffanalytik kann der Vergleich des dünnschichtchromatografischen Musters einen guten Anhaltspunkt zur Extrakt-Identifizierung liefern, ähnlich dem Fingerprint bei der IR-Spektroskopie. Auch zur vergleichenden Betrachtung dünnschichtchromatografisch aufgetrennter Extrakte oder Fraktionen der gleichen Pflanze bzw. des gleichen Pilzes, die jedoch zu unterschiedlichen Zeiten geerntet oder bearbeitet wurden, sind die Aufnahmen über das Videodokumentations-system eine große Hilfe. Die Software erlaubt ein Öffnen bestehender Aufnahmen neben einer aktuellen Abbildung und lässt so einen direkten visuellen Vergleich zu.

Nicht zuletzt bei der Auswertung der in dieser Arbeit vorgestellten Bioassays ist dieses System von hohem Nutzen gewesen.

Es sei an dieser Stelle auf die diversen Abbildungen der DC-Platten und Petrischalen in der vorliegenden Arbeit hingewiesen.

2.5 Dünnschichtchromatografische Bioassays

2.5.1 Einleitung/Allgemeines[30-33]

Die Idee, Bioautographie direkt auf der entwickelten Dünnschichtplatte durchzuführen, wird bereits seit den 60er Jahren verfolgt. In erster Linie ging es um die Prüfung auf antimikrobielle Aktivität gegenüber Bacillus subtilis bzw.Sarcina lutea, wobei die Detektion der Hemmzonen zunächst durch direktes Betrachten erfolgte. Erst einige Jahre später gelang es, Tetrazoliumsalze dem Nährmedium zuzusetzen oder sie als Sprühreagenzien zu nutzen und damit eine Farbreaktion hervorzurufen, die sehr viel spezifischer Hemmzonen deutlich machen kann.

Neben der Prüfung von Antibiotika wurden auch Systeme entwickelt, die es ermöglichten, Enzyminhibitoren in einem Extrakt schnell und einfach nachzuweisen. Eine besondere Bedeutung hatte hier der Pestizid-rückstandsnachweis in Leber- oder Mageninhalt.

Für das Erreichen der Zielsetzung dieser Arbeit, der Entwicklung von Bioassays, die direkt auf der Dünnschichtplatte durchgeführt werden können, war es natürlich wichtig zu wissen, welche dünnschicht-chromatografischen Testsysteme bereits etabliert worden waren. Daneben stand aber auch die Kompatibilität mit den bei EVOTEC OAI verwendeten Assays im Vordergrund, denn die bei uns entwickelten oder optimierten Systeme sollten ja zur Vorselektionierung von Organismen dienen, die bei einer positiven Reaktion erfolgversprechender ins HTS eingeschleust werden können.

So wurden die bislang bei EVOTEC OAI genutzten Assaysysteme einer Caspase- bzw. Kinase-Reaktion auf Substanzen mit enzymbeeinflussender

Wirkung sowie ein Sortase-Test, der gezielt antimikrobiell wirksame Komponenten detektiert, als Leitfaden zur dc-Assayauswahl herangezogen.
Der Cholinesterasetest sollte die Naturstoffextrakte detektieren, die bei einem Kinase- bzw. Caspase-Assay einen möglichen Hit liefern können, während die mikrobiologischen Tests als Vorscreening für einen Sortase-Assay dienen.
Der DPPH-Assay ist ubiquitär einsetzbar, da er all jene Substanzen nachweist, die in der Lage sind, als Akzeptoren für freie Elektronen zu fungieren.
Die in dieser Arbeit verwendeten bioautographischen Tests standen z.T. bereits als dünnschichtchromatografische Assays zur Verfügung bzw. waren als solche bereits erprobt und bedurften lediglich einer Anpassung an die speziellen Bedingungen der Pilzextrakte wie im Falle des Cholinesterasehemmtests oder des Bacillus-subtilis-Tests.
Der Test auf Hemmung freier Radikale wurde in der Literatur zunächst nur als Test in Microvials beschrieben. Es ist jedoch eine sehr einfache Übertragung auf die Dünnschichtplatte gelungen.

- Cholinesterase-Test [34-38]

Acetylcholin, ein biogenes Amin, ist ein Neurotransmitter an allen Nervenendigungen des parasympathischen (cholinergen) und den präganglionären Synapsen (Verknüpfung motorischer Nervenfasern und Skelettmuskelzelle) des sympathischen Nervensystems. Acetylcholin wird in den Nervenfaser aus Cholin und Acetat, welches durch das Coenzym Acetyl-CoA bereitgestellt wird, durch die Cholin-Acetyl-Transferase (CAT) synthetisiert und in Vesikeln gespeichert. Bei Erregung des Nervs wird es in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet am Erfolgsorgan an nicotinische oder muscarinerge Rezeptoren.
Dort ruft Acetylcholin verschiedene Wirkungen hervor. Es wirkt erregend auf postganglionäre, parasympathische Rezeptoren am Auge und verursacht eine Pupillenverengung, sowie Akkomodation auf die Nähe, am Herzen hat es negativ inotrope und chronotrope, also Schlagfrequenz- und Kontraktionskraft verringernde Wirkung. An der Bronchial- und Darmmuskulatur wird die Kontraktion erhöht und die Sekretion von Speichel, Schweiß sowie Bronchial- und Magensekret wird gesteigert. Außerdem wirkt die Substanz vasodilatatorisch.
Innerhalb von 0,1 ms nach Freisetzung wird der Transmitter enzymatisch durch die Cholinesterase in Cholin und Acetat gespalten. Die Cholinesterase kommt im Zentralnervensystem, in postsynaptischen Membranen der quergestreiften Muskulatur, in parasympathischen Ganglien und in den Erythrozyten vor. Das Enzym kann durch reversible oder irreversible Hemmstoffe blockiert werden, wodurch die Wirkung des Acetylcholins am Erfolgsorgan verlängert wird.
Irreversible Cholinesterasehemmer sind überwiegend von toxikologischem Interesse bzw. werden als Insektizide eingesetzt (Parathion®).

Reversible Cholinesterasehemmer wirken als indirekte Parasympathomimetika, zu ihnen zählen Physostigmin, Neostigmin oder Distigminbromid. Von pharmakologischer Bedeutung sind heute vor allem Pilocarpin und Neostigmin (Prostigmin®) in der Glaukomtherapie oder Pyridostigmin (Mestinon®), das bei Myasthenia gravis eingesetzt wird.
Ferner wird Pilocarpin bei der Diagnose der Mukoviszidose genutzt, da es nach iontophoretischer Applikation eine Stimulation der Schweißdrüsen bewirkt; erhöhte Spiegel von Na^+- und Cl^--Ionen weisen auf die Erkrankung hin.
Sehr interessant und für meine Arbeit von entsprechender Bedeutung ist ein neuer Behandlungsansatz bei Morbus Alzheimer, bei dem die cholinesterasehemmenden Stoffe Tacrin (Cognex®), Donepezil (Aricept®) und Rivastigmin (Exelon®) als Arzneimittel in der Pharmakotherapie der Krankheit eingesetzt werden.
Auch bei EVOTEC OAI wurden Versuche mit einem Alzheimer-Target gemacht, so dass mit der Möglichkeit, eine entsprechende enzymhemmende Wirkung direkt auf der Dünnschichtplatte zu detektieren, eine gute Basis für ein Präscreening geschaffen werden konnte.
Bemerkung: Pharmakologisch und chemisch korrekt handelt es sich bei dem von uns verwendeten Enzym um eine Acetylcholinesterase. Da aber in den gängigen Lehrbüchern und auch in der überwiegenden Zahl der Literatur die Begriffe Cholinesterase bzw. Cholinesterasehemmer Verwendung finden, haben wir in dieser Arbeit ebenfalls diese Ausdrücke benutzt.
Mit Hilfe des Cholinesterase-Biotests ist es möglich, Substanzen zu detektieren, die das Enzym in seiner Aktivität hemmen. Dieser Test wurde bereits 1996 von anderen Autoren (Weins et. al.) auf der Dünnschichtplatte durchgeführt, konnte jedoch in dieser Form nicht von mir übernommen

werden. Für die Anpassung an unsere spezielle Fließmittelzusammensetzung sowie die uns zur Verfügung stehenden Laborausrüstung waren einige Modifikationen im Handling des Tests erforderlich. So musste zum einen aufgrund fehlender Klimaschränke die erforderliche relative Feuchte des Inkubationsraumes durch ein befeuchtetes Filterpapier erzeugt werden, wodurch zunächst die Reproduzierbarkeit des Assays stark eingeschränkt war. Dies konnte jedoch durch Verwendung eines Standardrundfilters und einer definierten Menge Wasser zum Befeuchten behoben werden. Daneben stellten wir nach einer Reihe von Versuchen mit Physostigmin fest, dass die Tauchlösung sehr schnell nicht mehr zu der erforderlichen Farbreaktion auf der DC-Platte führte, so dass wir dazu übergingen, die Lösungen erst direkt vor der Verwendung zu mischen und diese Mischung dann auch sofort auf die Platte zu sprühen, da dadurch zum einen die erforderliche Menge an Lösung reduziert werden konnte und zusätzlich eine schnellerer Verbrauch in einem Zeitraum erfolgte, in der die Sprühlösung noch ausreichend stabil war (vgl. Kapitel 3 und 5.5.2).

Das Prinzip des Assays ist folgendes:

eine wässrige Lösung der Cholinesterase wird auf die Substanzen einer entwickelten DC-Platte aufgesprüht und die Platte dann inkubiert, damit das Enzym zu arbeiten beginnt.

Anschließend wird das Sprühlösung aus Naphthylacetat (Abbildung 16) und Echtblausalz B (Abbildung 17) aufgesprüht. Dort, wo die Cholinesterase noch aktiv ist, spaltet sie das Naphthylacetat in Naphthol und Essigsäure.

Das Naphthol wiederum kann nun mit dem Echtblausalz B zu einem rotvioletten Komplex reagieren. Bei enzymhemmenden Substanzen kann sich diese Färbung nicht ausbilden, da es zu keiner Naphtholfreisetzung kommt, d.h. die Zonen dieser Substanz bleiben hell (ungefärbt).

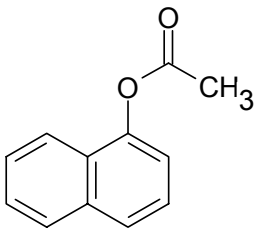


Abb. 16 Naphthylacetat

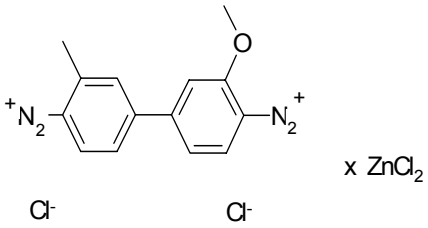


Abb. 17 Echtblausalz B

Die Bestimmung der Nachweisgrenze und der Funktionalität dieses Assays erfolgte mit Physostigmin (Abbildung 18), einem Alkaloid aus der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*), welches als reversibler Cholinesterasehemmer eingesetzt wird.

Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von Physostigmin angefertigt, die Konzentrationen von 0,001% bis 1% Physostigmin umfasste.

Von diesen Lösungen wurden je 5 µl bzw. 10 µl auf einer DC-Platte aufgetupft und die Platte anschließend ohne weitere Entwicklung wie oben beschrieben mit der Enzymlösung behandelt und nach Inkubation angefärbt.

Der Test zeigte, dass eine Menge von 5 µl einer 0,001% Physostigminlösung mit bloßem Auge gerade eben sichtbar war, der Bereich, wo mit Sicherheit eine positive Reaktion zu erkennen ist, liegt jedoch bei 0,01% (= 0,0005 µg Physostigmin)

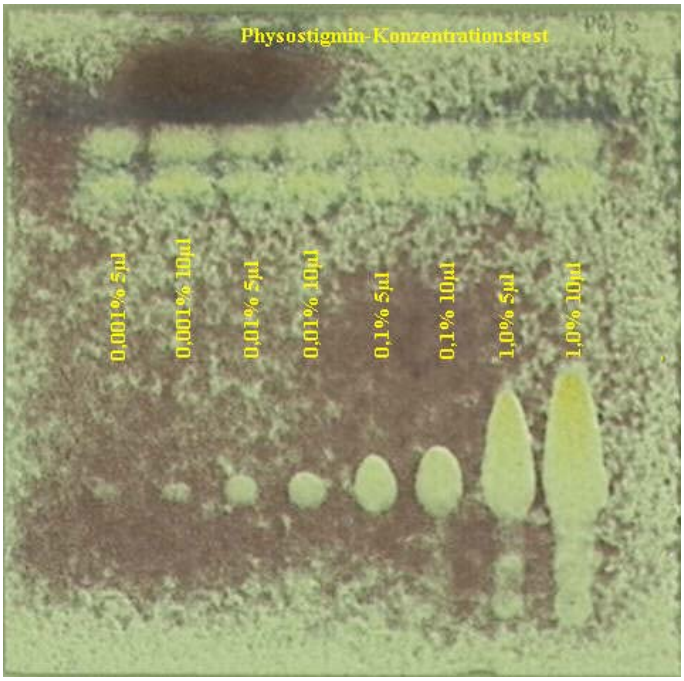


Abb.18 Cholinesterasehemmtest mit einer Physostigminverdünnungsreihe; Deutliche Hemmzonen sind noch bei einer Konzentration von 0,01% bei 5 µl (= 0,0005 µg Physostigmin) Auftragevolumen zu erkennen (vgl. Text)

- DPPH-Test [39-41]

Bei diesem Test werden Substanzen detektiert, die in der Lage sind, freie Radikale abzufangen (antioxidative Wirkungen).
Es handelt sich bei dem Nachweisreagenz um ein in Lösung stabiles Radikal, das *2,2-Bis-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl] -1-picryl-hydrazyl* (Abbildung 19). Die Lösung ist violett gefärbt.
Wird das Radikal durch eine Komponente gebunden, wird die Lösung entfärbt. Bisher wurde dieser Assay von [39] nur als Lösung in Mikrovials zur Detektion antioxidativer Flavanglykoside benutzt.
Wir griffen einen Hinweis von [40, 42] auf, die berichteten, dass dieser Test auch „in situ“ auf der DC anwendbar ist. Bei unseren Arbeiten stellten wir fest, dass die Löslichkeit der Substanz in dem bisher verwendeten Ethanol wesentlich schlechter war als in Aceton, so dass eine acetonische Lösung von uns als Reagenz verwendet wurde.
Diese Lösung stellte das Sprühreagenz dar, welches auf das entwickelte Chromatogramm auf der Platte aufgesprüht wurde.
Auch hierfür stellte sich Aceton als vorteilhafter gegenüber Ethanol heraus, da die Benetzung der Platte wesentlich gleichmäßiger erfolgte und die Platte aufgrund der leichten Flüchtigkeit des Acetons sehr schnell trocknete.
An den Stellen, an denen das Radikal durch eine Substanzbande gebunden wird, entfärbt sich die Lösung, so dass diese Zonen hell erscheinen. Die übrige Platte bleibt violett gefärbt.

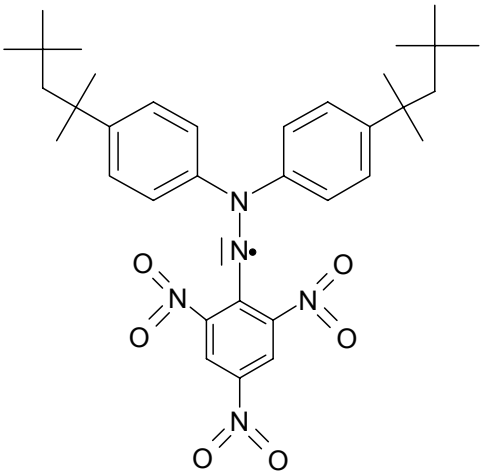


Abb. 19 Picrylhydrazylderivat (Radikal)

Die Wirksamkeit des Tests auf der DC, sowie seine Nachweisgrenze für einzelne Verbindungen wurden mit den bekannten Radikalfänger-substanzen Hydrochinon, Rutin, Resorcin und Ascorbinsäure bestimmt (Abbildung 20). Nach entsprechenden Vorversuchen zur Ermittlung des Konzentrationsbereiches wurden die unterschiedlichen Substanzen in Konzentrationen von 0,005% (Hydrochinon) bis 0,1% (Ascorbinsäure) auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und ohne weitere Entwicklung direkt mit dem optimierten DPPH-Sprühreagenz besprüht. Es zeigte sich, dass der Test sehr empfindlich auch noch Substanzkonzentrationen von 0,005% (= 0,001 µg) nachweisen kann.

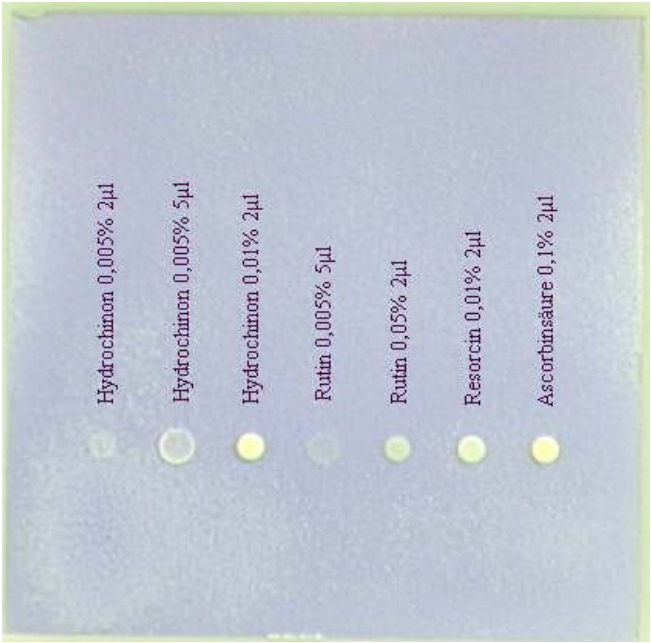


Abb. 20 DPPH-Test auf der DC mit ausgewählten Substanzen mit Radikalfängereigenschaften; auch eine Konzentration von 0,005% (= 0,001 µg Substanz) erzeugt noch eine sichtbare Hemmung (Einzelheiten vgl. Text)

- <u>Bacillus subtilis – Test auf antimikrobielle Aktivität</u>

Bei diesem Test handelt es sich um den Chrom Biodip® Antibiotika-Test der Firma Merck KGaA, Darmstadt.

Eine Sporensuspension von Bacillus subtilis wird in einem Nährmedium (Einzelheiten vgl. Kapitel 5.5.2) zum Wachstum angeregt, es bildet sich eine vermehrungsfähige Mikroorganismenlösung.

Entwickelte und sorgfältig vom Fließmittel befreite DC-Platten werden in diese Mikroorganismenlösung getaucht und für 19 h inkubiert; anschließend können noch lebende Keime mit Hilfe eines Farbstoffes (MTT-Reagenz = Thiazolblau = 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (Abbildung 21) angefärbt werden. Diese gelb gefärbte Farbstofflösung reagiert nur in Anwesenheit von oxidativ aktiven Enzymen, wie z.B. Dehydrogenasen, zu einem blau gefärbten Formazan-Derivat. Aus diesem Grund ist diese Reaktion spezifisch für lebende Keime, da andernfalls keine Enzymaktivität mehr vorhanden wäre.

Zonen, in denen die Keime durch antibakteriell wirksame DC-Zonen abgetötet werden, erscheinen auf der Platte als gelbliche Flecken.

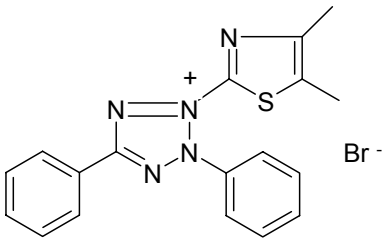


Abb. 21 Thiazolblau

Für die Anpassung an unsere Laborbedingungen konnte die Handhabung des Testkits im wesentlichen beibehalten werden; allerdings haben wir in zahlreichen Versuchen mit antibiotisch wirksamen Komponenten die Erfahrungen gemacht, dass es sehr darauf ankommt, alle Geräte vor der Verwendung gut mit Ethanol zu spülen und den Alkohol ausreichend abdampfen zu lassen. Ferner ist die exakte Einhaltung der Temperatur des Nährmediums vor Zugabe der Mikroorganismen sowie die ausreichende Feuchtigkeit der Bebrütungskammern von großer Bedeutung, um ein Wachstum der Sporen zu erzeugen. Für die Einhaltung der Feuchte wurde, wie auch schon im Cholinesterasetest, das Fehlen der Klimaschränke durch den Einsatz von Standardfilterpapier und einer definierten Menge Wasser ausgeglichen.
Eine Besonderheit, die sich im Verlauf unserer Arbeiten herausstellte, war der Umstand, dass wir nur eine positive Reaktion hervorrufen konnten, nachdem wir neue, noch völlig unbenutzte Petrischalen verwendeten. Offensichtlich können schon geringe Mengen nur schwer zu entfernender Rückstände auf den Glasschalen von früheren mikrobiologischen Versuchen mit anderen Keimen oder von Spül- und Lösemitteln das Wachstum der Bacillus subtilis Sporen negativ beeinflussen.

Die Validität des Tests, sowie die Nachweisgrenze wurde durch das Antibiotikum Chloramphenicol geprüft (Abbildung 22). Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen von Chloramphenicol auf eine DC-Platte getupft und diese Platte anschließend in die Nährlösung getaucht. Nach der Inkubationszeit wurde die DC-Platte mit dem MTT-Reagenz besprüht. Dabei zeigte sich, dass mit diesem Test die Menge von 2 µl einer 0,05%-igen Lösung von Chloramphenicol, dies entspricht 0,001 µg Substanz pro Auftragezone, noch deutlich nachgewiesen werden kann.

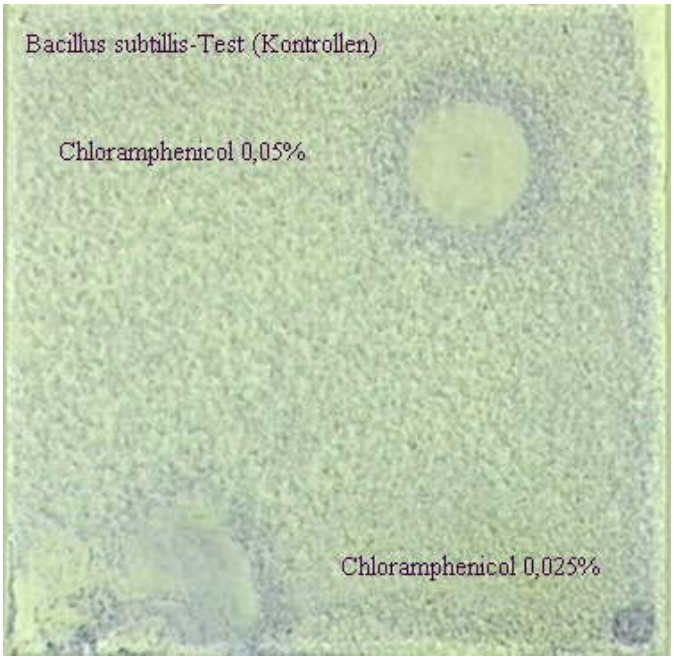


Abb. 22 Prüfung des Bacillus-subtilis-Tests auf der DC mittels Chloramphenicol als Testantibiotikum; eine deutliche Hemmung konnte noch mit einer Menge von 2 µl einer 0,05%-igen Lösung (= 0,001 µg Chloramphenicol) erreicht werden.

- Agardiffusionstest

Mit Hilfe des Agardiffusionstest lassen sich Extrakte oder Substanzen nachweisen, die das Keimwachstum unterschiedlicher Bakterienstämme hemmen.

Für unsere Zwecke wurden Escherichia coli und Staphylococcus aureus als je ein Vertreter aus der Gruppe der grampositiven bzw. gramnegativen Bakterien als Testorganismen ausgesucht. Außerdem lassen sich diese Keime recht einfach auf Nähragar anzüchten.

Nach umfangreichen Optimierungsarbeiten und einer hohen Anzahl an Fehlversuchen, konnten wir schließlich ein Verfahren entwickeln, bei dem unter Verwendung von Filterplättchen mit 9 mm Durchmesser und 0,7 mm Dicke eine Extraktmenge von 50 µl durch 6-maliges Eintauchen der Plättchen in die Lösung und jeweiligem Zwischentrocknen durch Abdampfen des Lösemittels aufgebracht werden. Die getrockneten und auf diese Weise mit Untersuchungssubstanz(en) beladenen Plättchen werden dann auf den beimpften Agar gelegt und die Petrischalen bebrütet (vgl. Kapitel 5.5.2).

Aktive Extrakte bilden um sich herum einen Hemmhof, d.h. die Bakterien werden an diesen Stellen in ihrem Wachstum blockiert, so dass sich eine helle, durchscheinende Zone um das entsprechende Plättchen bildet.

Dieser Hemmhof ist je nach Aktivität der Untersuchungslösung unterschiedlich groß und könnte, wenn es sich um nur einen wirksamen Inhaltsstoff bekannter Struktur handelt, im Vergleich mit dem Hemmhof der Vergleichsubstanz Gemifloxacin einen Aufschluss über die antibakterielle Wirkungsstärke dieser Komponente geben.

Da es sich jedoch bei den hier untersuchten Extrakten um unbekannte und meist komplex zusammengesetzte Lösungen handelt, kann der Hemmhof hier nur als Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Aktivität dienen.
Allerdings muss man an dieser Stelle hervorheben, dass Hemmhöfe um ein mit Pilzextrakten getränktes Filterpapier von einer Konzentration an aktiven Substanzen erzeugt werden, die meist weit unter der Konzentration der Kontrollplättchen mit 5 µg Gemifloxacin liegen. Zum besseren Verständnis sei gesagt, dass in 1 ml Ethylacetatgesamtextrakt von *Heterobasidion annosum* ein Trockenrückstand von 10 mg verbleibt, wenn man das Lösemittel am Rotationsverdampfer vollständig abzieht. D.h. in 50 µl Auftragemenge sind ca. 500 µg Substanz enthalten. Von dieser Menge sind jedoch meist nur Spuren der Wirkkomponente (neben zahlreichen inaktiven Begelitkomponenten) vorhanden, oft ist diese Menge sicher deutlich geringer als 5 µg, also der Menge des Vergleichsantibiotikums.
Für die Aktivitätsbestimmung heißt dies jedoch, dass ein Hemmhof der ungefähr halb so groß ist wie der der Kontrolle, von einer Substanz verursacht werden kann, deren Konzentration im Extrakt wesentlich geringer ist. Würde man diese Komponente isolieren und im gleichen Konzentrationsverhältnis wie das Kontrollantibiotikum aufbringen, könnte der Hemmhof um ein Vielfaches größer sein als beim Vergleichsplättchen.
Für unsere Untersuchungen bedeutet dieser Sachverhalt, dass trotz u.U. deutlich kleinerer Hemmhöfe als bei der Kontrolle sich in einem Extrakt sehr stark antibiotisch wirksame Substanzen befinden können.

Die Funktionalität des Assays wurde mit Hilfe von standardisierten Plättchen, die mit 5µg Gemifloxacin, einem Antibiotikum aus der Gruppe der Gyrasehemmer, benetzt sind, überprüft (Abbildung 23).

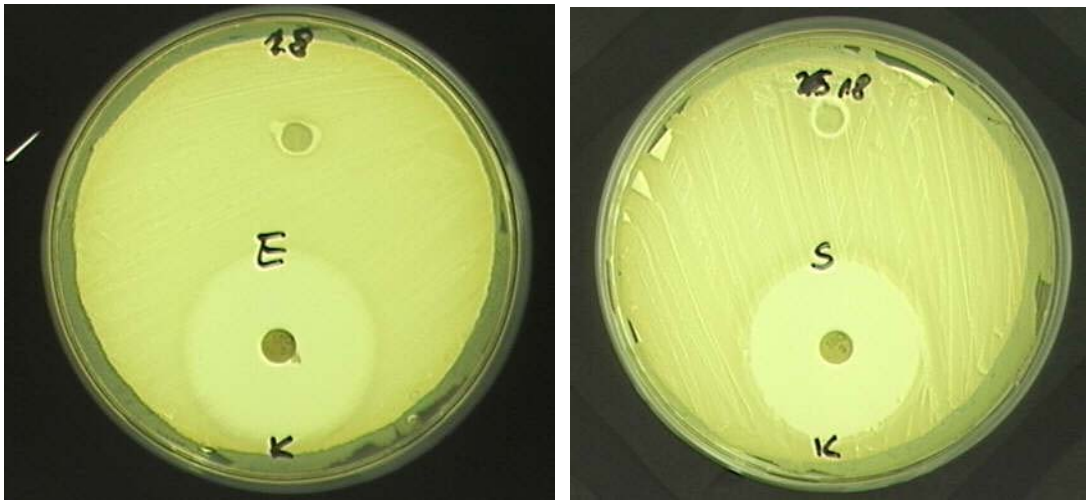


Abb. 23 Petrischalen mit beimpftem Agar; links E.coli, rechts S.aureus; im unteren Drittel der Platte befindet sich das mit 5 µg Gemifloxacin beschickte Filterpapier, welches als Kontrollantibiotikum dient; deutlich zu erkennen ist der Hemmhof um das Plättchen; die Inkubationszeit betrug 18 +/- 2 Stunden (die mit 18 bezifferten Plättchen enthalten eine hier nicht weiter relevante Untersuchungslösung).

- Blutgelatinetest[6, 43-45]

Dieser Assay detektiert Stoffe, die eine hämolysierende Wirkung entfalten, d.h. die Erythrocytenmembran zerstören, so dass der rote Blutfarbstoff in das umgebende Medium austritt.

Im Naturstoffbereich zählen zu diesen Substanzen vor allem die Saponine, für die im österreichischen und schweizerischen Arzneibuch der hämolytische Index zur quantitativen Bestimmung herangezogen wird, wobei hierbei nicht der Test auf der Dünnschichtplatte verwendet wird, sondern im Reagenzglas durch Verdünnungsreihen. Der hämolytische Index ist dann der reziproke Wert jener Verdünnung, in der 1g Droge gerade noch totale Hämolyse hervorruft. Im europäischen Arzneibuch fand sich bis vor wenigen Jahren ebenfalls noch die sehr aufwändige Bestimmung der hämolytischen Aktivität für saponinhaltige Drogen.

Die hämolytische Eigenschaft der Saponine ist hauptsächlich auf ihre Möglichkeit der Komplexbildung mit Sterolen (und in geringer Menge auch mit Proteinen) zurückzuführen, wodurch Membranbestandteile aus der Erythrocytenmembran herausgelöst werden und Hämoglobin aus der Zelle austreten kann. Allerdings weisen nicht alle Saponine diese Eigenschaft auf.

Auch in zahlreichen Pilzen kommen diese sog. Hämolysine vor. In einer Arbeit von 1972 [43] wurden über 200 Basidiomyceten verschiedener Ordnung und Familie untersucht, bei 160 konnte eine positive Hämolysereaktion festgestellt werden.

Diese Pilztoxine erzeugen die Hämolyse auf ähnlichem Wege wie die Saponine, also durch Herauslösen bzw. Verschieben von Zellmembranbestandteilen, wodurch diese, ursprünglich semipermeable Wand, nun durchlässig in beiden Richtungen wird. Besonders gut

untersucht sind in diesem Zusammnehang die Phallolysine aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*). Es handelt sich hierbei, wie bei vielen Pilzhämolysinen, um hitzelabile Proteine, wodurch sich die besondere Giftigkeit roher Pilze erklären lässt, da beim Kochen diese Komponenten zerstört werden.

Der dünnschichtchromatografische Assay bietet neben der Bestimmung, ob in einem Extrakt überhaupt hämolytisch aktive Substanzen vorhanden sind, die Möglichkeit, vorhandene Aktivität definierten Zonen eines dünnschichtchromatografisch aufgetrennten Extraktes zuzuordnen.
Hierzu wird eine Blutgelatinelösung auf die entwickelten DC-Platten aufgebracht und einige Stunden abgedeckt im Kühlschrank aufbewahrt.
Dann werden Zonen, in denen Hämolyse stattfindet, als helle Zonen innerhalb der roten Gelatineschicht sichtbar.

Die Überprüfung der Wirksamkeit des Assays erfolgte mit 1%-igen Lösungen von Saponin, α-Hederinhydrat und einem Extrakt von Hederae folium (Efeublätter) (Abbildung 24). Der Versuch zeigte, dass eine Menge von 0,3 mg α-Hederinhydrat mit diesem Test noch sehr deutlich zu detektieren ist, eine Menge von 0,4 mg Saponin jedoch schon zur Überladung der Platte führt.
In einem weiteren Schritt wurde die Nachweisgrenze bestimmt (Abbildung 25). Dazu wurden Verdünnungen einer 1%-igen Saponinlösung im Verhältnis 1:50 und 1:100 hergestellt und diese dann in Mengen zwischen 2 µl und 15 µl aufgetragen.
Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 0,004 mg Saponin noch einen sichtbaren Hämolysehof erzeugt. D.h. die Nachweisgrenze liegt bei 0,004 mg.

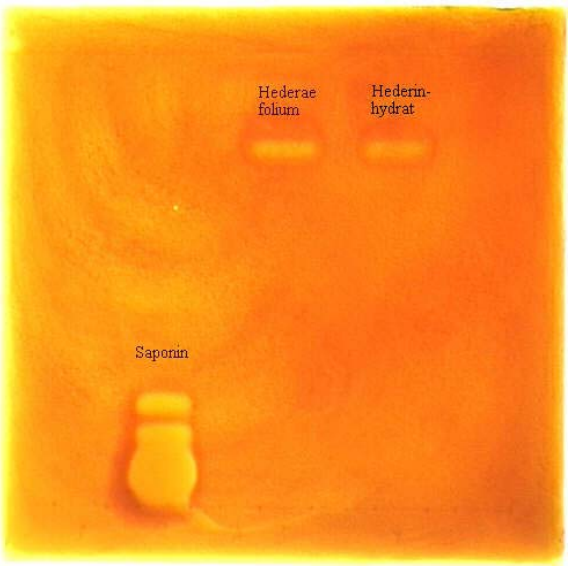


Abb. 24 Blutgelatineassay mit bekannten hämolytisch aktiven Substanzen; als Reinsubstanzen wurden Saponin und α-Hederinhydrat gewählt, ein Extrakt von Hederae folium wurde zusätzlich untersucht. Auftragsmenge: Saponin 3µl, α-Hederinhydrat 4 µl je einer 1%-igen Lösung; Extrakt von Hederae folium 4 µl.

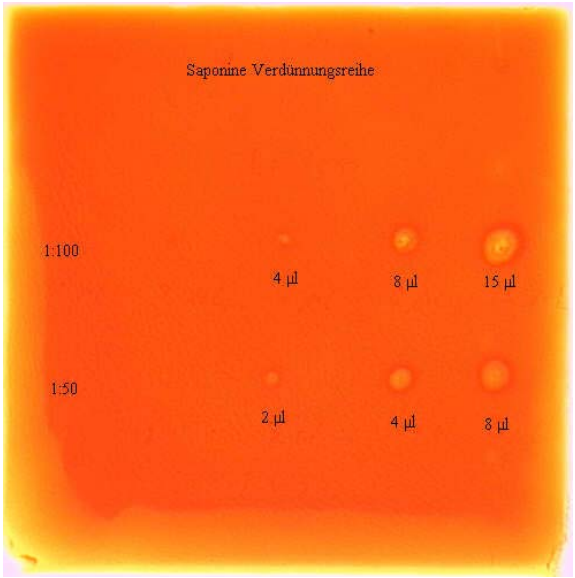


Abb. 25 Bestimmung der Nachweisgrenze anhand einer Saponinverdünnungsreihe einer 1%-igen Lösung; eine Menge von 0,004 mg Saponin erzeugt noch einen sichtbaren Hämolysehof (Einzelheiten vgl. Text).

2.5.2 Biotests der untersuchten Pilz- und Pflanzenextrakte

In der folgenden Tabelle (Tabelle Nr. 2) sind die interessantesten Ergebnisse sämtlicher Biotests aller untersuchten Organismen zusammengefasst. Dabei sind folgende Punkte zu beachten:

a) Insgesamt wurden 272 verschiedene Pflanzen- und Pilzextrakte hergestellt und untersucht, davon konnten bei 41 Gesamtextrakten im HTS deutliche, positive und negative, Aussagen getroffen werden; 50 Extrakte wurden mit den von uns entwickelten Bioassays näher charakterisiert

b) Zeichenerklärung:

+	positiver Effekt
++	deutlich positiver Effekt
+++	sehr stark positiver Effekt
-	kein Effekt
k.A.	nicht getestet

c) das Ausmaß des positiven Effektes im Agardiffusionstest richtet sich nach der Größe des Hemmhofes der Kontrolle; hier bedeutet + sichtbarer Hemmhof, ++ Hemmhof etwa halb so groß wie in der Kontrolle, +++ Hemmhof genauso groß wie in der Kontrolle

d) für die vier dünnschichtchromatografischen Testsysteme bedeutet
+ sichtbare Reaktionszone (wobei immer die Nachweisgrenze der Standardsubstanzen zugrunde gelegt wird), ++ Reaktionszone ca. halb so groß wie bei der entsprechenden Vergleichsubstanz, +++ Reaktionszone genauso groß wie bei der Vergleichssubstanz

e) Verwendung der Organismen in Form von Ethylacetat-Extrakten (Gehalt variabel; z.B. Heterobasidion annosum ca. 1%)
(Herstellung s. Abschnitt 5.2.2)

Art	*HTS Caspase-Assay*	*HTS HIR-Kinase-Assay*	*Cholin-esterase-hemmtest*	*DPPH-Test*	*Bac. sub.-Test*	*Blut-gelatine*	*E.coli*	*Staph. aureus*
Agrocybe praecox	k.A.	k.A.	+	-	k.A.	-	-	-
Azolla filiculoides	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	+	-	-
Bjerkandera adusta	-	k.A.	+	+	-	-	+	+
Boletus erythropus	k.A.	k.A.	+	-	k.A.	k.A	-	-
Bulgaria inquinans (Ext.)	-	k.A.	+	+	+	+	++	++
Bulgaria inquinans WD	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	-	k.A	k.A
Cantharellus tubaeformis	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	+	-	-
Galerina marginata	k.A.	k.A.	+	+	k.A.	-	-	-
Gloeophyllum odoratum	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	-	-	-
Gloeophyllum sepiarium	-	k.A.	+	++	-	-	+	++
Grifola frondosa	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	-	-	-
Heterobasidion annosum (Ext.)	-	+	+++	+++	++	+	-	+
Heterobasidion annosum WD	-	k.A	++	+++	+	+	-	-
Hygrophorus discoxanthus	k.A.	k.A.	++	+	k.A.	-	-	-

Art	*HTS Caspase-Assay*	*HTS HIR-Kinase-Assay*	*Cholin-esterase-hemmtest*	*DPPH-Test*	*Bac. sub.-Test*	*Blut-gelatine*	*E.coli*	*Staph. aureus*
Hypholoma capnoides	-	k.A.	-	+	k.A.	-	-	+
Hypholoma fasciculare	-	k.A.	++	++	k.A.	-	-	+
Hypholoma sublateritium	-	k.A.	-	+	k.A.	-	-	-
Inonotus nodulosus	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	-	-	-
Inonotus obliquus	k.A.	k.A.	-	++	k.A.	-	-	-
Ischnoderma benzoinum	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	+	+	+
Kuehneromyces mutabilis	-	k.A.	+	+	k.A.	-	-	-
Laccaria proxima	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	-	-	-
Lactarius rufus	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	-	-	-
Lactarius vellereus	-	k.A.	-	-	k.A.	-	-	-
Laetiporus sulphureus	-	k.A.	-	+	k.A.	+	-	-
Langermannia gigantea	-	k.A.	+	+	k.A.	+	+	+
Lenzites betulinus	-	+	-	+	k.A.	-	+	+
Lycoperdon perlatum	-	k.A.	-	+	k.A.	-	+	+

Art	*HTS Caspase-Assay*	*HTS HIR-Kinase-Assay*	*Cholin-esterase-hemmtest*	*DPPH-Test*	*Bac. sub.-Test*	*Blut-gelatine*	*E.coli*	*Staph. aureus*
Macrolepiota procera	-	k.A.	-	-	k.A.	-	-	+
Marsilea quadrifolia	k.A.	k.A.	-	++	k.A.	-	+	+
Meripilus giganteus	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	-	+	+
Merulius tremellosus	-	k.A.	-	+	k.A.	-	+	+
Panellus serotinus	-	k.A.	+	-	k.A.	+	+	+
Panellus stipticus	-	k.A.	-	+	k.A.	-	+	+
Paxillus involutus	k.A.	k.A.	++	+	k.A.	+	+	+
Phaeolus schweinitzii	-	k.A.	++	++	k.A.	+	+	+
Phallus impudicus	-	k.A.	-	-	k.A.	+	-	-
Pholiota lenta	k.A.	k.A.	+	-	k.A.	-	-	-
Piptoporus betulinus	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	+	+	+
Psathyrella piluliformis	-	k.A.	+	+	k.A.	-	-	-
Russula emetica var. sylvestris	-	k.A.	-	-	k.A.	-	-	+
Schizophyllum commune	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	+	-	-

Art	*HTS Caspase-Assay*	*HTS HIR-Kinase-Assay*	*Cholin-esterase-hemmtest*	*DPPH-Test*	*Bac. sub.-Test*	*Blut-gelatine*	*E.coli*	*Staph. aureus*
Scleroderma citrina	-	k.A.	-	+	k.A.	+	+	+
Scytinostroma portentosum (Ext.)	-	-	+	-	+	-	+	+
Scytinostroma portentosum WD	k.A.	k.A.	+	+	-	-	k.A.	k.A.
Spongiporus stipticus	k.A.	k.A.	+	-	k.A.	+	+	+
Stereum hirsutum	k.A.	k.A.	++	+	k.A.	+	+	+
Stropharia aeruginosa	-	k.A.	+	-	k.A.	-	+	++
Thelephora palmata	-	k.A.	-	-	k.A.	+	+	+
Trametes gibbosa	k.A.	k.A.	-	+	k.A.	+	+	+
Trametes versicolor	k.A.	k.A.	-	-	k.A.	+	+	+
Tricholoma basirubens	k.A.	k.A.	+	+	k.A.	+	-	-
Tricholomopsis rutilans	k.A.	k.A.	+	+	k.A.	-	-	-

Tabelle 2: Ergebnisse der durchgeführten Biotests aller näher untersuchten Organismen

Die wichtigsten Ergebnisse der in Tabelle 2 präsentierten Biotests lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:
Die Ethylacetatextrakte von 5 Pilzen wiesen einen mittelstarken inhibierenden Effekt im Cholinesterasehemmtest auf; der Extrakt von *Heterobasidion annosum* zeigte als einziger eine sehr starke Hemmwirkung während das Wasserdampfdestillat nur einen mittelstarken Hemmeffekt hervorrief.

Auch im DPPH-Test wiesen fünf Pilzextrakte eine mittelstarke Aktivität auf; nur zwei davon (*Hypholoma fasciculare* und *Phaeolus schweinitzii*) zeigten eine entsprechende Aktivität auch im Cholinesterasehemmtest. Auch in diesem Testsystem ließ nur *Heterobasidion annosum* und zwar sowohl der Extrakt als auch das Wasserdampfdestillat eine sehr starke Aktivität erkennen.

Wegen der sehr hohen Kosten des kommerziellen Testkits konnte der Bacillus-subtilis-Test nur bei wenigen ausgewählten Organismen (insgesamt 6) durchgeführt werden; eine starke Inhibierung zeigte nur ein Extrakt von *Heterobasidion annosum*. Eine schwächere Hemmung ließ auch das entsprechende Wasserdampfdestillat erkennen.

Bei der Untersuchung auf hämolytische Aktivität im Blutgelatinetest fiel kein Extrakt durch besonders starke Aktivität auf; Hämolyseeffekte wurden bei 21 Extrakten (20 davon stammten von Pilzen) beobachtet.

Nur ein Pilzextrakt (von *Bulgaria inquinans*) zeigte eine starke Wachstumsinhibierung im E. coli-Test.

Der gleiche Extrakt übte auch eine starke Hemmwirkung auf S. aureus-Kulturen im Agardiffusionstest aus, ebenso wie Extrakte von *Gloeophyllum sepiarium* und *Stropharia aeruginosa*.

Da die Hemmhöfe, die von den drei verschiedenen Pilzextrakten jeweils verursacht wurden, in ihrem Durchmesser halb so groß waren, wie der Hemmhof des Gemifloxacins, kann man davon ausgehen, dass die Pilze *Bulgaria inquinans*, *Gloeophyllum sepiarium* und *Stropharia aeruginosa* mindestens je eine Komponente mit extrem starker antibiotischer Wirksamkeit enthalten.

Natürlich kann dieser Effekt auch von mehreren Komponenten gleichzeitig hervorgerufen werden, dennoch muss der Wirkungsgrad dieser Substanzen sehr hoch sein, da 1 ml Ethylacetatextrakt nur ca. 10 mg Trockenrückstand ergibt, d.h. nur etwa 1%-ig ist und davon nur insgesamt 50 µl (ca. 500 µg Substanz) auf ein Testplättchen gegeben wurde.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ein derartiger Pilzextrakt (extrahiert mit Ethylacetat) ein hochkomplexes Substanzgemisch darstellt, das nahezu alle mittel- bis apolaren Pilzinhaltsstoffe umfasst, kann man postulieren, dass die antibiotischen Wirkstoffe in der eingesetzten Extraktmenge durchaus in Mengen unter 1 µg vorliegen können.

Somit ist davon auszugehen, dass die Extrakte von *B. inquinans*, *G. sepiarium* und *S. aeruginosa* eine (oder mehrere) stark antibiotisch wirksame Substanzen enthalten. Dieses Ergebnis ist aus mehreren Gründen bemerkenswert.:

- Die drei Pilze gehören völlig unterschiedlichen systematischen Taxa an und sind auch in ihrem Habitus grundverschieden:

Bulgaria inquinans (Pers.) Fr. (Gemeiner Schmutzbecherling, Fam. Helotiaceae bzw. neuerdings Bulgaricaceae[25]) ist ein meist flach kreiselförmig (Durchmesser bis ca. 4 cm) ausgebildeter Ascomycet mit gallertartig-zähem Fleisch. Die Innenseite mit dem Hymenium ist schwarz-braun bis schwarz gefärbt, die Außenseite meist dunkelbraun kleiig. Dem schwarzen, mit dem Finger abwischbaren, Sporenpulver verdankt der Pilz seinen deutschen Namen.

Bulgaria wächst im Winterhalbjahr gesellig, insbesondere auf Ästen und Stämmen gefällter Eichen.

Aus *Bulgaria inquinans* wurden die purpurfarbenen Farbstoffe Bulgarein und Bulgarhodin isoliert, die einzig bisher bekannten Naturstoffe mit dem Gerüst des Benzo[j]fluoranthens. Dies ist ein weitverbreitetes Carcinogen welches u.a. bei Verbrennungsvorgängen entsteht[46].

Gloeophyllum sepiarium (Wulf.:Fr.) Karst. (Zaunblättling, Fam. Polyporaceae bzw. neuerdings Gloeophyllaceae[25]) ist ein Basidiomycet und wächst ganzjährig meist konsolenförmig bis flach-fächerförmig, z.T. reihig oder dachziegelig miteinander verwachsen (Hutbreite 3-10 cm), besonders an totem sonnenexponiertem Nadelholz. Die Hüte sind ledrig-zäh, dünnfleischig, oberseits dunkel-rostbraun und borstig-filzig, oft gezont; die Zuwachskante zeigt jung einen gelblich bis orangenen Farbton. Die Unterseite ist grau-weißlich/bräunlich gefärbt (auf Druck braun verfärbend); das Hymenophor ist sehr variabel gestaltet, die Röhrenstruktur ist zu länglich bis labyrinthischen, z.T. auch lamelligen Elementen umgestaltet.

Von den Inhaltsstoffen dieses Pilzes scheint nur die auch in verschiedenen anderen Baumpilzen nachgewiesene Eburicosäure (C_{31}-Triterpencarbonsäure mit Eburicangerüst) bekannt zu sein[46].

Stropharia aeruginosa (Cke.) Ort. (Grünspanträubling, Fam. Strophariaceae[25]) ist ebenfalls ein Basidiomycet und als typischer Vertreter der Ordnung der Agaricales (Blätterpilze) in Hut und Stiel gegliedert. Der bis 10 cm breite Hut hat eine dunkel- bis blaugrüne Färbung und eine schleimig-klebrige Hutoberfläche, die mit vergänglichen weißen Flöckchen bedeckt ist. Die am Stiel angewachsenen Lamellen weisen reif eine dunkel violettbraune Farbe (wie das Sporenpulver) auf und besitzen weiße Schneiden mit haarförmigen Cystiden. Der Stiel ist bis 10 cm lang, weißlich bis schwach blau-grün und zeigt unter dem deutlich ausgeprägten Ring sparrige weißliche Flocken.
Im Herbst findet man *Stropharia aeruoginosa* verbreitet im Laub- und Nadelwald am Boden und an totem Holz.
Über die Inhaltsstoffe dieses Pilzes scheint nichts bekannt zu sein.

- Wenn man die sehr unterschiedlichen systematischen Stellungen dieser drei Pilze in Betracht zieht, die sich in gewisser Weise auch schon in ihrem stark differierenden Habitus widerspiegelt, so darf man vermuten, dass es sich bei dem von uns in den Biotests nachgewiesenen antibiotischen Wirkstoffen dieser Pilze um Verbindungen unterschiedlicher Struktur handelt.

- Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass für alle drei Pilze bisher keinerlei pharmakologische Untersuchungen vorliegen und auch über

ihre Inhaltsstoffe kaum etwas bekannt ist (*Chemical Abstracts*-Recherche bis 1.7.2003).

Im Anschluss an diese „In-situ“ Bioassays auf der DC wurden ausgewählte Extrakte, die in der Regel in mehreren dieser Testsysteme positive Effekte gezeigt hatten, in das HTS gegeben und als Gesamtextrakt zunächst gegen den bereits beschriebenen Caspase-Assay gescreent.

Neben diesen in Tabelle 2 aufgeführten 26 – im Caspase-Assay negativ getesteten - Pilzen sind insgesamt 272 weitere Arten von uns extrahiert worden und als Gesamtextrakt dem Highthroughputscreening mit dem Caspase-Assay zugeführt worden. Von diesen ausgewählten Organismen entstammten nur wenige den Farngewächsen und Gymnospermen; neben Pilzen handelte es sich überwiegend um Vertreter der unterschiedlichsten Angiospermenfamilien.

Aus der Vielzahl an Untersuchungsobjekten zeigten besonders die Gesamtextrakte von 16 Organismen, die in der folgenden Tabelle (Tabelle 3) aufgeführt werden, deutliche Aktivität in Bezug auf die Inhibierung der Caspase.

Es kann sogar ein Einteilung vorgenommen werden, ob der Organismus verstärkt Caspase 3 oder 7 hemmt oder ob eine Hemmung beider Subtypen erfolgt. Die Hemmung des Enzyms Cathepsin B wurde hier mit untersucht, um festzustellen, ob eine spezifische Hemmung stattfindet oder generell Enzyminhibierung erfolgt.

	Organismus (1%-iger methanolische Extrakt)	Restaktivität (%) Caspase 3	Restaktivität (%) Caspase 7	Restaktivität (%) Cathepsin B
überwiegende Hemmung der Caspase 3	Impatiens glandulifera	17	50	79
	Hypericum perforatum (Wurzel)	23	82	59
	Quercus robur	44	59	87
	Angelica sylvestris	50	91	55
zusätzliche Hemmung eines weiteren Enzyms (Caspase 7 oder Cathepsin B)	Macrolepiota rachodes	8	25	60
	Iris pseudacorus	12	51	46
	Mercurialis perennis	12	26	57
	Euphorbia cyparissias	25	49	57
	Cakile maritima	41	52	8
	Nicandra physalodes	50	56	6
Inhibierung aller Enzyme	Paxillus involutus	7	20	8
	Camellia sinensis (Blatt)	8	27	11
	Tabebuia impetiginosa	8	29	42
	Vinca minor	34	47	13
	Acer pseudoplatanus	35	45	35
	Camellia sinensis (Blatt;EA-Extrakt)	37	50	6
Hemmung der Caspase 3 fast zu 100%	Camellia sinensis (Blatt)	0,17	0	5,8
	Hypericum perforatum (Kraut)	0	13,5	3,3

Tabelle 3: Organismen, deren Extrakte im HTS ohne HPLC-Kopplung gegen den Caspase-Assay getestet wurden

Als besonders positiv zu werten sind die Ergebnisse, wo die Restaktivität des getesteten Enzyms unter 50 % liegt, d.h. eine Hemmung des Enzyms zu 50 % oder mehr stattfindet. Weiterhin spielte die vorrangige Hemmung der Caspase 3 eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse, da dieser Subtyp sich besonders einfach nach dem bereits beschriebenen Verfahren exprimieren lässt und somit in ausreichender Menge zugänglich ist.

Aufgrund dieser Kriterien waren die Extrakte der nachfolgend näher beschriebenen Organismen[47-49] von besonderem Interesse:

- *Angelica sylvestris L.*(Wilde Engelwurz, Fam. Apiaceae) ist eine in Europa verbreitete Pflanze, die überwiegend an Ufern, Auwäldern und Nasswiesen beheimatet ist.

  Über ihre pharmakologisch verwendeten Inhaltsstoffe ist bisher nichts bekannt. Eine als Arzneidroge genutzte verwandte Art ist *A. archangelica* (echte Engelwurz), deren Wurzel etherisches Öl und Bitterstoffe enthält und die als Stomachikum und bei dyspeptischen Beschwerden angewendet wird.
- *Impatiens glandulifera Royle* (Drüsiges Springkraut, Fam. Balsaminaceae), eine urspünglich in Ostindien beheimatete Gartenpflanze, die bei uns inzwischen auch verwildert vorkommt. Die Inhaltsstoffe dieser Pflanze sind nicht näher bekannt und auch als Arzneidroge wird sie bei uns nicht verwendet.
- *Quercus robur L.* (Stiel-Eiche, Fam. Fagaceae) ist eine in Europa beheimatete Baumart, die wegen ihres Gerbstoffgehaltes schon seit langem arzneiliche Verwendung bei entzündlichen Erkrankungen sowohl der Haut, als auch der Mund- und Darmschleimhaut findet.
- *Hypericum perforatum L.* (Tüpfel-Johanniskraut, Fam. Hypericaceae), eine heute sehr gebräuchliche Arzneipflanze, deren

Kraut wegen ihrer verschiedenen Naphthodianthrone mit antipsychotischer Wirkung als Antidepressivum eingesetzt wird. Der Extrakt wird äußerlich bei Verletzungen aufgrund der antibiotischen Wirkung des Hyperforins verwendet.

Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass im Caspase-Assay Extrakte des Krautes einen anderen Effekt zeigten als die der Wurzel. Während der Wurzelextrakt die Caspase 3 zu ca. 80 % hemmte, der hemmende Einfluss auf Caspase 7 und Cathepsin B dagegen sehr gering ausfällt, hemmt ein Extrakt des Krautes die Caspase 3 vollständig, aber auch die Caspase 7 sowie das Cathepsin B werden deutlich inhibiert. Hierin zeigt sich deutlich, dass es in der Zusammensetzung dieser Extrakte starke Unterschiede geben muss, die einer näheren Untersuchung bedürfen. Hilfreich wäre in diesem Fall die Kopplungsmöglichkeit mit der HPLC, da in einem solchen Lauf bereits eine Information über die Zusammensetzung aus dem Peakmuster gezogen werden könnte.

Wie das Beispiel des Hypericums sehr eindrucksvoll zeigt müssten die gewonnen Daten nach der Etablierung der HPLC-Kopplung nun eigentlich einem Rescreening unterworfen werden, um zu bestimmen, welche Komponenten für die beobachtete Caspaseinhibierung verantwortlich sind, da mit dem isolierten EVOscreen-System nur die Aktivität der Gesamtextrakte bestimmt werden konnte.

Bedingt durch technologische Probleme der hochkomplexen – erst seit jüngerer Zeit funktionsfähigen – EVOscreen/HPLC-Kopplung bei der Assay-Etablierung bzw. Umstellung konnten diese Messungen bisher noch nicht durchgeführt werden.

In der laufenden Konfiguration beinhaltet diese komplexe Messeinheit z.Zt. nur den HIR-Kinase-Assay (als Target für Diabetes Typ II; vgl. Abschnitt 2.1).

Gegen diesen Assay wurden die von uns bearbeiteten Extrakte von *Heterobasidion annosum, Lenzites betulinus* und *Scytinostroma portentosum* gescreent, indem diese in der bereits beschriebenen Weise in einer vorgeschalteten HPLC aufgetrennt und dann direkt aus dem Run heraus die Bioaktivität einzelner HPLC-Peaks determiniert wurde.

Es wiesen nur zwei Pilze Komponenten mit inhibierenden Eigenschaften auf, nämlich EA-Extrakte von *Heterobasidion annosum* und *Lenzites betulinus*, dem Birkenblättling.

Da *Heterobasidion annosum* zudem in vier von fünf Bioassays auf der DC z.T. starke Effekte zeigte (vgl. Tabelle 2) und darüber hinaus im HTS (HIR-Kinase-Assay) eine aktive Komponente aufwies (vgl. Abschnitt 2.6.4), haben wir unsere Untersuchungen auf diesen Baumpilz konzentriert.

2.5.3 Bioautographie von *Heterobasidion annosum*

Zur Bioaktivitätsuntersuchung von *Heterobasidion annosum* wurden Extrakte des Pilzes mit Methanol, Ethylacetat und Pentan sowie das Wasserdampfdestillat eingesetzt. Zusätzlich stellten wir von dem Ethylacetatextrakt elf säulenchromatografische Fraktionen her, um eine feinere Differenzierung des komplexen Extraktes auf der Dünnschichtplatte zu erhalten (zur Herstellung der Fraktionen s. Kapitel 5.3.2). Diese elf Fraktionen wurden neben dem Gesamtextrakt auf der DC aufgetrennt.

Die Fraktionen 10 und 11 waren nur im Bacillus-subtilis- Test aktiv, aus diesem Grund sind sie bei den weiteren Assays nicht mit berücksichtigt worden.

Im Cholinesterase- und DPPH-Assay waren besonders die säulen-chromatografischen Fraktionen 1, 3 und 5 von Interesse, da hier deutliche Hemmungen in abgegrenzten Zonen zu erkennen waren (Abbildung 26 und 27). Die Zone 4 zeigt ebenfalls deutliche Aktivität, doch scheint diese Fraktion eine Zusammensetzung aus Fraktion 3 und 5 zu sein, allerdings mit einer schlechteren Trennung der Banden, so dass diese Fraktion für eine weitere Bearbeitung nicht verwendet werden konnte.

Die aktiven, in den Abbildungen gekennzeichneten Banden bei Rf 0,63 für Fraktion 1 und 3 sowie Rf 0,32 für Fraktion 5 wurden isoliert und für weitere Untersuchungen verwendet (s. Abschnitt 2.6). Auch im Bacillus-subtilis Test zeigten die Fraktionen 1 und 3 einen deutlich positiven Effekt (Abbildung 28), während die anderen Fraktionen keine Komponenten mit antibiotischer Aktivität enthielten.

Auch das Wasserdampfdestillat von *Heterobasidion annosum* wies im Cholinesterase- und DPPH-Assay Aktivität (Abbildung 29) auf, besonders in 3 DC-Zonen bei Rf-Werten von 0,55, 0,59 und 0,8 war die Hemmung im

Cholinesterase- und DPPH-Test stark ausgeprägt. Zusätzlich konnte man bei Rf 0,47 und im Bereich von 0,33 bis 0,43 Cholinesterasehemmung beobachten.

Im DPPH-Assay war eine weitere schwache Hemmzone bei Rf 0,52 zu erkennen.

Die Zonen bei Rf 0,55, 0,59 und 0,8, in der Abbildung 29 markiert, wurden isoliert und weitergehend analysiert (vgl. Abschnitt 2.6).

Auch im Bacillus-subtilis- Test war ein positiver Befund im Bereich von Rf 0,0 bis 0,2 zu registrieren .

Der Blutgelatinetest war nur mit dem Wasserdampfdestillat positiv; die aktive Zone liegt bei Rf 0,52 (Abbildung 30).

Im Agardiffusionstest wurden zunächst nur der Gesamtextrakt und das Wasserdampfdestillat untersucht, hierbei bestätigte sich die schon in Versuchen mit anderen Pilzen bzw. Pflanzen gemachte Beobachtung, dass der grampositive Keim S. aureus deutlich stärker gehemmt wurde, als der gramnegativen Organismus E. coli.

Sowohl das Wasserdampfdestillat, als auch die Extrakte riefen nur bei S.aureus Hemmhofbildung hervor (Abbildung 31).

Wie die Abbildung 31 zeigt wurden in diesem Test sowohl der Extrakt des frischen Pilzes als auch der des getrockneten Pilzes untersucht, da es bei einigen Pilzen erst unter Hitzeeinwirkung zur Bildung bestimmter Substanzen kommt, welche u.U. pharmakologische Aktivität besitzen. Allerdings konnten keine Aktivitätsunterschiede festgestellt werden; auch stellten sich in der dc-Auftrennung keine Unterschiede dar, so dass der getrocknete Extrakt in den weiteren Tests keine Berücksichtigung fand.

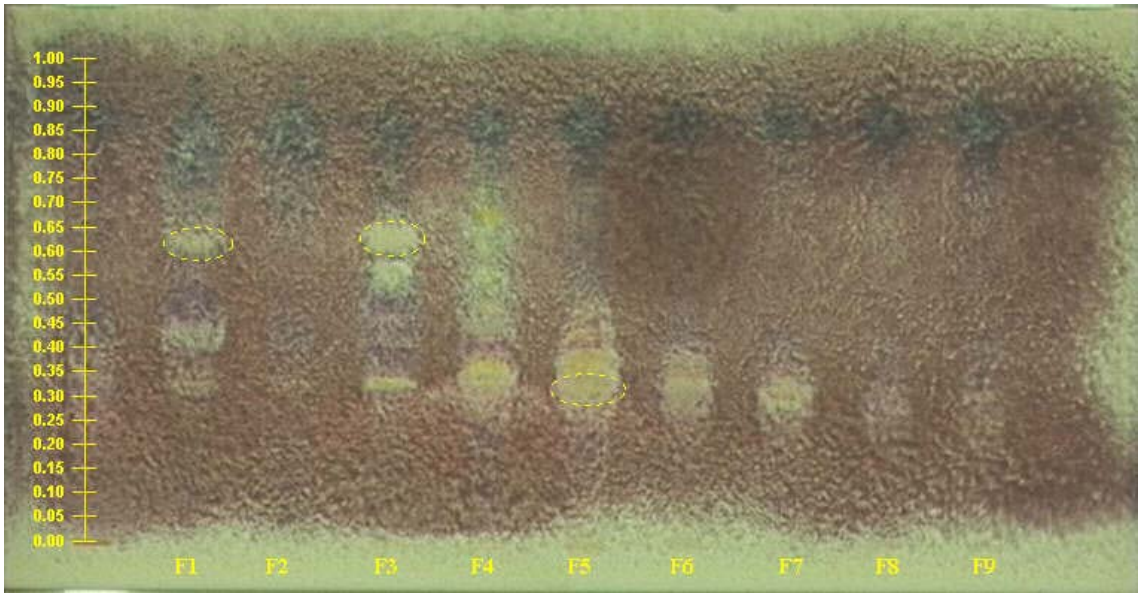


Abb.26 DC-Auftrennung der SC-Fraktionen (F1 bis F9) eines Ethylacetat-Extraktes von *Heterobasidion annosum* mit anschließendem Cholinesterasehemmtest; die markierten Zonen wurden im weiteren Verlauf isoliert und näher untersucht.

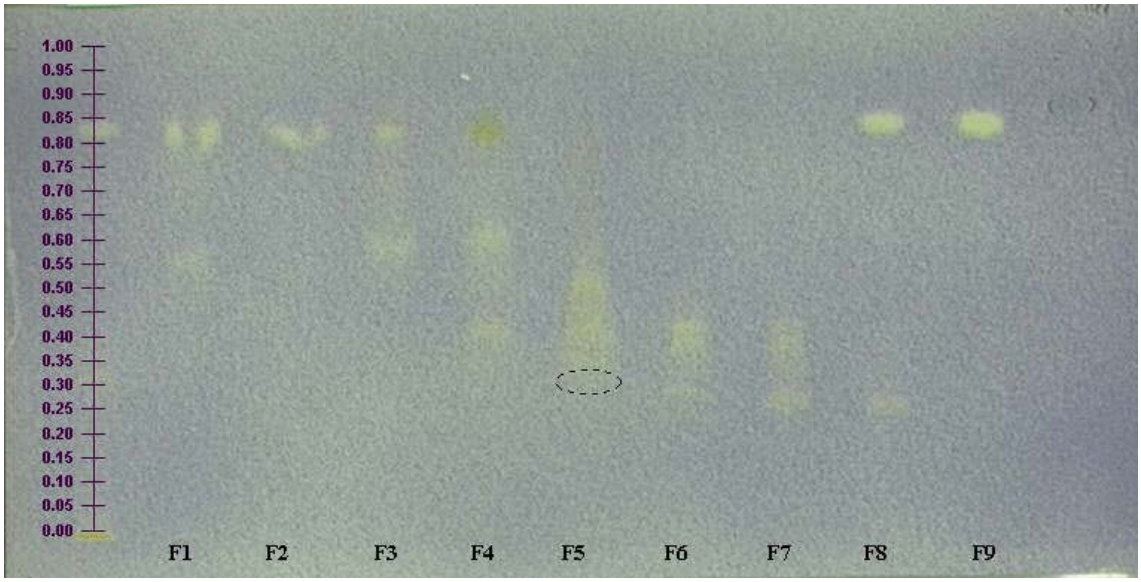


Abb.27 DC-Auftrennung der SC-Fraktionen (F1 bis F9) eines Ethylacetat-Extraktes von *Heterobasidion annosum* mit anschließendem DPPH-Test; die markierte Zone wurden im weiteren Verlauf isoliert und näher untersucht.

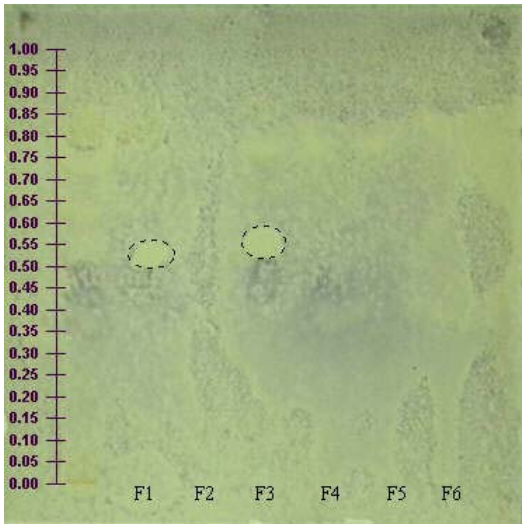


Abb. 28 DC-Trennung der SC-Fraktionen von *Heterobasidion annosum* F1 bis F6 im Bacillus subtilis-Test; die markierten Zonen wurden im weiteren Verlauf isoliert und näher untersucht.

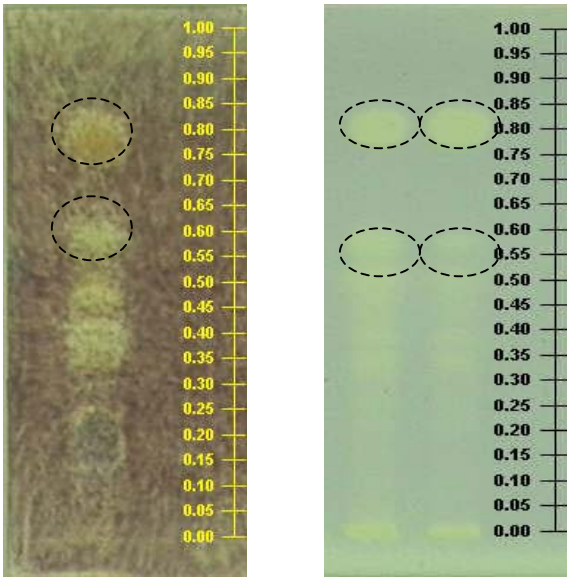


Abb. 29 DC des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum* im Cholinesterasetest (links) und DPPH-Test (rechts); die markierten Zonen wurden im weiteren Verlauf isoliert und näher untersucht.

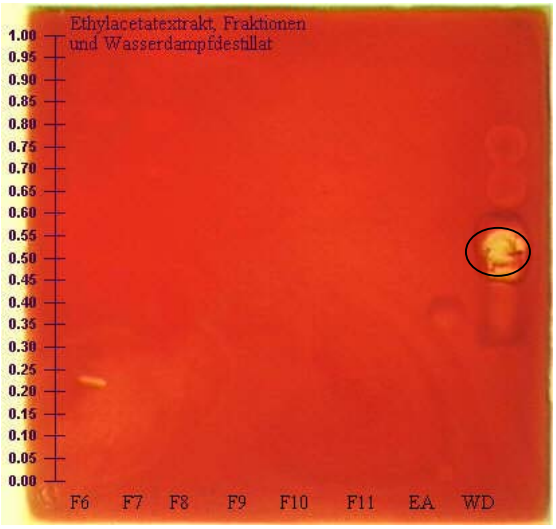


Abb. 30 DC-Auftrennung der SC-Fraktionen F6 bis F11 und das WD von *Heterobasidion annosum* mit anschließendem Blutgelatinetest auf der DC

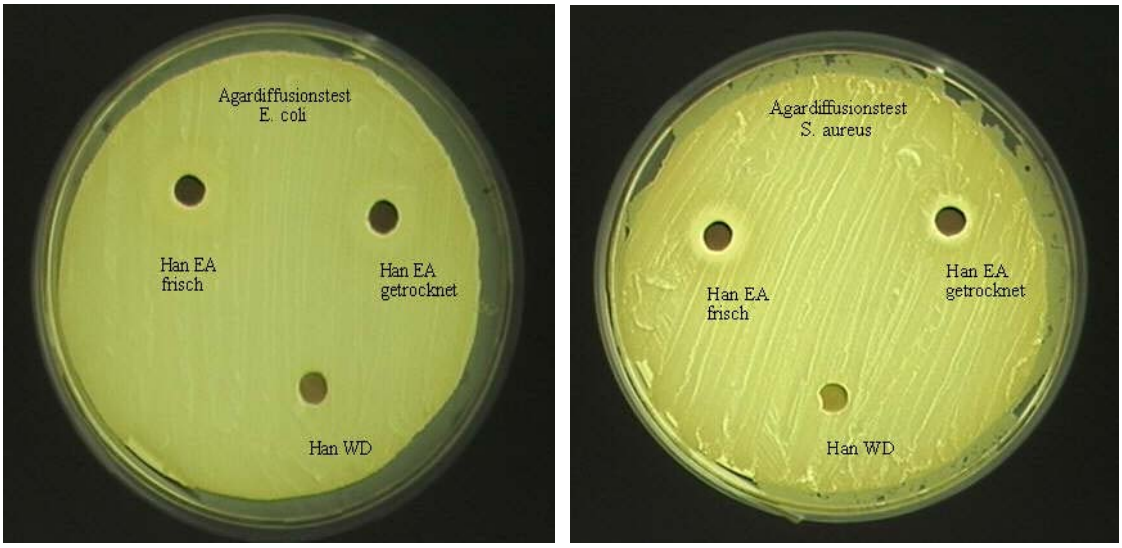


Abb. 31 Agardiffusionstest von E. coli (links) und S. aureus (rechts) mit einem EA-Extrakt von frischem und getrocknetem *Heterobasidion annosum* (Han EA) und dessen Wasserdampfdestillat (Han WD) nach 18 Stunden Inkubation (Einzelheiten vgl. Text)

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die „in situ“-Biotests auf der DC des Ethylacetat-Extraktes von *Heterobasidion annosum* bzw. seiner SC-Fraktionen den Nachweis von entsprechender Aktivität für eine ganze Reihe von DC-Zonen ergeben haben.

Einige dieser Zonen sollten im weiteren Verlauf isoliert und eingehender analysiert werden. Diese Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt erläutert.

2.6 Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Komponenten

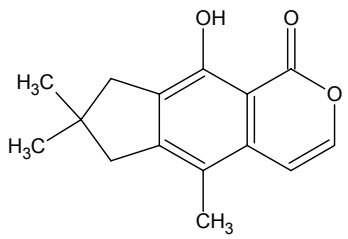
Der Pilz *Heterobasidion annosum* wurde bisher nur unter forstpathologischen Aspekten untersucht[50-59]. Allerdings wurden diese Untersuchungen nicht an Frischmaterial, sondern an Kulturen, die auf Agarnährböden gezüchtet wurden, durchgeführt. Es erfolgte bisher keine Überprüfung, ob der Pilz die im Kulturfiltrat gefundenen Inhaltsstoffe auch in der freien Natur produziert.

Gegenstand der bisher durchgeführten Arbeiten war hauptsächlich herauszufinden, welche Metabolite von *Heterobasidion annosum* produziert werden und wie man dieses Wissen nutzen kann, um den Waldbestand vor dem Pilz zu schützen.

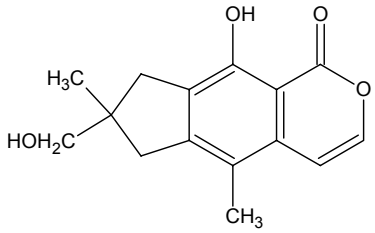
In diesem Zusammenhang untersuchten Sonnenbichler und Mitarbeiter [52] auch das antibiotische Verhalten einiger Verbindungen, u.a. Fomajorin S, Fomannoxin und Fomannosin und konnten für diese Verbindungen Hemmwirkungen gegen antagonistische Pilze sowie gegen E. coli nachweisen.

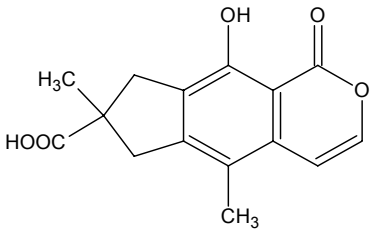
Eine systematische pharmakologische Untersuchung der gefundenen Verbindungen erfolgte bis dato jedoch nicht.

Nachfolgend sind die bisher in Kulturfiltraten von *Heterobasidion annosum* gefundenen Sekundärmetabolite dargestellt:



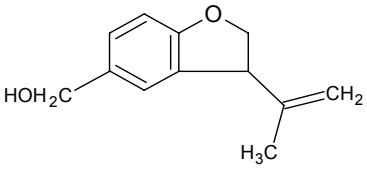
Fomajorin D

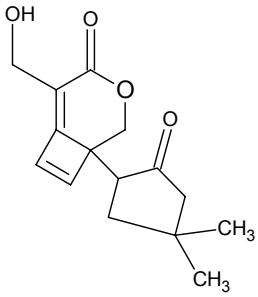




F39a {Cycopenta[g]-2-benzopyran-1-(6H)-on, 7,8-dihydro-9-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-5,7-dimethyl}

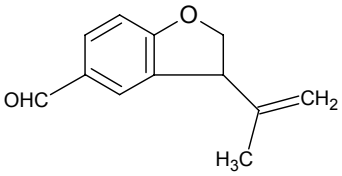
Fomajorin S

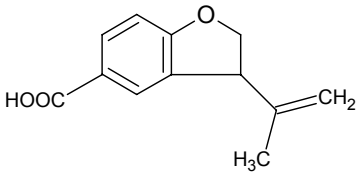




F35b {5-Hydroxymethyl-benzofuran, 2,3-dihydro-3-(-1-methylethenyl}

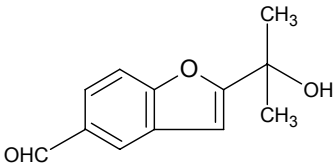
Fomannosin

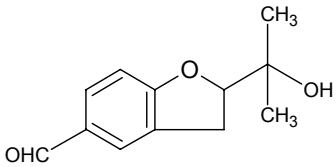




Fomannoxin

Fomannoxinsäure





F31 {5-Benzofurancarboxaldehyd, 2-(hydroxy-1-methylethyl)}

F28 {5-Benzofuran-carboxaldehyd, 2,3-dihydro-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)}

2.6.1 Extrakt-Fraktion 1

Die Fraktion 1 wurde aus dem Ethylacetat-Extrakt von *Heterobasidion annosum* durch säulenchromatografische Trennung an Kieselgel gewonnen. Diese Kohlenwasserstofffraktion konnte durch Elution mit 50 ml Pentan erzeugt werden. Das Eluat wurde über Na_2SO_4 getrocknet und auf 5 ml eingeengt (vgl. Abschnitt 5.2.2 und 5.3.2).
Diese Lösung konnte für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet werden.

Zunächst wurde die Fraktion dünnschichtchromatografisch untersucht (Abbildung 11).
Bei den durchgeführten Bioassays war die Fraktion 1 sowohl Cholinesterase-, als auch DPPH-aktiv, außerdem zeigte die Fraktion Aktivität im Hämolysetest (Abbildungen 26-31).
Von besonderem Interesse war die im Cholinesterasetest positive Zone bei einem Rf-Wert von 0,63. Von dieser Zone wurde mit Hilfe des TLC-Scanners das UV-Spektrum auf der DC aufgenommen (Abbildung 32); dieses zeigt ein Maximum bei 252 nm.

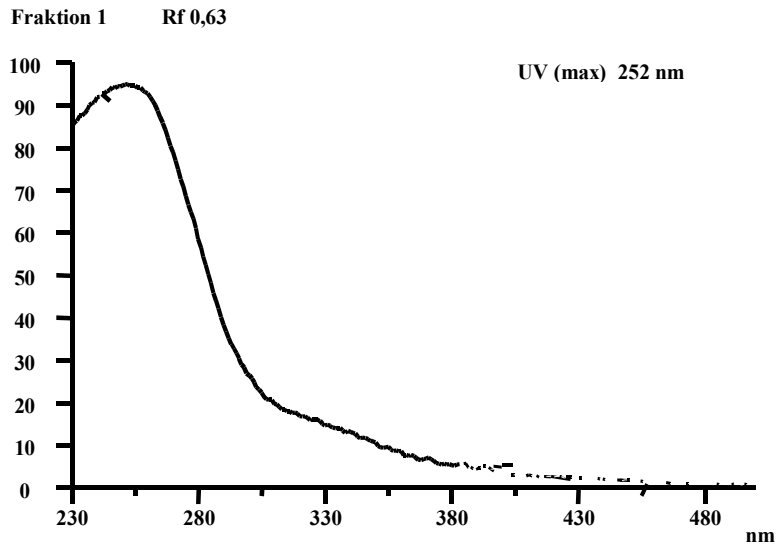


Abb. 32 In-situ UV-Spektrum der DC-Zone bei Rf 0,63 der Fraktion 1 (vgl. Abb. 11: DC des EA-Extraktes)

Die Isolierung der aktiven Bande geschah auf einer präparativen DC an Kiesegelplatten mit einer Schichtdicke von 0,5 mm, da hier gerade noch eine vollständige Bandentrennung gegeben war (vgl. Abschnitt 5.3.1). Die Elution der isolierten Substanz vom Kieselgel erfolgte mit Ether, der anschließend am Rotationsverdampfer vollständig abgezogen wurde. Dieser gesamte Isolierungsvorgang wurde mehrere Male durchgeführt; Auswaagen des Rückstandes nach Vakuumtrocknung ergaben eine Ausbeute der Komponente von max. 0,7 mg pro Isolierung, so dass insgesamt eine Menge von ca. 6 mg Substanz erhalten wurde.

Die gewonnene Substanz wurde in ca. 50 µl Ether wieder aufgenommen und für die HPLC- und LC/MS-Untersuchungen verwendet.

Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Gesamtfraktion 1 (Abbildung 33) und der daraus isolierten DC-Zone bei Rf 0,63 (Abbildung 34) lässt einerseits erkennen, dass es sich bei der Fraktion 1 um eine Multikomponentenmischung von zumindest sechs stärkeren und einer Reihe kleineren Peaks handelt.

Zum anderen erweist sich die daraus isolierte DC-Zone (Rf 0,63) als relativ sauber; sie entspricht maßgeblich der HPLC-Komponente mit der Retentionszeit 12,29 Min. und enthält darüber hinaus noch kleinere Nebenpeaks.

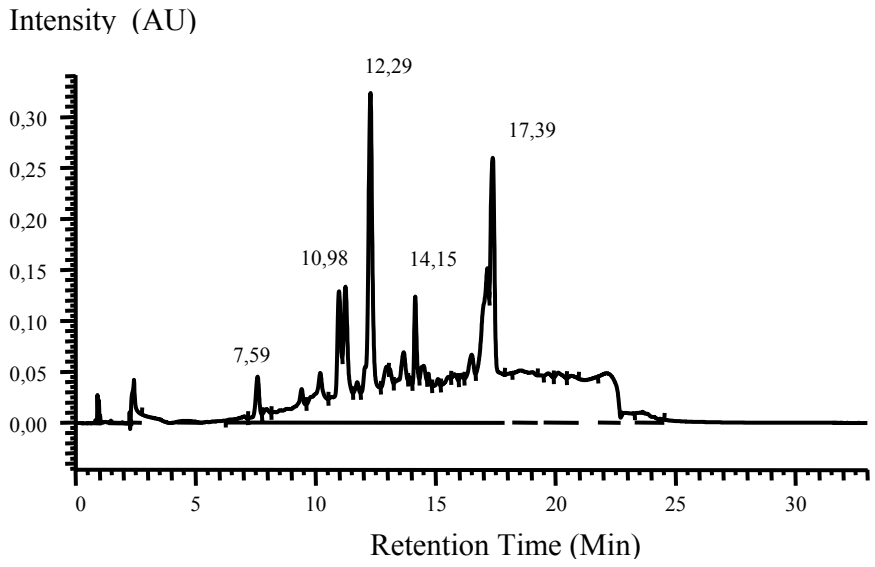


Abb. 33 HPLC-Chromatogramm der Gesamtfraktion F1

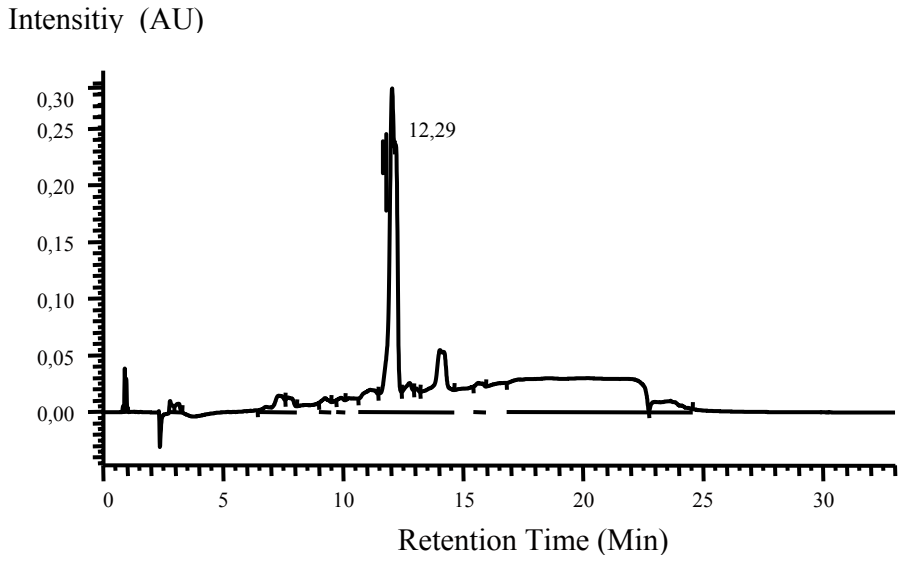


Abb. 34 HPLC-Chromatogramm des Isolates der DC-Zone bei Rf 0,63 (aus Fraktion 1)

Das UV-Spektrum des Hauptpeaks korreliert sehr gut mit dem in-situ-Spektrum, womit gezeigt werden konnte, dass sich die Substanz, zumindest im Bereich ihres Chromophoren, bei dem Vorgang der Isolierung nicht zersetzt oder umlagert.

Dies kann auch durch die übereinstimmende HPLC-Retentionszeit dieser dc-isolierten Komponente mit dem Hauptpeak der Gesamtfraktion als wahrscheinlich angesehen werden.

Die Ergebnisse der HPLC/(ESI)-MS-Analyse der isolierten DC-Zone lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Sowohl das ESI- als auch das APCI-Massenspektrum (Abb. 35/36) des HPLC-Peaks mit der RT 12,29 Min weisen als Basispeak das Ion m/z 233 auf. Dies darf als Quasimolekülion $(M+H)^+$ interpretiert werden unter Hinzuziehung der Ionenspezies m/z 215 $[(M+H)^+ -H_2O]$ und m/z 255 $(M+Na)^+$.

  Die Genese des Fragmentes m/z 215 $[(M+H)^+ -18]$ muss als Sauerstoff-Indikation gedeutet werden, d.h. das Molekül besitzt wenigstens eine O-Funktion, die jedoch trotz der Wasserabspaltung keine Hydroxylfunktion sein muss.

  Das Fragment m/z 205 $[(M+H)^+ -28]$ kann als CO-Verlust oder Ethylenabspaltung gedeutet werden.

  Die Ionenspezies m/z 187 kann unter Berücksichtigung des oben Gesagten entweder aus dem Fragment m/z 215 unter Abspaltung eines Neutralteilchens der Masse 28 entstehen oder aber aus dem Fragment m/z 205 unter Wasserabspaltung. Sollte tatsächlich eine CO-Abspaltung stattgefunden haben, müsste das Molekül zwei Sauerstofffunktionen enthalten.

  Das Ion m/z 366 im ESI-Spektrum ist als Verunreinigung zu werten; ebenso m/z 273 im APCI Spektrum, denn eine denkbare Adduktbildung der Form $[(M+2H)+K]^+$ ist meines Wissens nicht möglich.

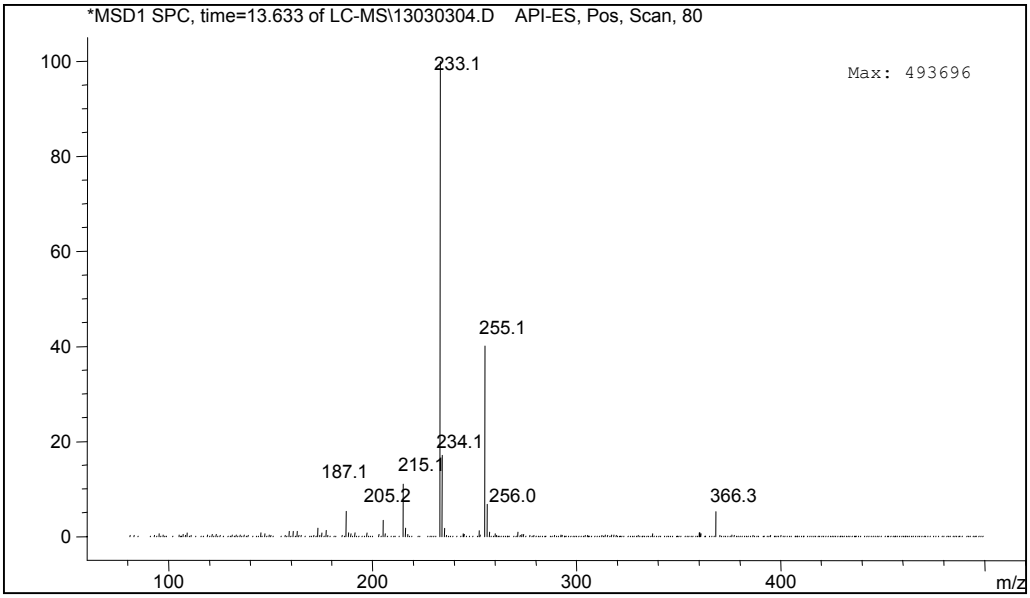


Abb.35 ESI-Massenspektrum des HPLC-Peaks bei RT 12,29 Min (Einzelheiten vgl. Text)

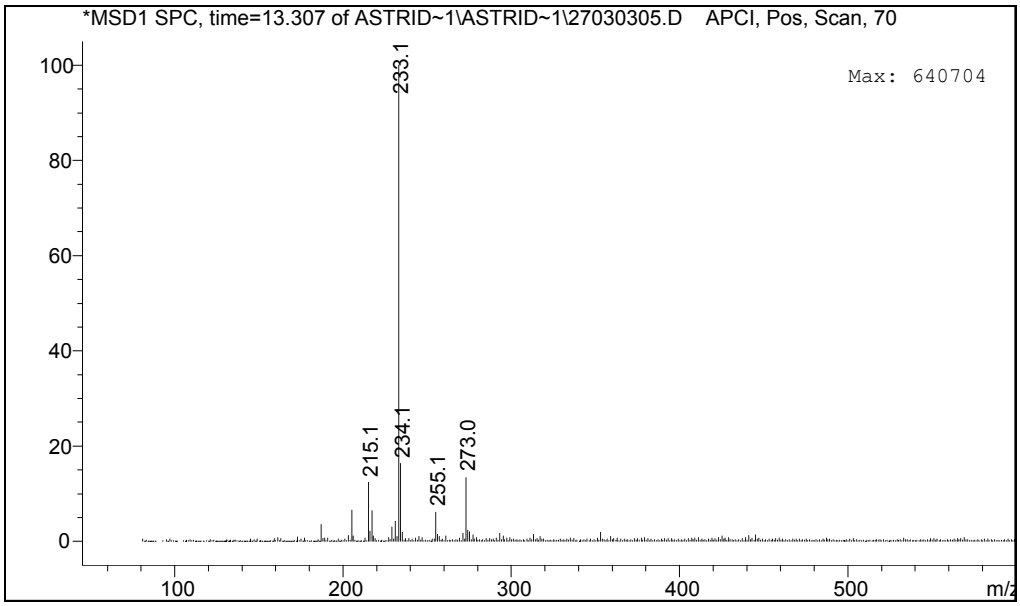


Abb. 36 APCI-Massenspektrum des Peaks bei RT 12,29 Min (Einzelheiten vgl. Text)

- Beim Vergleich des DAD-Chromatogramms der HPLC mit dem entsprechenden ESI-Totalionenstromchromatogramm (TIC) (Abbildung 37) zeigte sich, dass die untersuchte DC-Zone offenbar noch weitere Komponenten enthielt, die keine chromophore Gruppe aufweisen und somit vom Photodiodenarray-Detektor der HPLC nicht erfasst werden.

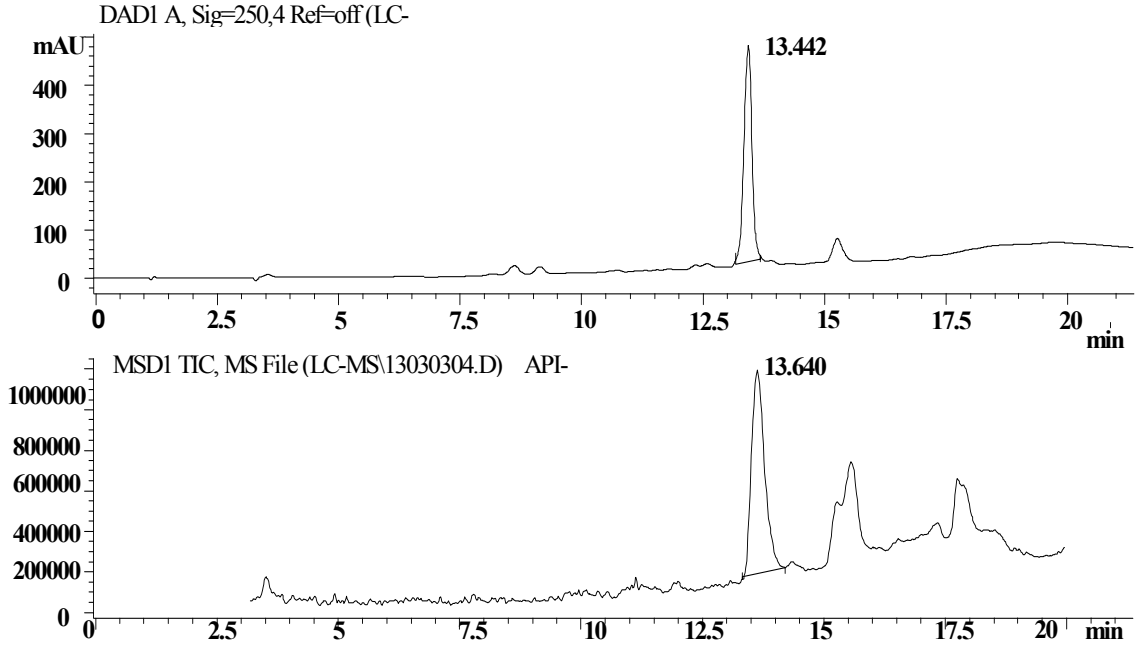


Abb. 37 Vergleich des DAD-Chromatogramms der HPLC mit dem entsprechenden ESI-Totalionenstromchromatogramm (TIC) des Eluates der DC-Zone bei Rf 0,63

Dieser Sachverhalt wurde auch durch das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigt, welches aufgrund dieser Verunreinigungen nicht sicher zu interpretieren war. Da es auf der anderen Seite nicht gelang, die Probe weiter aufzureinigen, da dies Ausbeute über die präparative DC extrem gering war und eine semipräparative HPLC nicht zur Verfügung stand, konnten keine weiteren Strukturinformationen von dieser bioaktiven Komponente erhalten werden.

2.6.2 Extrakt-Fraktion 3

Die säulenchromatografische Fraktion 3 wurde mit 50 ml Elutionsmittel (Gemisch aus 8 Volumenteilen Pentan und 2 Volumenteilen Ethylacetat; vgl. Abschnitt 5.3.2 erzeugt und für weitere Untersuchungen auf 5 ml eingeengt.

Als erstes wurde die Fraktion über die DC mit dem Extraktfließmittel-system getrennt (Abbildung 11) und die dünnschichtchromatografischen Bioassays durchgeführt (Abbildungen 26-31).
Hierbei erwiesen sich ebenfalls mehrere Banden als bioaktiv, interessanterweise handelte es sich bei 2 von 3 Zonen um solche, die auch in Fraktion 1 mit ca. gleichem Rf-Wert Aktivität aufwiesen. Allerdings fehlen diese Banden in Fraktion 2 vollständig, so dass es sich nicht um identische Stoffe handeln kann; evtl. sind sie jedoch strukturell sehr ähnlich, denkbar wären z.B. Diastereomere o.ä..

Die bioaktive Zone der DC mit einem Rf-Wert von 0,63 wurde im Vergleich zur Zone aus Fraktion 1 näher untersucht, wozu zunächst das UV-Spektrum direkt von der DC-Platte mit Hilfe des TLC-Scanners aufgenommen wurde (Abbildung 38).
Diese wies ein Maximum bei 254 nm auf.

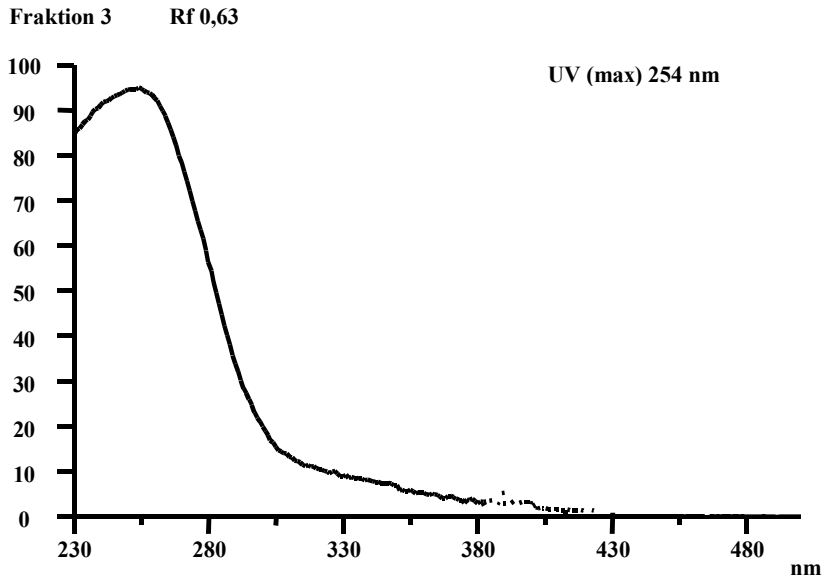


Abb. 38 In-situ UV-Spektrum der DC-Zone bei Rf 0,63 der SC-Fraktion 3

Bei der anschließenden LC-MS-Untersuchung der Fraktion 3 (Abbildung 39) zeigte sich, wie auch in der Fraktion 1 zuvor, dass neben den UV-aktiven Peaks noch eine Reihe weiterer Komponenten in dieser Fraktion enthalten sind, die keine chromophoren Gruppen aufweisen und somit im DAD-Spektrum nicht sichtbar sind.

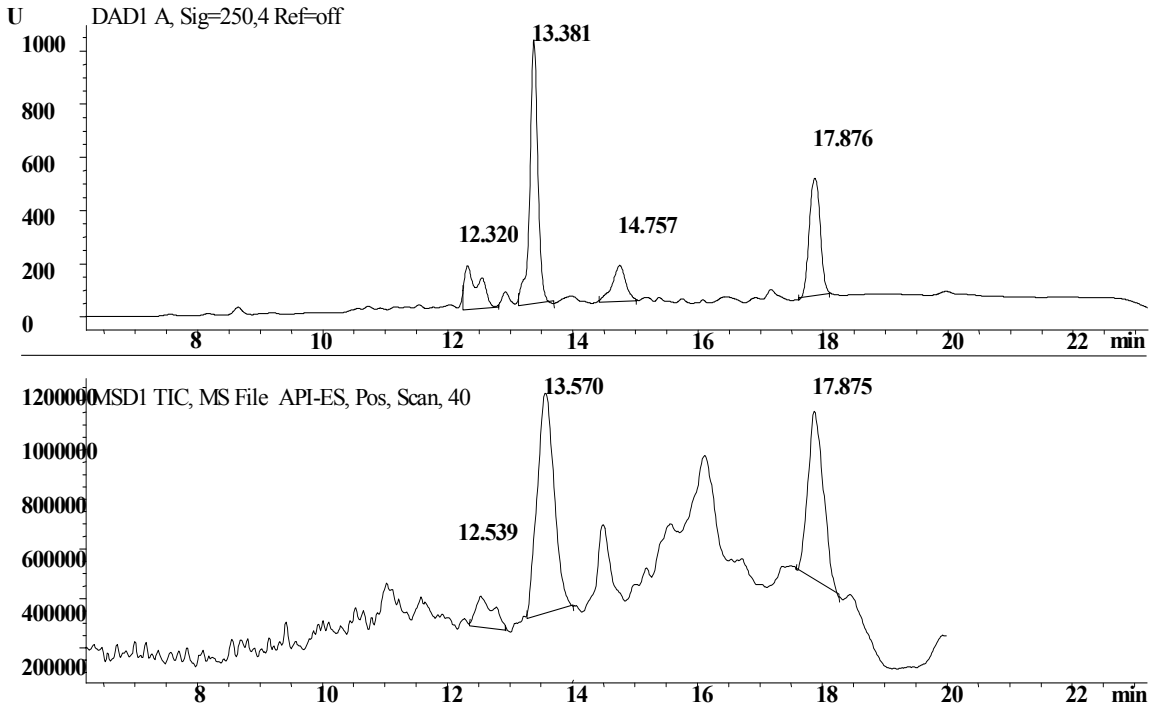


Abb. 39 Vergleich des DAD-Chromatogramms der HPLC mit dem entsprechenden ESI-Totalionenstromchromatogramm (TIC) des Eluates der DC-Zone bei Rf 0,63

Von der Hauptkomponente des HPLC-Chromatogramms bei RT 13,38 Min wurde das DAD-Spektrum aufgenommen (Abbildung 40), dass deutliche Ähnlichkeiten mit dem in-situ-Spektrum der DC-Zone bei Rf 0,63 aufweist.

Auch in dem DAD-Spektrum liegt das Maximum bei 254 nm.

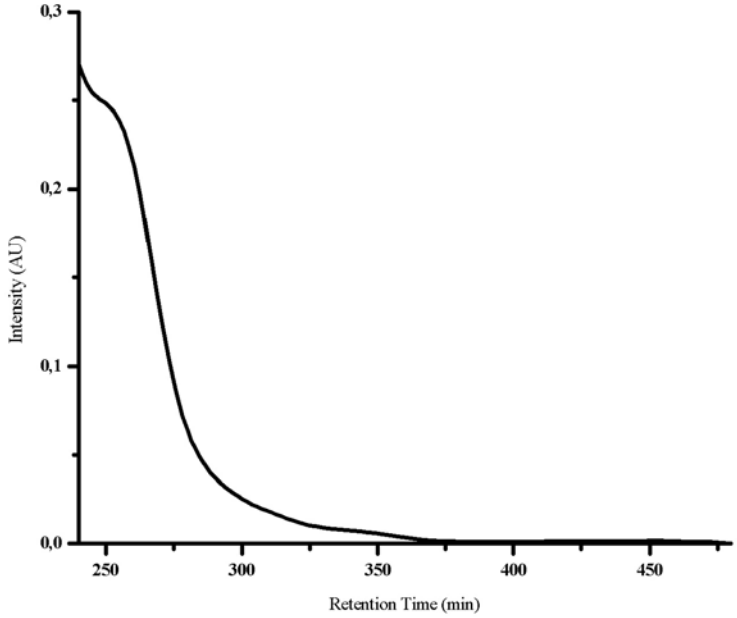


Abb. 40 UV-Spektrum (DAD) des HPLC Peaks bei RT 13,83 Min

Das aus dem HPLC-MS-Run erzeugte ESI-Spektrum des HPLC-Peaks bei RT 13,38 Min (Abbildung 41) lässt sich auf folgende Weise interpretieren: Der Basispeak bei m/z 233 stellt das Quasimolekülion $(M+H)^+$ dar unter Berücksichtigung der Ionenspezies m/z 255 $(M+Na)^+$.

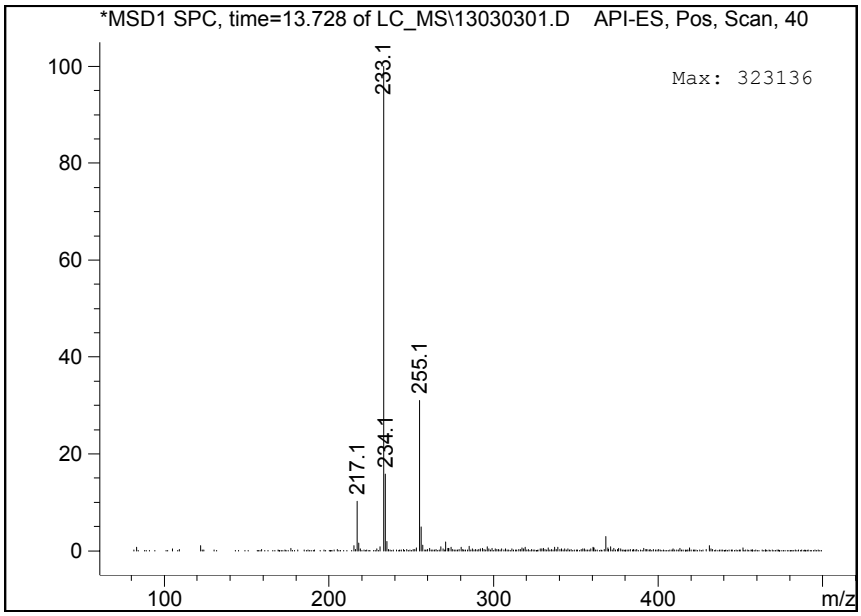


Abb. 41 ESI-MS des HPLC-Peaks bei RT 13,38 Min der SC-Fraktion 3

Das ^{1}H-NMR-Spektrum der aus Fraktion 3 isolierten DC-Zone bei Rf 0,63 ließ aufgrund der Verunreinigungen keine sichere Interpretation zu.
Weitere Isolierungs- und Reinigungsversuche konnten auch hier wegen der sehr geringen Ausbeute (< 0,1 mg) nicht vorgenommen werden, so dass keine Strukturaufklärung der aktiven Komponente dieser Fraktion erfolgen konnte.
Die gesammelten Daten sprechen jedoch dafür, dass es sich bei dieser Substanz um eine strukturell sehr ähnliche Komponente im Vergleich zu der bioaktiven Substanz der SC-Fraktion 1 handeln muss.

2.6.3 Extrakt-Fraktion 5

Zur Herstellung der säulenchromatografischen Fraktion 5 wurde mit 50 ml des Laufmittelgemisches Pentan/Ethylacetat (6:4) eluiert und das Eluat für weitere Untersuchungen am Rotationsverdampfer auf 5 ml eingeengt (vgl. Abschnitt 5.3.2).

Zunächst wurde auch von dieser Lösung ein Dünnschichtchromatogramm aufgenommen (Abbildung 11) und die Bioassays auf der DC-Platte durchgeführt (Abbildung 26-31).
Hierbei stellte sich eine Bande bei Rf 0,32 als besonders bioaktiv bezüglich des Cholinesterase- und DPPH-Tests heraus. Im Bacillus subtilis-Test, sowie im Blutgelatineassay konnte dagegen keine positive Zone in dieser Fraktion ermittelt werden.

Zur Strukturaufklärung wurde als erstes das in-situ-UV-Spektrum mittels des TLC-Scanners aufgenommen (Abbildung 42). Es zeigt drei Schultern, bei 233, 270 und 345 nm, wobei das Maximum bei 233 nm zu finden war.

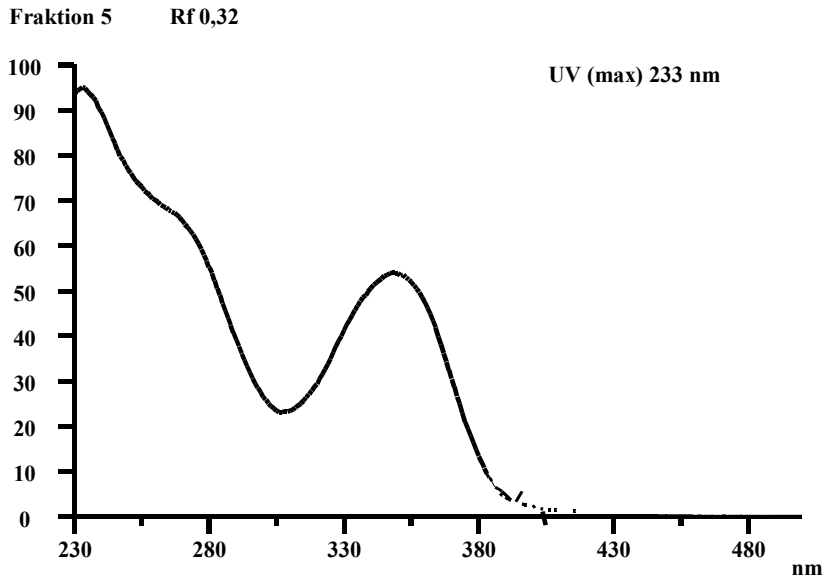


Abb. 42 In-situ UV-Spektrum der DC-Zone bei Rf 0,32 der SC- Fraktion 5

Das HPLC-Chromatogramm der Fraktion 5 zeigte im Gegensatz zur DC, wo bei Anregung zur Eigenfluoreszenz mit Licht von 366 nm 4 bis 5 Banden mit etwa gleicher Intensität sichtbar waren, einen sehr starken Peak bei einer Retentionszeit von 9,15 Min. Daneben sind jedoch auch noch kleine Peaks sichtbar

Es wurde auch hier der Standardgradient, welcher mit dem HTS kompatibel ist, gefahren.

Zur Absicherung, ob es sich bei diesem Peak um die gesuchte, bioaktive Substanz von der DC handelt und zur Substanzgewinnung für eine Strukturaufklärung, wurde die DC-Zone bei Rf 0,32 über eine semipräparative Dünnschichtplatte mit Schichtdicke 0,5 mm isoliert.

Die Ausbeute der einzelnen Isolierungen betrug zwischen 0,2 und 0,7 mg. Bezogen auf eine Frisch-pilzeinwaage von 50,0 g für die Extraktion also

zwischen 0,0004 und 0,0014%. Insgesamt wurden auf diese Weise 15 mg Substanz erhalten.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Verbindung, sowie zum Nachweis, ob es sich bei dem Hauptpeak der HPLC um die gesuchte Komponente handelt, wurde die gelbliche Substanz in 0,5 ml Ether gelöst (gelb gefärbte Lösung).
Ihr HPLC-Chromatogramm wies nur noch eine Komponente bei einer Retentionszeit von 9,15 Min auf (Abbildung 43).

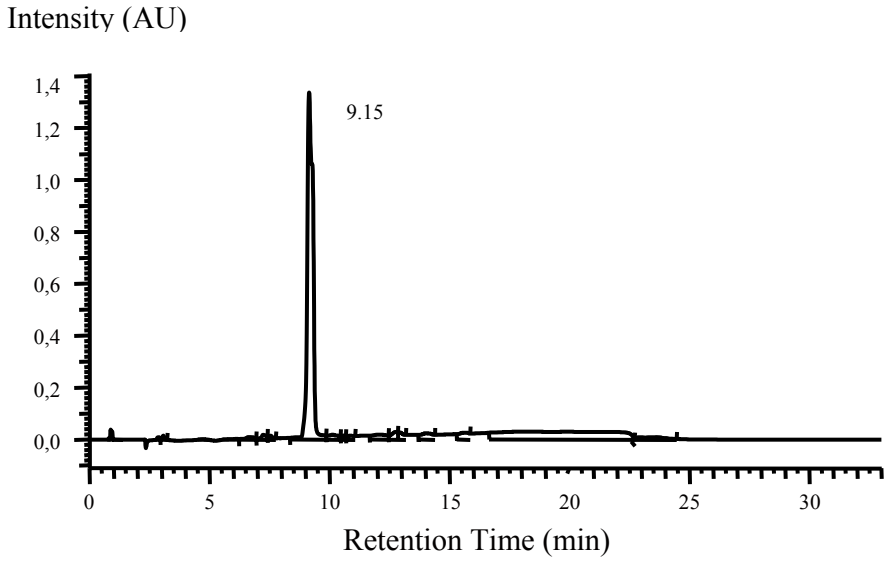


Abb. 43 HPLC-Chromatogramm des DC-Isolates der Fraktion 5 bei Rf 0,32

Das DAD-UV-Spektrum dieses Peaks (Abbildung 44) zeigt ebenso wie das in-situ-Spektrum drei Schultern dessen Maxima bei 233, 270 und 345 nm miteinander vergleichbar sind.

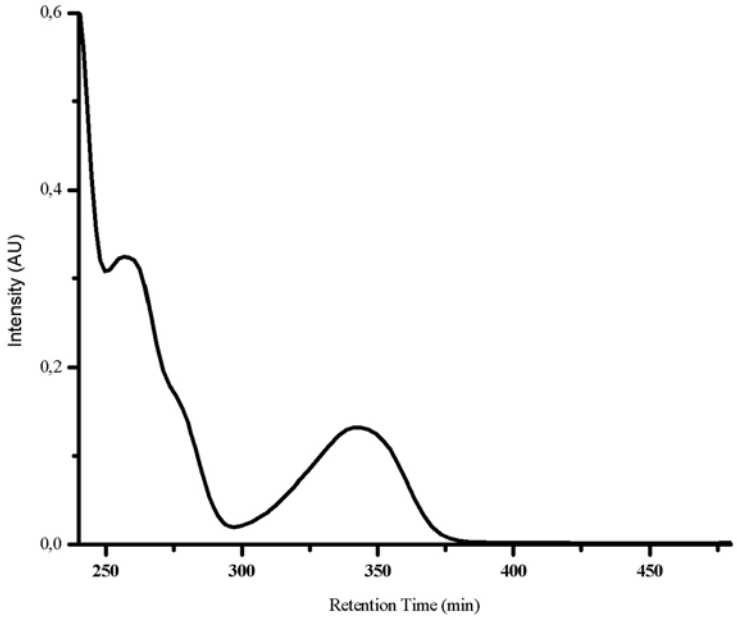


Abb. 44 DAD-UV-Spektrum des HPLC-Peaks bei RT 9,15 Min

Auch der Gesamthabitus der beiden Spektren stimmt überein; dass das Festphasenspektrum der DC-Zone weniger fein strukturiert ist gegenüber dem Lösungsspektrum wird aus der Theorie solcher Elektronenanregungsspektren verständlich.

Diese UV-Spektrenübereinstimmung, sowie die Übereinstimmung der Retentionszeit des Hauptpeaks im HPLC-Chromatogramm mit dem Peak der über die DC isolierten Substanz, kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die HPLC-Hauptkomponente der bioaktiven Struktur der DC-Zone mit Rf 0,32 entspricht.

Aufgrund der UV-spektroskopischen Ergebnisse kann man folgern, dass das Molekül π- bzw. ggf. auch n-Elektronenzustände besitzen muss, d.h. Doppelbindungen bzw. auch Heteroatome mit einsamen Elektronenpaaren. Das längstwellige Maximum bei 345 nm schließt das Vorliegen eines langen konjugierten oder polyzyklischen aromatischen Chromophors aus und deutet auf die Existenz von etwa 4-5 konjugierten Einheiten hin.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden von der isolierten Verbindung Massenspektren mit unterschiedlichen Techniken aufgenommen.
Das HPLC/(ESI)-MS-Spektrum wird dominiert durch die Ionenspezies m/z 275 (100%), die auch im APCI-Spektrum als Basispeak fungiert.
Die Vermutung, dass es sich hierbei um das Quasimolekülion $(M+H)^+$ der isolierten Komponente handelt, wird unterstützt durch das im ESI-Spektrum auftretende Ion m/z 297 (Int. 5%), welches als $(M+Na)^+$ interpretiert werden kann.
Daneben zeigen beide Spektren noch eine Reihe kleinerer Ionen (meist mit Int. < 20%), die auf Verunreinigungen unklarer Herkunft hindeuten, wobei auch die Mitisolierung einer unterlagernden Komponente nicht ausgeschlossen werden kann und eine sichere Interpretation möglicher Fragmente der Substanz MW 274 im ESI-Spektrum nicht zulassen.
Zur Ermittlung der Summenformel wurde die isolierte Zone in Form einer Methanol/Wasser-Lösung über Direktinjektion (mittels Spritze) in das MS eingeführt und eine Massenfeinbestimmung des Quasimolekülions m/z 275 $[(M+H)^+]$ im ESI-Modus (positiv) bei verschiedenen Auflösungen (R=4600, 9000, 11000) durchgeführt.
Dabei zeigte sich, dass der Vorteil der hohen Auflösung zwar darin lag, dass Störionen am Fuß des Messpeaks besser aufgetrennt wurden, d.h. eine exaktere Massenfeinbestimmung möglich war. Auf der anderen Seite

resultierte daraus jedoch eine entsprechend reduzierte Empfindlichkeit, d.h. ein deutlich verschlechtertes Signal/Rauschverhältnis, so dass die besseren Messwerte letztlich bei niedriger Auflösung erhalten wurden.

Bei R=4600 ergab sich für m/z 275.0915 eine Summenformel von $C_{15}H_{15}O_5$ mit einer Abweichung von $\triangle$= 1,63019 ppm als besten sinnvollen Vorschlag.

Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch eine massenspektrometrische Messung in Hochauflösung, wobei die Probe über den Direkteinlass in das MS eingeführt und verdampft wurde.

Für das Molekülion m/z 274.28 ergab sich eine Summenformel von $C_{15}H_{14}O_5$ mit einer Abweichung von –0,4 Millimassen (mmu).

Damit besitzt die Verbindung neun Doppelbindungsäquivalente (Doppel- bzw. Dreifachbindungen, Ringe).

Weitere Strukturinformationen lassen sich aus der Massenfeinbestimmung der Fragmente m/z 246 ($C_{14}H_{14}O_4$) und m/z 229 ($C_{14}H_{13}O_3$) ableiten (vgl. Abbildung 45).

Die Abspaltung von CO aus dem Molekülion (M^+ - 28 → m/z 246) wird bei zahlreichen sauerstoffhaltigen Substanzgruppen (Aldehyden, Chinonen, ungesättigten Lactonen, Phenolen u.a.) beobachtet; die hohe Intensität des Molekülions (Basispeaks) engt die Strukturauswahl ein und lässt ein – wahrscheinlich multi- cyclisches System vermuten.

In diesem Fall muss auch die Möglichkeit der CO-Abspaltung aus O-Heterocylen oder ungesättigten cyclischen Ketonen in Betracht gezogen werden.

Interessant erscheint die Abspaltung von $–CHO_2$ aus dem Molekülion (M^+ - 45), die zu einem starken Fragment m/z 229 führt . Eine derartige Abspaltung wird nur bei wenigen Substanzgruppen beobachtet und ist insbesondere bei Carbonsäuren und Lactonen bekannt.

In diesem Zusammenhang könnte das Bruchstück m/z 228 (M^+ – 46) durch eine sukzessive Abspaltung von CO und H_2O erklärt werden, welche z.B. bei Carbonsäuren nachgewiesen wurde

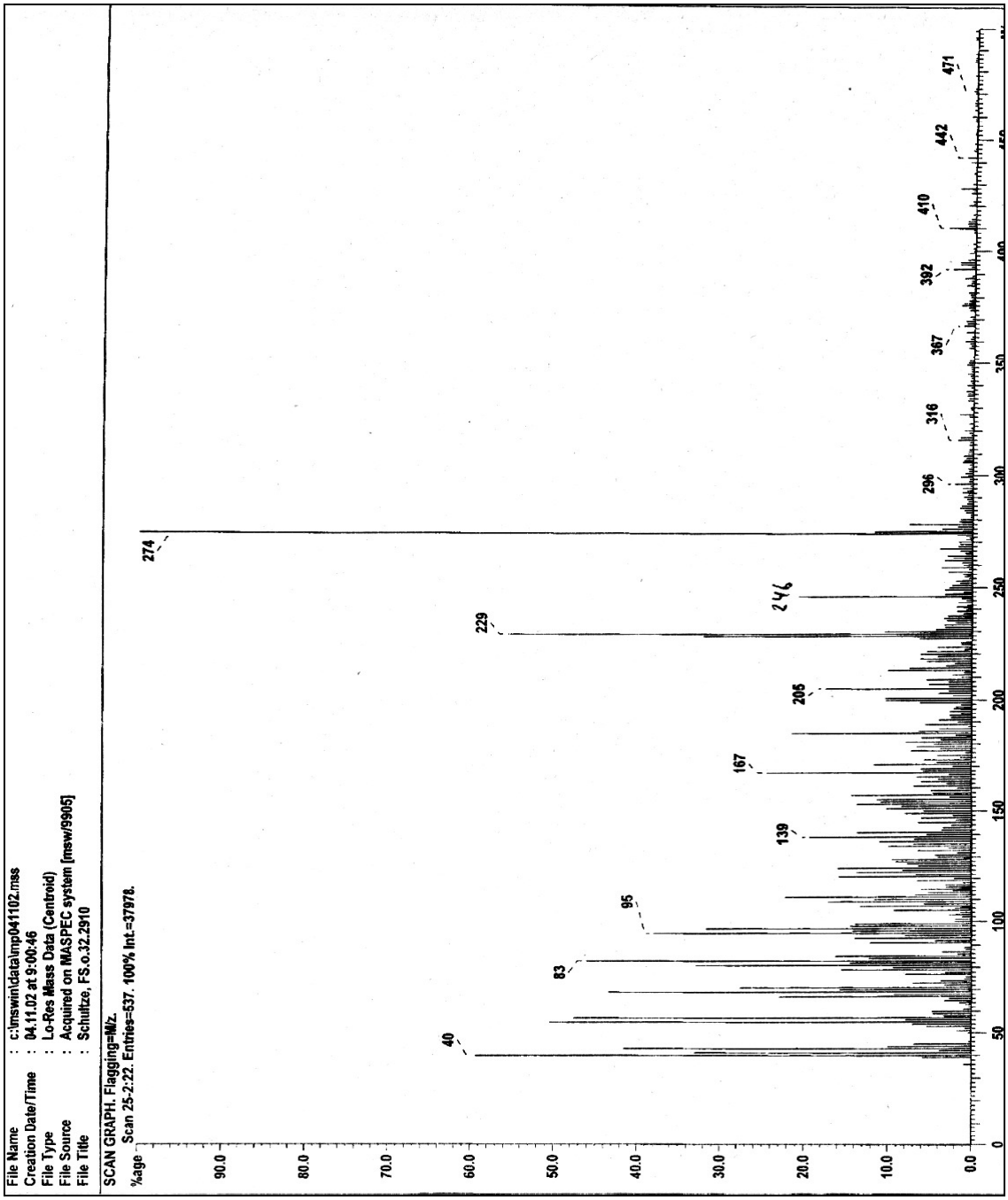


Abb. 45 EI-Spektrum der dc-isolierten Substanz bei Rf 0,32 der SC-Fraktion 5

Zur weiteren Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse wurden MS/MS-Experimente mittels Direkteinlass mit einer Spritze im ESI-Modus durchgeführt, die uns weitere Strukturinformationen lieferten:

- Das MS^2-Experiment auf dem Quasimolekülion m/z 275 $(M+H)^+$ ergibt als einziges Fragment m/z 229 (Abspaltung von 46 Masseneinheiten).

  Da die Vebindung keinen Schwefel oder Stickstoff enthält, wie die oben erläuterten Hochauflösungsmessungen zeigen konnten, und nach dem Spektrenhabitus ein langkettiger primärer Alkohol auszuschließen ist, sind als Formeln für das Teilchen der Masse 46 nur noch C_2H_5OH und CH_2O_2 (H_2O + CO) als wahrscheinlich anzusehen.

  Nach unserer Auffassung darf dieser Fragmentierungsprozess in Analogie zur EI-Fragmentierung (m/z 275 - CH_2O_2 → m/z 229) interpretiert werden, wobei die HR-Daten die Abspaltung einer Carboxylgruppe aus dem Molekülion belegen.

  In Anlehnung an diese EI-Fragmentierung mit M^+-CH_2O_2 darf im vorliegenden Fall die Abspaltung eines Teilchens der Massenzahl 46 aus dem Quasimolekülion (m/z 275) im ESI-Spektrum als (H_2O + CO) interpretiert werden. Ein derartiger Prozeß wird bei bestimmten cyclischen, substituierten Carbonsäuren beobachtet, und es muss angenommen werden, dass die untersuchte Verbindung eine derartige Partialstruktur enthält.

- Die Stoßaktivierung des Ions m/z 229 im MS^3-Experiment induziert die Bildung folgender Fragmente mit einer Intensität > 15% (Abbildung 46):
  - m/z 214 (m/z 229 - CH_3)
  - m/z 211 (m/z 229 - H_2O)
  - m/z 201 (m/z 229 - 28, Basispeak)
  - m/z 185 (m/z 229 - 44).

  Zur Interpretation dieser Ionen ist folgendes anzumerken:
  - m/z 214 wird durch Abspaltung von CH_3 hervorgerufen, wobei prinzipiell das Ausgangsion nicht zwangsläufig eine Methylgruppe enthalten muss, da diese oft erst im Zuge der Verschiebung eines H-Atoms gebildet wird.

    In diesem Fall ist das Vorliegen einer Methylgruppe aber sehr wahrscheinlich, da hier der seltene Fall vorliegt, dass aus einem geradelektronischen Teilchen durch Abspaltung eines CH_3-Radikals ein ungeradelektronisches Fragment entstanden ist.

    Dies lässt sich nur durch eine sehr hohe Stabilisierung des anderen freien Elektrons, etwa durch ein oder mehrere Doppelbindungen, erklären.
  - m/z 211 wird durch Wasserabspaltung erzeugt und ist als O-Indikator zu interpretieren, d.h. nicht nur Hydroxy-Verbindungen, sondern auch andere O-haltige Komponenten (Ketone, Aldehyde, Ether u.ä.) können H_2O eliminieren.
  - m/z 201, der Basispeak, wird durch Abspaltung eines Teilchens der Masse 28 hervorgerufen. Dies kann C_2H_4 sein, welches relativ unspezifisch ist und bei einer ganzen Reihe von Verbindungsgruppen beobachtet wird.

Die relativ hohe Sauerstoffanzahl (5) im Molekül lässt allerdings die Eliminierung von CO wahrscheinlicher sein. Dieser Prozess tritt bei cyclischen Systemen insbsondere bei O-Heterocyclen, ungesättigten Lactonen, Chinonen und Phenolen auf.

- m/z 185 ist durch Abspaltung eines Neutralteilchens der Masse 44 entstanden. Als C_2H_4O wird ein solches Teilchen z.B. bei der Fragmentierung von Cycloalkanolen und cyclischen Ethern beobachtet, eine Nominalmasse von 44 besitzt jedoch auch CO_2 . Dessen Eliminierung stellt bei Anhydriden und cyclischen Carbonsäuren einen charakteristischen Zerfallsprozeß dar.

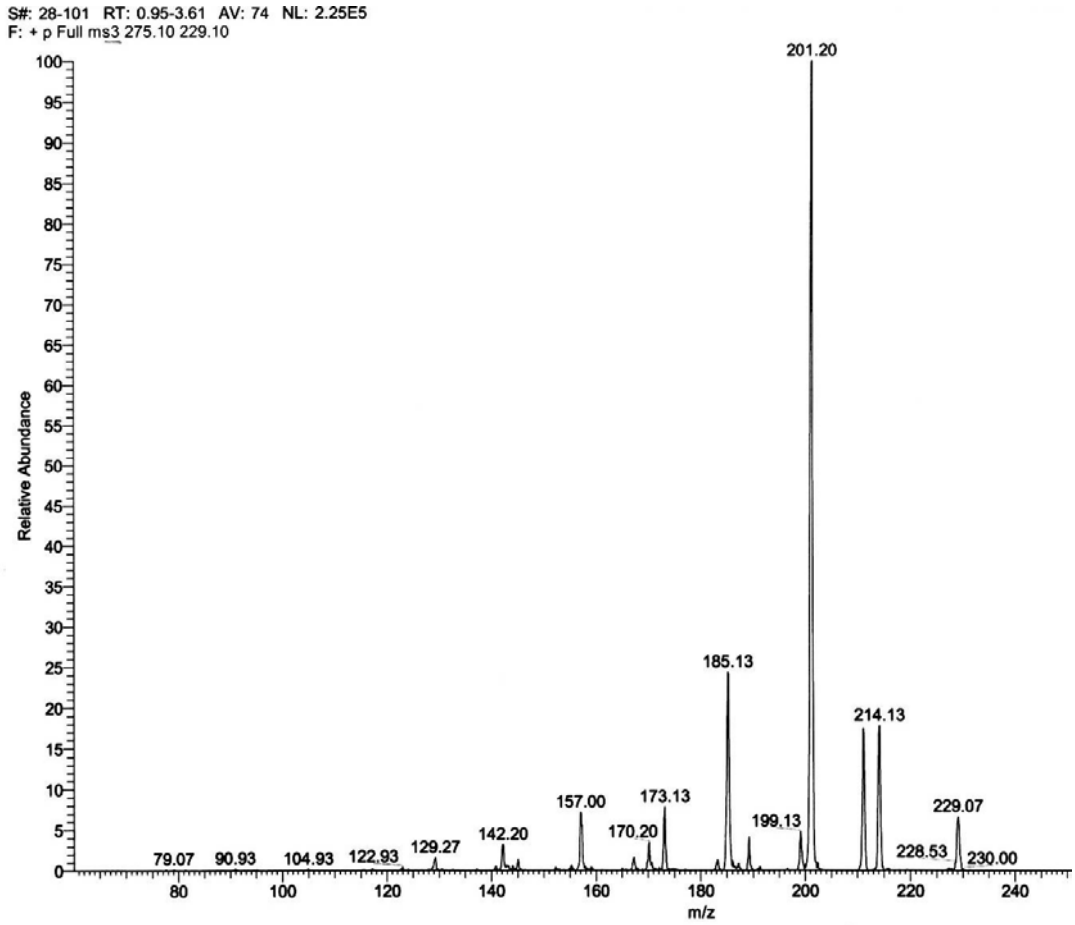


Abb. 46 MS^3-Experiment der DC-isolierten Substanz bei Rf 0,32 der SC-Fraktion 5 des EA-Extraktes von *Heterobasidion annosum* (Einzelheiten vgl. Text)

- Die Stoßaktivierung des Ions m/z 201 im MS^4-Experiment induziert die Bildung folgender Spaltstücke mit einer Intensität > 15% (Abbildung 47):
  - m/z 186 (m/z 201 - CH_3)
  - m/z 183 (m/z 201 - H_2O)
  - m/z 173 (m/z 201 - 28)
  - m/z 158 (m/z 201 - 43)
  - m/z 145 (m/z 201 - 56)

  Bezüglich der Abspaltung von $–CH_3$, H_2O und m/z 28 sei auf die entsprechende Diskussion bei dem MS^3-Experiment verwiesen. Da keine Hochauflösungsdaten vorliegen und die Massendifferenzen von m/z 43 und 56 vieldeutig sind, kann über die Zusammensetzung dieser Teilchen nur spekuliert werden.

  Aus den bisherigen Experimenten ergibt sich, dass bei der Genese des Teilchens m/z 201 mindestens zwei, wahrscheinlich aber drei Sauerstofffunktionen eliminiert worden sind.

  Entsprechend der durch Hochauflösungsdaten determinierten Summenformel $C_{15}H_{14}O_5$ für diese Verbindung muss das Fragment m/z 201 dann noch zwei weitere O-Funktionen enthalten.

  Indiz dafür ist einmal das Ion m/z 183 (Abspaltung von H_2O), zum anderen sind die Spezies m/z 173 (Abspaltung eines Teilchens der Masse 28) und m/z 145 (Eliminierung von m/z 56) sauerstoffverdächtig.

  Eine Abspaltung von m/z 43 bedeutet, dass aus einem geradelektronischen Teilchen (m/z 201) ein ungeradelektronisches Ion entsteht. Dies ist ein energetisch sehr ungünstiger Prozess und erfordert eine sehr gute Stabilisierung zumindest eines

Radikalpartners etwa durch ein π-Elektronensystem bzw. durch ein tertiäres oder quartäres C-Zentrum o.ä.

Die bisherige Fragmentierung des Moleküls, es wurde in diesem Zusammenhang bereits auf die Abspaltung eines CH_3-Radikals eingegangen, legt den Verdacht nahe, dass m/z 43 als Eliminierungung von CO und eben eines Methylradikals (bzw. umgekehrt) zu interpretieren ist und m/z 145 damit aus m/z 186 bzw. 183 generiert wird.

Auch die Abspaltung von m/z 56 ist nicht sicher zu interpretieren; bei bestimmten cyclischen Systemen (z.B. Cyclohexenen, Tetraline) wird ein Teilchen dieser Masse als C_4H_8 eliminiert; bei anderen (Methylcyclohexenone, β- Tetralone) als C_3H_4O. Bei ungesättigten Lactonen wird die Eliminierung als C_2O_2 beobachtet.

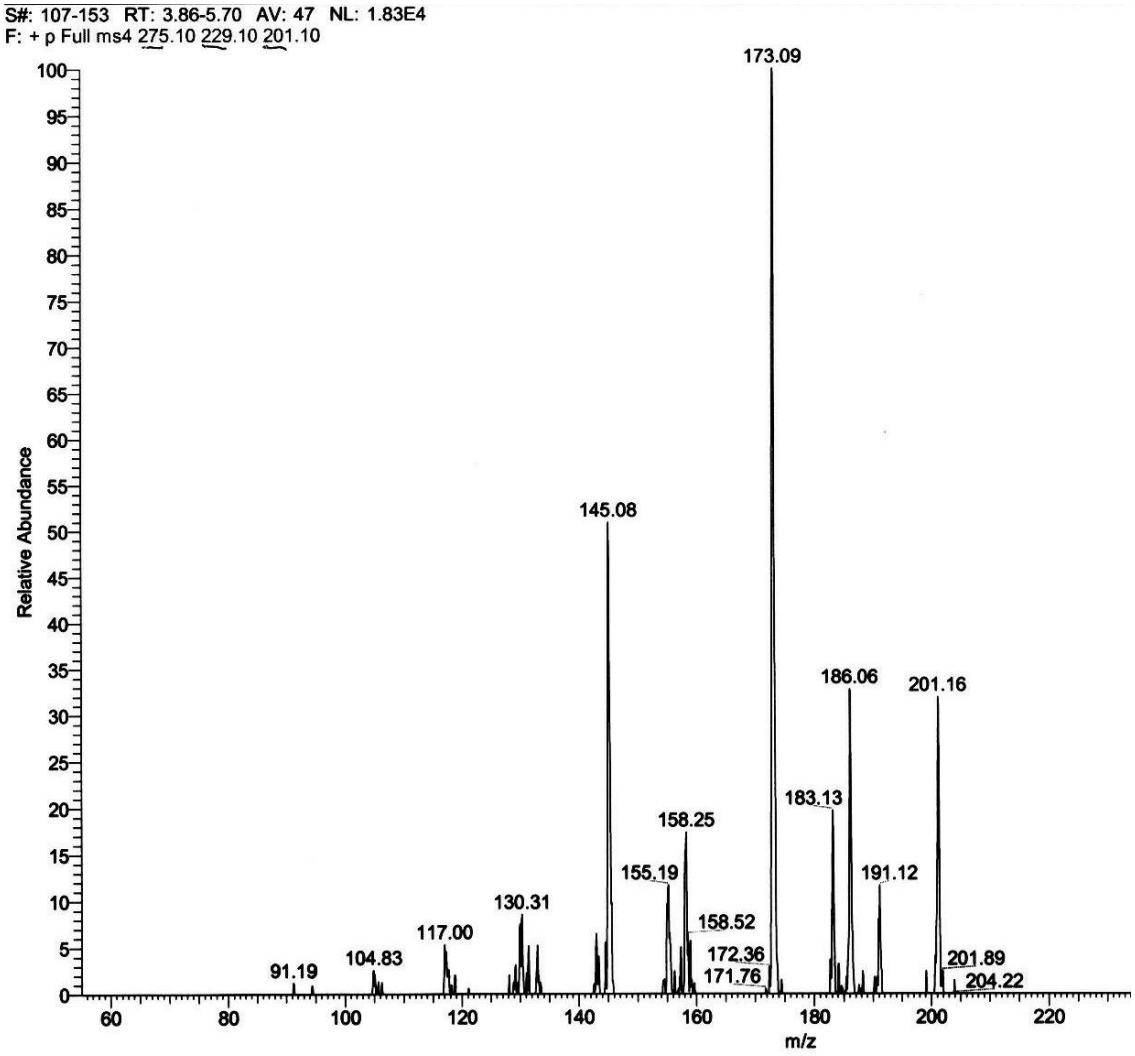


Abb. 47 MS^4-Experiment der DC-isolierten Substanz bei Rf 0,32 der SC-Fraktion 5 des EA-Extraktes von *Heterobasidion annosum*

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Das Molekulargewicht ist 274; die Hochauflösungsmessungen (EI und ESI) ergaben eine Summenformel von $C_{15}H_{14}O_5$, d.h. die Verbindung besitzt neun Doppelbindungsäquivalente.
- Die Intensitätsverteilung der Ionen im EI-Spektrum (mit den Molekülion als Basispeak) deutet auf ein multicyclisches System ohne längerkettige Substituenten hin.
- Die Abspaltung von CHO_2 aus dem Molekülion als dominierender Fragmentationsprozess unter Elektronenstoßionisation sowie vermutlich CO und H_2O deutet auf eine cyclische Carbonsäure und/oder eine Lacton-Gruppierung hin.

Diese Interpretation wird durch entsprechende Spaltprodukte der MS/MS-Experimente unterstützt. In diesem Zusammenhang sind wiederholte Abspaltungen von Teilchen der Nominalmasse 28 bei konsekutiven MS/MS-Experimenten mit hoher Wahrscheinlichkeit als CO zu deuten und solche der Masse 44 als CO_2. Dies legt zumindest die Existenz eines O-Heterocyclus von Lacton- oder Anhydridstruktur nahe.

Die Stoßaktivierung des Ions m/z 229 im MS^3-Experiment belegt die Existenz einer CH_3-Funktion in Nachbarschaft zu einem π-Elektronensystem, d.h. neben einer Carboxylfunktion kann damit ein zweiter Substituent an dem cyclischen System als gesichert angenommen werden.

Im Anschluss an die massenspektrometrischen Untersuchungen folgten NMR-spektroskopische Analysen der aus der Fraktion 5 isolierten, bioaktiven DC-Zone.

Bei der Analyse des ^{13}C-NMR-Spektrums fiel uns eine große Übereinstimmung der δ-Werte und Multiplizitäten von 10 C-Atomen mit den in der Literatur [56] angegebenen NMR-Daten eines als 9-Hydroxy-5-methyl-2-benzopyran-1(6H)-on bezeichneten Grundgerüstes (Isocumarinsystem) auf.

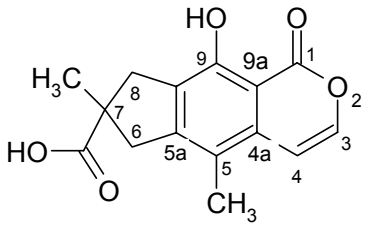
Diese Partialstruktur tritt in verschiedenen Verbindungen auf, die von Heterobasidion annosum in Kulturen gebildet werden [52].

Eine dieser Substanzen wies zudem das gleiche Molekulargewicht (MW 274) und die gleiche Summenformel ($C_{15}H_{14}O_{15}$) auf wie die von uns aus dem Pilz isolierte Komponente.

Diese Verbindung trägt den Trivialnamen *Fomajorin S* und nach [52] die chemische Bezeichnung 1,6,7,8-Tetrahydro-9-hydroxy-5,7,-diemthyl-1-oxocyclopenta[g]-2-benzopyran-7-carboxylic acid.

Diese Bezeichnung ist nach unserer Auffassung falsch, der korrekte Name muss lauten: *1,6,7,8-Tetrahydro-9-hydroxy-5,7-dimethyl-1-oxocyclopenta[g]-2-benzopyran-1(6H)-one-7-carboxylic acid.*

Sie zeigt folgende Struktur:



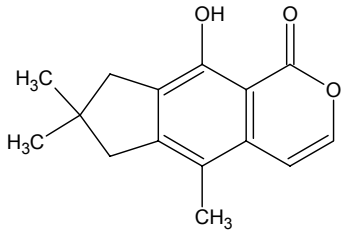
Diese Verbindung lässt sich in den CA weder unter dem Namen noch der Formel auffinden.

Mit Ausnahme der Angabe dreier IR-Banden [59] gibt es über diese Verbindung in der Literatur auch keine weiteren spektroskopischen Daten. Es wurden deshalb die Autoren, die diese Struktur 1982/1989 publiziert haben, angeschrieben, doch selbst der Hauptautor konnte keine spektroskopischen Daten mehr über diese Verbindung zur Verfügung stellen.

Die Struktur dieser Verbindung musste deshalb durch eine detaillierte NMR-Untersuchung abgeleitet werden. Im einzelnen wurden folgende Spektren ausgewertet:

^{1}H; ^{13}C; $^{1}H,^{1}H$-COSY; $^{1}H,^{13}C$-COSY in Form des HMQC- und HMBC-Verfahrens; NOESY.

In diesem Zusammenhang war es hilfreich, dass in der Literatur NMR-Daten (^{13}C- und ^{1}H-NMR) von folgender sehr ähnlicher Verbindung mit gleichem Grundgerüst [56] existieren, die als *Fomajorin D* oder *7,8-Dihydro-9-hydroxy-5,7,7-trimethyl-cyclopenta[g]-2-benzopyran-1(6H)-on* bezeichnet wird:



Diese Verbindung hat das Molekulargewicht MW 244 und eine Summenformel von $C_{15}H_{16}O_3$, damit beläuft sich die Anzahl an Doppelbindungsäquivalenten auf 8. Der Unterschied zum Fomajorin S besteht lediglich im Ersatz der Carboxylfunktion an C-7 durch eine Methylgruppe.

Die Ergebnisse der NMR-Analyse der von uns aus Heterobasidion annosum isolierten Komponente sind - im Vergleich zu den NMR-Daten

der in der Literatur beschriebenen Trimethyl -Verbindung- in Tabelle 4 zusammengestellt.

Nr	C-Atom	^{13}C-NMR / $CDCl_3$ [56]	^{13}C-NMR / DMSO	Struktur-element	^{1}H-NMR-Korrelation	^{1}H-NMR / $CDCl_3$ [56]
1	Methyl an C-5	14.2 q	13,81	$-CH_3$	3 H (2.23 ppm; s)	3 H (2.23 ppm)
2	Methyl an C-7	29.1 q	25.01	$-CH_3$	3 H (1.34 ppm , s)	6 H (1.19 ppm)
3	C-8*	48.0 t	40.11	$-CH_2-$	1 H (2.81 ppm; d; $^{2}J8_{a,b}$=16.5 Hz) 1 H (3.35 ppm; d; $^{2}J8_{a,b}$=16.8 Hz)	2 H (2.80 ppm; d)
4	C-6*	43.7 t	43.70	$-CH_2-$	1 H (2.89 ppm; d; $^{2}J6_{a,b}$=17.3 Hz) 1 H (3.44 ppm; d; $^{2}J6_{a,b}$=17.3 Hz)	2 H (2.78 ppm; dd; J=0,8+0,3)
5	C-7	39.5 s	48.24	=C<	-	-
6	C-4	105.4	105.16	=CH-	1 H (6.88 ppm; d; $^{3}J_{3,4}$ cis =6 Hz)	1 H (6.62 ppm; d; J=6 + 0.8 Hz; longrange «trans «
7	C-9a	105.9	105.26	=C<	-	-
8	C-5	119.1	119.32	=C<	-	-
9	C-8a	129.3	126.50	=C<	-	-
10	C-4a	133.3	133.52	=C<	-	-

Nr	C-Atom	^{13}C-NMR / $CDCl_3$ [56]	^{13}C-NMR / DMSO	Struktur-element	^{1}H-NMR-Korrelation	^{1}H-NMR / $CDCl_3$ [56]
11	C-3	142.5	143.80	=CH-	1 H (7.54 ppm; d; $^{3}J_{3,4}$ (cis) =6 Hz)	1 H (7.18 ppm; d; J=6 + 0,3 Hz; longrange; «trans «
12	C-5a	154.1	152.37	=C<	-	-
13	C-9	155.9	154.50	=C<	-	-
14	C-1	166.9	160.21	O=C<	-	-
15	Carboxyl an C-7	-	178.0	-COOH	-	-

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der NMR-Untersuchungen [^{1}H; ^{13}C; ^{1}H,^{1}H-COSY; ^{13}C,^{1}H-COSY (HMQC und HMBC); NOESY] der isolierten Pilzkomponente; zum Vergleich sind die NMR-Daten (aus [56]) einer Substanz mit gleichem Grundgerüst aber anderer Substitution aufgeführt (Spalte 2 und 6; Einzelheiten vgl. Text). Die Hydroxylprotonen sind nicht aufgeführt.
(* Zuordnung gesichert durch NOESY-Experiment)

Dabei ist zu beachten, dass den Literaturangaben $CDCl_3$ als Lösungsmittel zugrunde liegt, während unsere Messungen in DMSO durchgeführt werden mussten.

Als Ergebnis unserer detaillierten NMR-Analyse ist festzuhalten, dass die von uns isolierte Komponente identisch ist mit Fomajorin S, die damit erstmalig in dem wildwachsenden Pilz nachgewiesen worden ist.

Als Basis der Strukturaufklärung diente einerseits die durch hochauflösende Massenspektrometrie determinierten Summenformel $C_{15}H_{14}O_5$ (MW 274) und die sich daraus ergebende Anzahl von neun Doppelbindungsäquivalenten sowie zum anderen die aus dem ^{13}C- und dem ^{1}H, ^{13}C-COSY-NMR-Spektren determinierte Position und Multiplizität der einzelnen C-Atome.
Im einzelnen sollen einige, im Rahmen dieser Strukturaufklärung aufgetretenen Punkte kurz diskutiert werden (vgl. dazu Tab. 4 und Abb. 48).

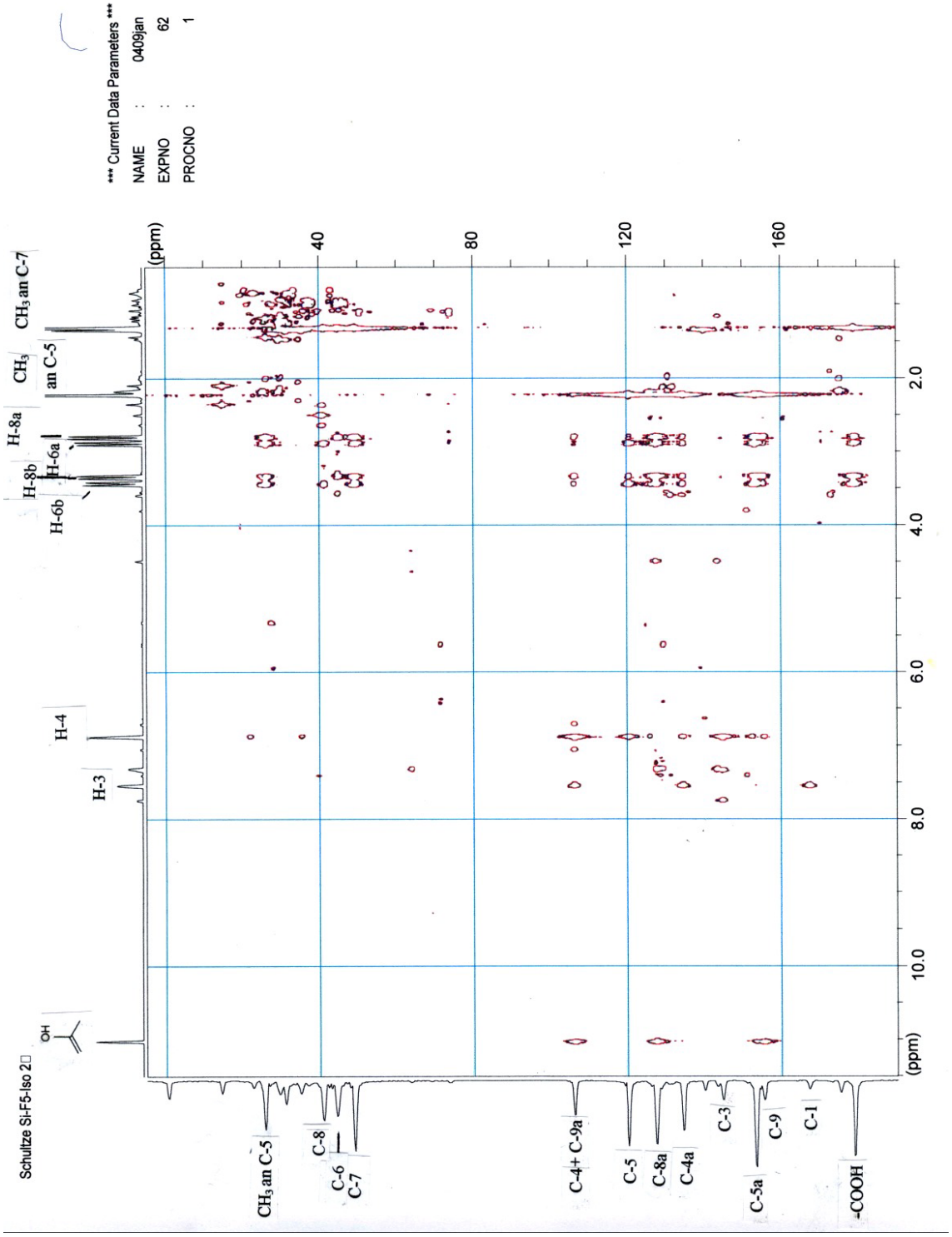


Abb. 48 Zweidimensionales $^{1}H,^{13}C$-korreliertes NMR-Spektrum (HMBC) der aus *Heterobasidion annosum* isolierten bioaktiven Komponente F5 DC Rf 0,32 (Fomajorin S); Einzelheiten vgl. Text. Die von einer Verunreinigung stammenden Störsignale ließen sich als solche mittels verschiedener NMR-Techniken erkennen; sie tragen in der Abbildung keine Kennzeichnung.

1. Zunächst seien einige Fehler der Literatur-NMR-Daten [56] des Fomajorin D, die zum Vergleich herangezogen wurden, korrigiert:
   - die $^{1}H,^{1}H$-Kopplung $^{3}J_{3,4}$=6Hz ist eine cis-, keine trans-Kopplung;
   - die für die Protonen H-3 und H-4 angegebenen long range-Kopplungen wurden von uns nicht beobachtet und sind zumindest für H-3 unverständlich
2. Das Proton bei 11.0 ppm ist der phenolischen Hydroxylgruppe (an C-9) zuzuordnen. Derartige Tieffeldlagen phenolischer Protonen beobachtet man, wenn diese H-Brücken ausbilden können wie hier zum Sauerstoff der C-1-Carbonylgruppe.

   Die $^{1}H,^{13}C$-Kopplungen dieses Protons mit C-9, C-9a und C-8a (vgl. das entsprechende HMBC-Spektrum in Abb. 48) bestätigen die Position dieser Hydroxylgruppe an C-9.
3. Das Proton der Carboxylfunktion (an C-7) konnte in den Spektren nicht detektiert werden, obwohl dies in DMSO durch den verlangsamten Austausch der Hydroxylprotonen erwartet worden war. Denkbar wäre bei mittlerer Austauschgeschwindigkeit allenfalls ein sehr breites, nicht mehr erkennbares Signal. Nach zusammenfügen aller NMR- und der massenspektrometrischen Daten ergibt sich jedoch zwangsläufig die Existenz einer OH-Gruppe an der Ketofunktion an C-7. Als diesbezügliches Indiz kann auch der deutliche Hochfeldshift des Carbonyl-C-Atoms (178 ppm) an C-7 im Vergleich zu einer nicht heteroatom-substituierten CO-Gruppe gewertet werden.
4. Da ^{13}C-7 mit den Protonen der Methylgruppe bei 13.81 ppm koppelt (3H bei 1.19 ppm) und auch mit allen H-Atomen an C-6 (H-6a,b) und C-8 (H-8a,b), kann die Struktur dieses substituierten

Cyclopentanringes als gesichert gelten. Die Anknüpfungspunkte des phenolischen Ringes ergeben sich u.a. aus der Existenz zweier isolierter AX-Systeme der beiden untereinander jeweils chemisch nicht äquivalenten Protonen der Methylengruppen C-6 und C-8. Man beachte, dass keine $^{13}C,^{1}H$-Kopplungen zwischen dem ^{13}C-Atom der Methylgruppe an C-7 und diesen Protonen zu erkennen sind. Dies kann nur mit der bekannten Abhängigkeit der vicinalen $^{3}J(C,H)$-Kopplung vom Torsionswinkel (ähnlich wie bei den entsprechenden $^{1}H,^{1}H$-Kopplungen) erklärt werden.

In unserem Fall ist zu fordern, dass beide vicinalen Protonen in einem sehr ungünstigen Winkel zum C-Atom dieser Methylgruppe an C-7 positioniert sind.

5. Klarheit über ein weiteres Strukturinkrement bringt die Analyse der Situation an C-5a (152.37 ppm): dieses ^{13}C-Atom koppelt einerseits mit allen Protonen an C-6 (H-6a,b) und C-8 (H-8a,b), daneben aber auch mit denen der aromatischen Methylgruppe an C-5.
6. Die $^{1}H,^{13}C$-Kopplung der aromatischen Methylprotonen (an C-5) nicht nur mit C-5a sondern auch mit C-5, C-4a, C-8a und C-9a (schwach) und die Kopplung von H-4 (6.88 ppm) mit C-3, C-4a,
   C-5, C-9 und C-9a sichern die vermutete Struktur weiter ab (man beachte, dass die ^{13}C-Signale von C-4 und C-9a im HMBC-Spektrum zusammenfallen).
7. Das Proton an C-3 (H-3, 7.54 ppm) weist erwartungsgemäß eine $^{1}H,^{13}C$-Kopplung zu C-4 (105.16 ppm) und C-4a auf; eine eventuelle Kopplung zu C-9a ist nicht erkennbar, da wie bereits erwähnt, die Signale von ^{13}C-4 und ^{13}C-9a im HMBC-Spektrum zusammenfallen. Zur anderen Seite ist nur eine Kopplung, nämlich zum C-1 (Carbonylgruppe), erkennbar. Da dieses C-Atom keine weiteren

Kopplungen erkennen lässt, muss auf anderem Wege entschieden werden, ob diese Ketofunktion oder das benachbarte Sauerstoffatom mit dem C-9a des phenolischen Ringes verbunden, d.h. ob eine Isocumarin- oder eine Cumarin-Ringstruktur vorliegt.

Den Beweis für die Existenz einer Isocumarin-Struktur lässt sich durch den δ-Wert von C-9a (105.26 ppm) erbringen.

Bei einer Nachbarschaft zu einem Ringsauerstoff müsste ein deutlicher Tieffeldshift dieses Signals vorliegen; z.B. liegt das entsprechende ^{13}C-Signal im Chromanon bei 161 ppm und im Cumarin bei 154 ppm.

8. Die NMR-spektroskopisch bestätigte Struktur unserer aus *Heterobasidion annosum* isolierten bioaktiven Verbindung als Fomajorin S steht auch im Einklang mit der beobachteten massenspektrometrischen Fragmentierung, die im vorigen Abschnitt im Detail diskutiert wurde. Den in der Literatur [56, 60] für diese Molekülstruktur beschriebenen dreifachen Verlust von CO konnten wir im Rahmen von MS/MS-Experimenten als Abspaltung von Neutralteilchen der Masse 28 auch bei unserer Verbindung beobachten.

2.6.4 Highthroughput-Screening mit der HPLC/EVOscreen-Einheit

Der bisher dünnschichtchromatographisch aufgetrennte und mit „in situ“-Bioassays untersuchte Ethylacetatextrakt von *Heterobasidion annosum* (vgl. Abb. 11;12; 26-31) konnte als „bioaktiver“ Extrakt determiniert werden und wurde deshalb als besonders prädestiniert für ein erfolgreiches „on-line“-HTS eingestuft.

Abbildung 49 zeigt die entsprechende Extraktauftrennung über die HPLC (NACONA-Einheit) und das zugehörige, in der angeschlossene EVOscreeneinheit aufgenommene, Inhibitionsprofil im HIR-Kinase-Assay (vgl. Abschnitt 2.1).

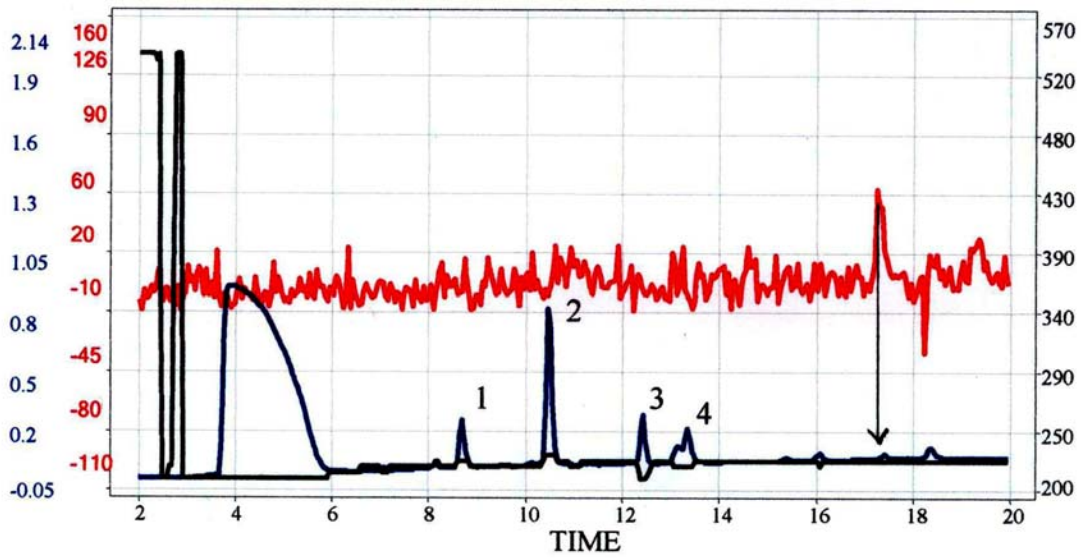


Abb. 49 Analyse des Ethylacetatextraktes von *Heterobasidion annosum* mittels HPLC/EVOscreen-Kopplung (HIR-Kinase-Assay)
HPLC-Spur (blau) des EA-Extraktes mit zugehörigem Inhibitionsprofil (rot); der Pfeil markiert die Stelle im Chromatogramm bei RT 17,79 Min., die den Ausschlag in der Hemmkurve verursacht.

Das Ergebnis dieser HPLC/EVOscreen-Analyse lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Diejenigen Peaks, die bisher den in den „in-situ“-Bioassays als aktiv determinierten DC-Hauptzonen zugeordnet werden können (Peak Nr. 2, RT 10,5 min, Fraktion 5; Peak Nr. 3, RT 12,3 min, Fraktion 1 und 3) zeigen in diesem Assay keine Aktivität. Ebensowenig wie die anderen HPLC-Peaks.
- HIR-Kinase-Inhibition weist dagegen ein Bereich im Chromatogramm (UV-Detektion) auf (bei RT 17,17 min) wo kein Peak erkennbar ist, d.h diese Substanz besitzt offensichtlich keine chromophore Gruppe im Molekül

  Eine entsprechende HPLC/(ESI)MS-Analyse wies jedoch an dieser Position eine Komponente mit dem Basispeak m/z 414 auf (Abb. 50)

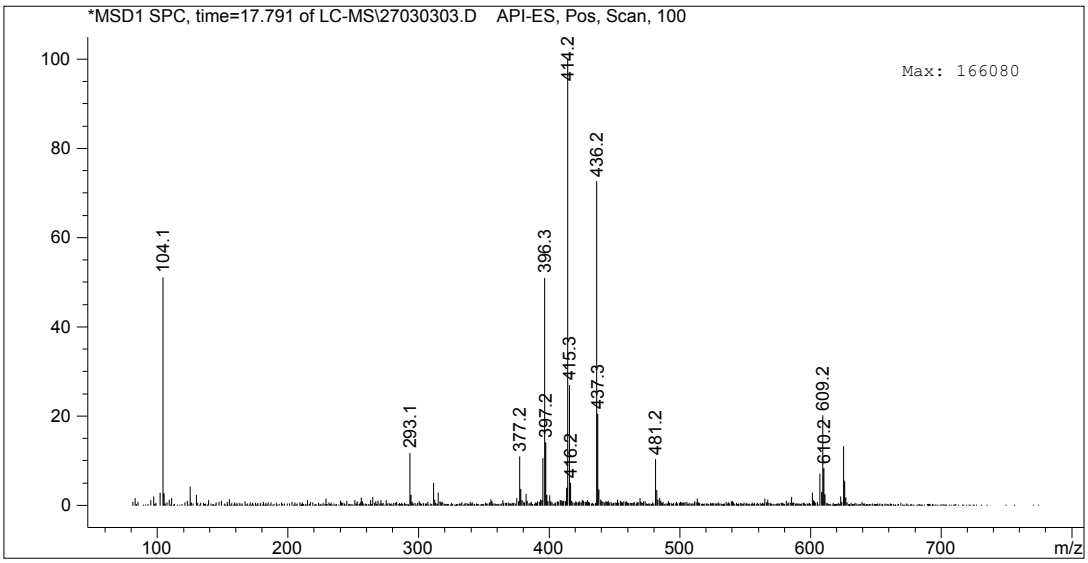


Abb. 50 ESI-MS der die HIR-Kinase inhibierenden Komponente des *Heterobasidion annsosum*-EA.Extraktes (HPLC-RT: 17,79 min)

Den Basispeak m/z 414 kann man als Quasimolekülion $(M+H)^+$ interpretieren unter Hinzuziehung der Peaks m/z 436 $(M+Na)^+$ und m/z 396 $[(M+H)^+-H_2O]$. Die Entstehung des Peaks m/z 396 ist als Sauerstoffindikation zu werten, d.h. das Molekül besitzt mindestens eine Sauerstofffunktion. Entsprechend dem ungeraden Molekulargewicht muss die Verbindung zudem eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen enthalten.

Leider gelang es wegen der Schwierigkeit der chromatografischen Detektion und der geringen Substanzmengen nicht, diese HIR-Kinase-aktive Komponente zu isolieren, so dass ihre Struktur offen bleiben muss.
Trotzdem ist dieses Ergebnis aus mehreren Gründen überaus bemerkenswert:

- Es gelang in relativ kurzer Zeit, einen komplexen Naturstoffextrakt im Hinblick auf potentielle Wirkstoffkandidaten gegen ein bestimmtes Target durchzuscreenen und darin auch eine entsprechende Verbindung zu detektieren.

  Es ist dabei besonders hervorzuheben, dass der Nachweis der Bioaktiviät dieser im HIR-Kinase-Assays (Target für Diabetes Tpy II; vgl. Kap. 2.1) aktiven Komponente direkt aus dem Extrakt heraus, ohne vorherige Substanzisolierung und Aufreinigung erfolgte.

  Diese im Rahmen dieses Leitprojektes erstmalig von der Firma EVOTEC OAI etablierte neue Screening-Technologie arbeitet sehr viel rationeller und effizienter und wird nach unserer Einschätzung die Suche nach Wirkstoffen in Naturstoffmatrices revolutionieren.
- Der hohe und diffizile apparative Aufwand dieser Technologie und der zur Zeit noch sehr arbeitsintensive Meß- und Auswerteprozeß lässt es gegenwärtig noch wünschenswert erscheinen, eine

Präselektionierung der Extrakte vorzunehmen, die in dieses HTS gegeben werden.

Wie bereits verschiedentlich erwähnt, haben wir zu diesem Zweck „in-situ“-Tests auf der DC entwickelt. Zum Teil erlauben diese – wie mehrfach beobachtet und so auch im vorliegenden Fall – durchaus weitergehende Aussagen über ein Bioaktivitätspotential von Extrakten, auch wenn die im HTS nachgewiesene Aktivitätsart eine andere ist als die, die in den Assays auf der DC als positiv getestet wurde.

Dieser Tatbestand läst sich nur selten erklären, z.T. spielt sicher auch der Zufall eine Rolle.

2.6.5 Untersuchung der wasserdampfflüchtigen Fraktion von *Heterobasidion annosum*

Bioaktivität kann bekanntlich auch von kleinen flüchtigen Molekülen hervorgerufen werden.

Deshalb wurden auch die wasserdampflüchtigen Verbindungen des Wurzelschwamms untersucht.

Dabei ist folgendes anzumerken:

Diese überwiegend sehr lipophilen Substanzen lassen sich nicht im HTS vermessen; zum einen, da während dieser Prozedur das Lösungsmittel in den Reaktions-Wells (und damit auch die leichtflüchtigen Verbindungen) durch einen Stickstoffstrom vollständig entfernt wird, zum anderen, weil die anschließend zupipettierten Assays praktisch alle nur in einem ganz überwiegend wässrigen Medium funktionsfähig sind.

Aus dieser Tatsache ergibt sich, dass wir die Bioaktivitätsbestimmung der flüchtigen Inhaltsstoffe unseres Pilzes nur mittels der „in-situ"-Bioassays auf der DC durchführen konnten (vgl. Abb. 13; 26-31).

Es zeigte sich bei allen vier Testsystemen (Cholinesterasehemmung, DPPH-Aktivität; Hemmung von B. subtilis, S. aureus und E.coli, Hämolyseaktivität) Bioaktivität, wobei die Zonen bei Rf 0,59 und 0,8 besonders deutlich auffielen, da sie sowohl im Cholinesterase- als auch im DPPH-Test positiv waren. Die Zone bei Rf 0,59 zeigte zusätzlich noch eine positive Reaktion im Hämolysetest mit der Blutgelatine.

Von diesen Zonen wurden mit dem TLC-Scanner die in-situ UV-Spektren aufgenommen (Abbildungen 51/52).

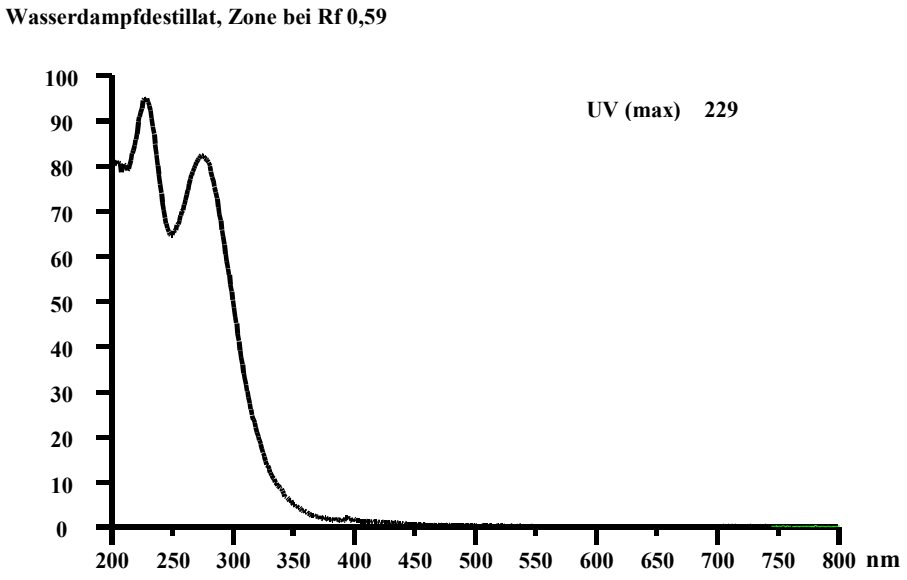


Abb. 51 In-situ UV-Spektrum der DC-Bande bei Rf 0,59 (Maxima bei 249 und 300 nm) (vgl. Abb. 13)

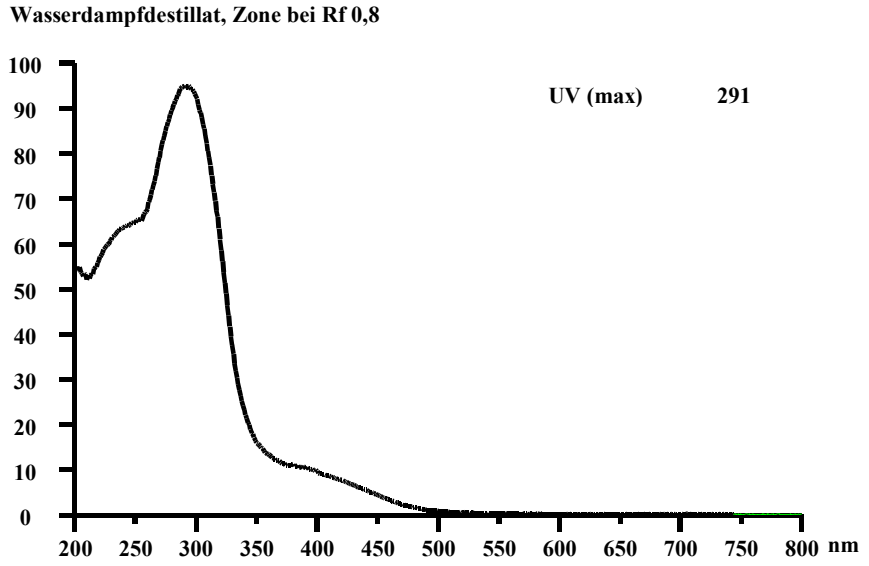


Abb. 52 In-situ UV-Spektrum der DC-Bande bei Rf 0,8 (Maximum bei 300 nm) (vgl. Abb. 13)

Der Habitus beider Spektren lässt darauf schließen, dass beide Substanzen mindestens drei konjugierte Doppelbindungen (bzw. eine Dienstruktur mit starken auxochromen Gruppen) als Chromophor besitzen müssen.

Als weitere Analysemethode für das Wasserdampfdestillat wurde die Kapillar-Gaschromatographie gewählt. Hierbei wurde eine Trennung sowohl an einer polaren, als auch an einer apolaren Säule durchgeführt.
Das in Abbildung 53 wiedergegebene Gaschromatogramm zeigt, dass dieses Wasserdampfdestillat recht komplex zusammengesetzt ist.

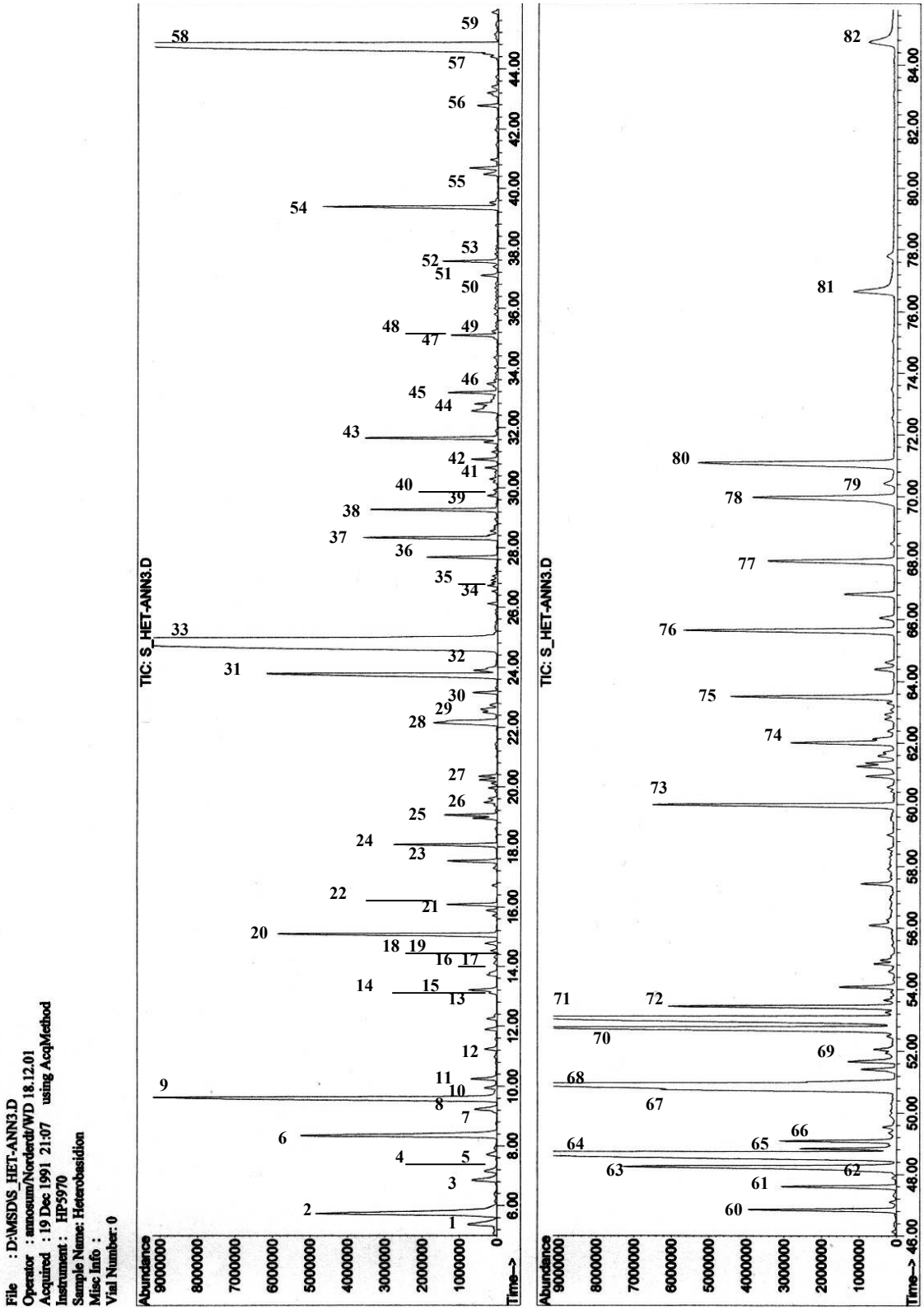


Abb. 53 Gaschromatogramm der wasserdampfflüchtigen Komponenten von *Heterobasidion annosum* (J&W DBWax-Säule; näheres s. Text)

Über eine Kopplung des Gaschromatographen mit einem Quadrupol-Massenspektrometer, bei welchem die Fragmentierung durch EI-Technik erfolgte und einer nachfolgenden Datenbankrecherche konnten die in der folgenden Tabelle 5 aufgeführten Komponenten identifiziert werden:

Peak Nr.	**Retentionszeit [min]**	**Substanz**	**Gehalt im GC [%]**	**Anmerkungen**	**Identifizierung**
1	5,38	2-Methylfuran	0,41		MS / RT
2	5,74	3-Methylbutanal	2,58		MS / RT
3	6,86	Pentanal	0,27		MS / RT
4	7,16	2-Methylpentanal	0,11		MS
5	7,74	α-Pinen	0,04		MS / RT
6	8,36	Toluol	1,89		MS / RT
7	9,23	Camphen	0,03		MS / RT
8	9,23	Methylpyridazin	0,16	Stellung der Methylgruppe nicht spezifiziert	MS
9	9,64	Hexanal	3,99		MS / RT
10	9,95	2-Methylbutenal	0,07		MS
11	10,25	Methylpyridazin	0,14	Stellung der Methylgruppe nicht spezifiziert	MS
12	11,24	2-Butylfuran	0,05		MS / RT
13	13,20	α -Terpinen	0,03		MS / RT
14	13,21	2-Heptanon	0,11		MS / RT
15	13,22	Heptenal	0,05		MS / RT
16	13,7	Limonen	0,03		MS / RT
17	13,8	β-Phellandren	0,03		MS / RT
18	14,6	1,8-Cineol	0,02		MS / RT
19	14,78	2-Hexenal	0,06		MS / RT
20	15,09	2-Pentylfuran	1,00		MS / RT
21	15,89	1-Pentanol	0,06		MS /RT
22	16,09	3-Octanal	0,2		MS / RT
23	17,53	Octanol	0,16		MS / RT
24	18,08	1-Hepten-3-on	0,42		MS / RT
25	19,06	2-Heptenal	0,27		MS / RT
26	19,48	6-Methyl-5-Hepten-2-on	0,16		MS / RT
27	19,96	1-Hexanol	0,03		MS / RT
28	22,15	Nonanal	0,43		MS / RT
29	22,15	3-Octanol	0,25		MS / RT

Peak Nr.	Retentionszeit [min]	Substanz	Gehalt im GC [%]	Anmerkungen	Identifizierung
30	23,16	5-Ethyl-cyclopenten-1-carbaldehyd	0,08		MS
31	23,79	2-Octenal	1,8		MS / RT
32	23,9	1-Octen-3-ol	0,03	Isomer nicht spezifiziert	MS / RT
33	24,96	1-Octen-3-ol	20,03	Isomer nicht spezifiziert	MS / RT
34	26,72	2-Decanon	0,02		MS / RT
35	26,73	Decanal	0,03		MS / RT
36	27,86	Benzaldehyd	0,23		MS / RT
37	28,34	2-Nonenal	0,52		MS / RT
38	29,28	1-Octanol	0,45		MS / RT
39	29,74	5-Methylfufural	0,05		MS
40	29,8	α-Barbaten	0,01		MS / RT
41	30,67	6-Methyl-3,5-heptadien-2-on	0,04		MS / RT
42	30,95	2-Undecanon	0,05		MS / RT
43	31,66	2-Octen-1-ol	0,46		MS / RT
44	32,56	Phenylacetaldehyd	0,15		MS
45	33,18	β-Barbaten	0,15		MS / RT
46	33,47	2,4-Nonadienal	0,04	Isomer nicht spezifiziert	MS / RT
47	35,09	α-Terpineol	0,01		MS / RT
48	35,10	2,4-Nonadienal (E,E)	0,05		MS / RT
49	35,11	2,3-Dimethylbenzofuran	0,01	Position der Methylgruppe unklar	MS
50	37,10	2-Undecenal	0,15		MS / RT
51	37,4	α-Cadinen	0,01		MS / RT
52	37,57	2,4-Decadienal	0,16	Isomer nicht spezifiziert	MS / RT
53	37,8	C15H24	< 0,01		MS
54	39,38	2,4-Decadienal	0,74	Isomer nicht spezifiziert	MS / RT
55	40,48	Capronsäure	0,15		MS / RT
56	42,78	Fufurylidenaceton	0,1		MS
57	44,50	Oenanthsäure	0,04		MS / RT
58	44,84	MW 216	10,05		
59	46,00	Kresol	0,03	Isomer nicht spezifiziert	MS
60	46,85	MW 216	0,61		
61	47,61	MW 222	0,47		
62	48,25	Caprylsäure	0,03		MS / RT
63	48,25	MW 214	1,7		

Peak Nr.	Retentionszeit [min]	Substanz	Gehalt im GC [%]	Anmerkungen	Identifizierung
64	48,72	MW 216	9,38		
65	48,84	MW 216	0,31		
66	49,09	MW 216	0,46		
67	50,77	MW 214	1,5		
68	50,95	MW 232	8,66		
69	51,67	Pelargonsäure + MW 214	0,3		MS / RT
70	52,07	MW 232	5,25		
71	52,77	MW 214	5,54		
72	53,45	MW 214	1,21		
73	59,99	MW 234	1,61		
74	62,02	MW 212	0,71		
75	63,52	MW 232	1,08		
76	65,65	MW 232	1,91		
77	67,91	MW 232	1,04		
78	69,97	MW 232	1,52		
79	70,44	Tetradecansäure	0,7		MS / RT
80	71,08	MW 232	1,5		
81	76,66	Pentadecansäure	0,93		MS / RT
82	84,74	Hexadecansäure	0,89		MS / RT

Tab. 5 Zusammenfassung der GC/MS-Analyse der wasserdampfflüchtigen Bestandteile von *Heterobasidion annosum* (Einzelheiten vgl. Text)

Die Identifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte mittels GC/MS auf einer polaren Säule, wobei einerseits die aufgenommenen Massenspektren mit Spektren elektronischer MS-Bibliotheken

(1. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1988;
2. NIST/EPA/NIH mass spectral data base, 1998;
3. Compilation of mass spectra of volatile compounds in food, TNO Institute, Zeist, Netherlands, Chemical Concepts, Weinheim, 1985;
4. Terpenbibliothek Prof König [Inst. f. organische Chemie, Hamburg] 2002;
5. Identification of ess. oil components by gas chromatography/quadrupol mass spectroscopy [Prof. R.P. Adams], Allures Publishing Company, Carol Stream, Illinois, 2001
6. Arbeitskreisinterne MS-Bibliothek etherischer Ölkomponenten, [Schultze, Inst. f. Pharmazie, Hamburg])

verglichen wurden und zum anderen die Retentionszeiten der massenspektrometrisch identifizierten Komponenten auf der verwendeten polaren Kapillarsäule überprüft wurden – soweit immer dies möglich war.

Eine Identifizierung ausschließlich anhand des Massenspektrums wurde nur in wenigen Fällen bei sehr hoher „HitQuality“ (> 95%) und sehr charakteristischem Massenspektrum vorgenommen (vgl. Tab. 5).

Die Ergebnisse dieser GC/MS-Analyse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Insgesamt wurden über 200 Komponenten massenspektrometrisch erfasst; viele lagen allerdings im Spurenbereich.
   59 davon konnten identifiziert werden, die zusammen etwa 41% des prozentualen Gesamtgehaltes repräsentieren.
2. Als Hauptkomponente tritt mit etwa 20 % 1-Octen-3-ol auf; daneben konnten zahlreiche aliphatische Verbindungen (Alkohole, Ketone, Aldehyde, Säuren), z.T. einfach ungesättigt, identifiziert werden, deren prozentualer Gehalt – mit Ausnahme von Hexenal – jeweils unter 1 % lag.
3. Daneben ist das Vorkommen von sechs Monoterpenen, deren prozentualer Anteil allerdings nur im Spurenbereich angesiedelt ist, erwähnenswert.
   Besonders hinzuweisen ist in diesem Zusammenhang auf das Auftreten der beiden Sesquiterpenkohlenwasserstoffe α- und β-Barbaten, die im etherischen Öl des Lebermooses Bazzania trilobata nachgewiesen worden sind [vgl. MS-Datenbank Prof. König, Hamburg].
   Da *Heterobasidion annosum* oft mit Moosen verwachsen vorkommt und z.T. nur sehr schwer zu reinigen ist, da er „porlingstypisch“ Hemmnisse einfach umwächst (d.h. einschließt), bedarf dieses Ergebnis einer Überprüfung. Es kann deshalb z.Zt. nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Barbatene von mitverarbeiteten, eingeschlossenen Resten einer Bazzania-Art stammen, obwohl dies sehr unwahrscheinlich ist, da wir Moose dieser Gattung bewusst nie in den Sammelgebieten gesehen haben.

4. Zwar bildet 1-Octen-3-ol die Hauptkomponente im Wasserdampfdestillat des Wurzelschwammes, doch wird dieses letzlich charakterisiert durch eine Gruppe – polyzyklischer – Komponenten mit den Molekulargewichten 214, 216 und 232, die zusammen über 50 % des Gesamtdestillates ausmachen.
   Leider sind Massenspektren dieser Verbindungen in keiner herkömmlichen Datenbank erfasst und es gelang auch nicht, einzelne Verbindungen „NMR-sauber“ für eine Strukturaufklärung zu isolieren (zumal die zur Verfügung stehenden Mengen sehr begrenzt waren).

Nach der GC/MS-Analyse der flüchtigen Verbindungen von *Heterobasidion annosum* wurden die bioaktiven DC-Zonen bei Rf 0,59 und Rf 0,8 ausgeschabt und mit Ether eluiert, anschließend das Eluat nach Konzentrierung gaschromatografisch untersucht.
Dabei stellte sich heraus, dass sich die auf der DC als ein Fleck erscheinende Zone aus 6 (Rf 0,59) bzw. 2 (Rf 0,8) Einzelpeaks zusammensetzt (Abbildungen 54/55).

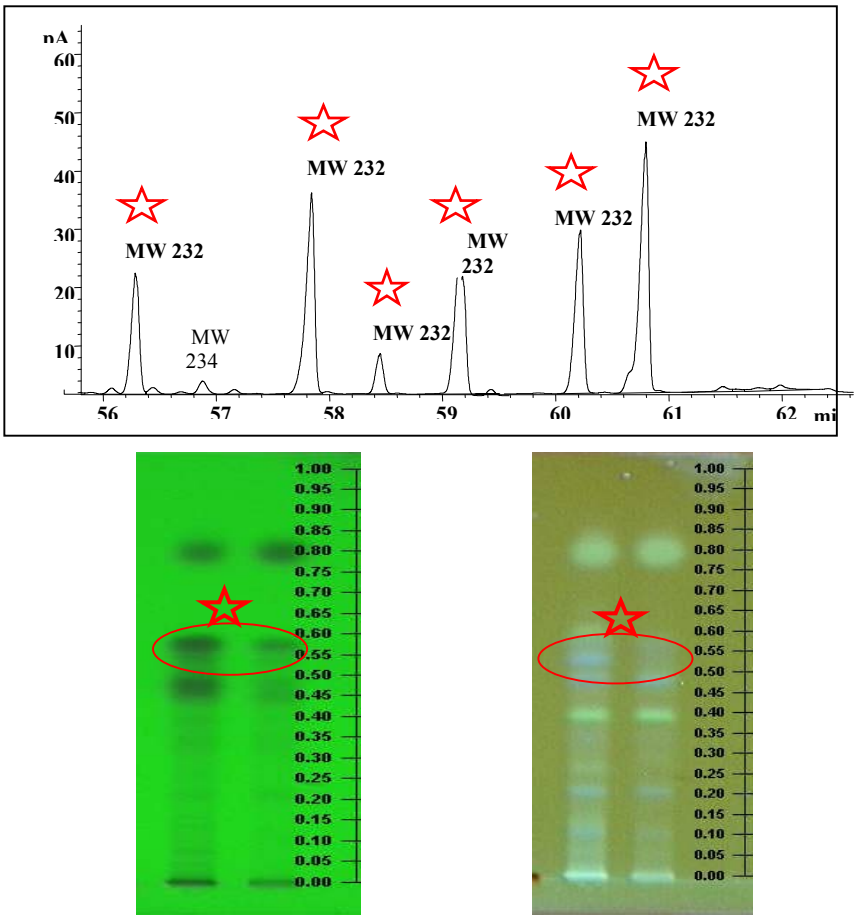


Abb. 54 Kennzeichnung der in der bioaktiven DC-Zone (Rf 0,59; vgl. Abb. 13) enthaltenen Komponenten im GC/MS-Chromatogramm des Wasserdampfdestillates von *H. annosum*; in der unteren Hälfte der Darstellung ist links die DC-Auftrennung bei 254 nm, rechts bei 366 nm dargestellt.

Beim Vergleich mit den Daten der GC/MS-Analyse zeigte sich, dass die sechs Hauptpeaks der DC-Zone mit Rf 0,59 den nicht identifizierten Peaks Nr. 70, 75, 76, 77, 78 und 80 entsprechen (vgl. Tab. 5); d.h alle das Molekulargewicht 232 aufweisen.

Die DC-Zone mit Rf 0,8 (vgl. Abb. 13) bestand dagegen nur aus zwei Verbindungen, den nicht identifizierten Peaks Nr. 65 und 66.

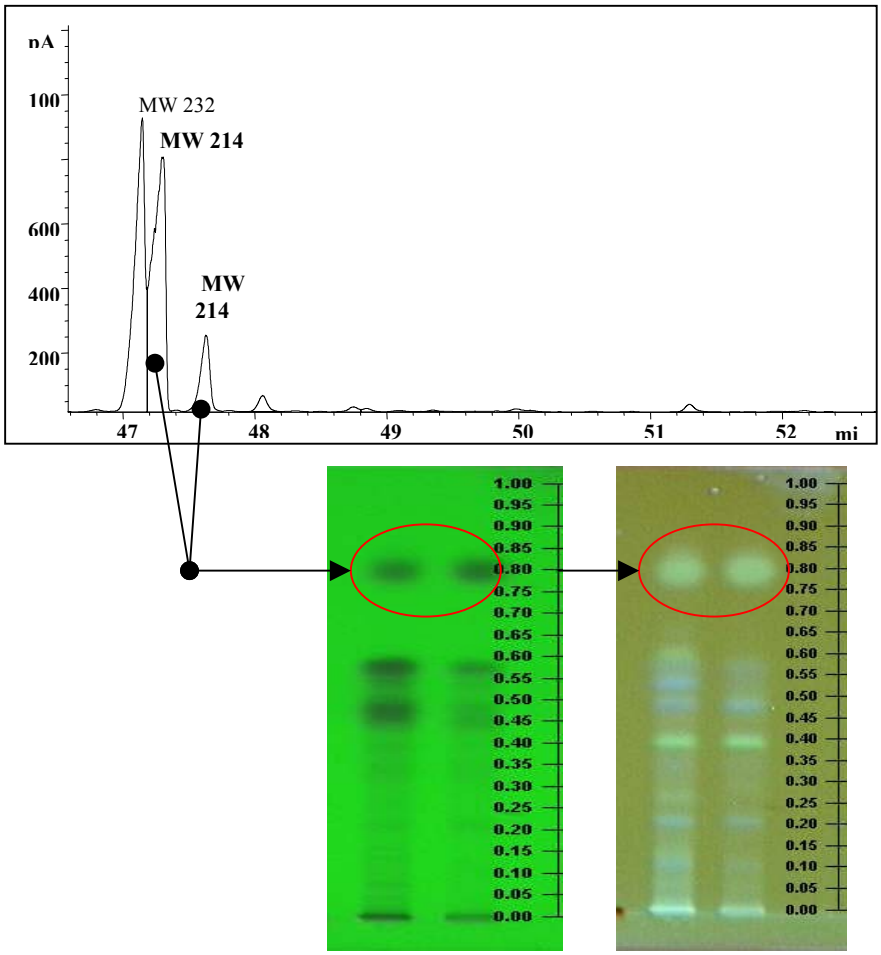


Abb. 55 Kennzeichnung der in der bioaktiven Zone (Rf 0,8; vgl. Abb. 13) enthaltenen Komponenten im GC/MS-Chromatogramm des Wasserdampfdestillates von *H. annosum*; auch hier stellt der untere Teil der Grafik die DC-Auftrennung dar, links die Detektion bei 254 nm, rechts bei 366 nm

Es sei abschließend angemerkt, dass das Massenspektrum des Peaks Nr. 65 (MW 214) eine relativ hohe Übereinstimmung mit dem des 2-Isobutenyl-3-methoxy-1-Indanons in der Wiley-Bibliothek aufweist, einer Verbindung, die bisher nur als Synthesezwischenprodukt bekannt ist. Eventuell kann dies als Hinweis auf das Vorliegen eines entsprechenden Grundgerüstes interpretiert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Um ein rationales und vor allem ökonomisches Screening von Pflanzen durchzuführen, hat sich im Verlauf der letzten Jahre das HTS als eine hervorragende Methode etabliert. Besonders die Miniaturisierung, wie sie von unserem Kooperationspartner EVOTEC OAI angewendet wird, stellt bei oft wenig zur Verfügung stehendem Material einen Meilenstein in der Entwicklung dar. Allerdings erlaubte diese Methode im Bereich der Naturstoffanalytik bis vor kurzem lediglich die Untersuchung von Gesamtextrakten bzw. Fraktionen, nicht jedoch einzelner Komponenten.

Die von EVOTEC OAI entwickelte Kopplungstechnik der HPLC mit dem HTS stellt hier eine außerordentlich gute Möglichkeit dar, diesem Ziel näher zu kommen. Allerdings ist diese Methode noch sehr arbeitsintensiv.

Bei der Analyse von Naturstoffextrakten mit Hilfe dieser Kopplung treten besondere Schwierigkeiten auf, die die Entwicklung der Methode vor große Probleme stellte.

Im Einzelnen handelt es sich hierbei um die sehr unterschiedliche Viskosität pflanzlicher Extrakte; selbst bei Verwendung des gleichen Lösungsmittels können Extraktbestandteile zu einer Veränderung der Viskosität führen. Auch die Löslichkeit von Extraktkomponenten im gewählten Lösemittel spielt eine entscheidende Rolle. Mögen die Substanzen im für die Extraktion gewählten Auszugsmittel gut löslich sein, kann es bei der weiteren Verarbeitung für das HTS zu Ausfällungen kommen, die unter Umständen nicht wieder zu beseitigen sind.

Dieser Faktor ist auch bei der Lagerung der Untersuchungslösungen zu berücksichtigen. Es ist zwar möglich, die Extrakte vor dem Screening in Tiefkühlschränken zu lagern, wie es auch bei EVOTEC OAI routinemäßig gehandhabt wird, es hat sich jedoch herausgestellt, dass ein Auftauen dieser

Lösungen häufig zu Trübungen führte, die auf Bestandteile des Extraktes zurückzuführen waren, die nach dem Auftauen nicht wieder in Lösung gingen.

Wurden die Extrakte jedoch nur im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert, um dieses Problem zu vermeiden, kam es nach einiger Zeit häufig zu einer Verpilzung dieser Lösungen. Dies liegt vermutlich daran, dass bei dem von uns gewählten Extraktionsverfahren und den anschließenden Verarbeitungsschritten, Mikroorganismen, die natürlicherweise auf den Pflanzen und Pilzen siedeln, mit extrahiert, dabei aber nicht abgetötet wurden.

Ein großer Teil dieser aufgetretenen Probleme konnten durch einfache Abwandlungen des Handlings behoben werden. So werden die Extrakte inzwischen nicht mehr eingefroren und auch der Zeitraum zwischen Extraktion und Vorbereitung der Nanotiterplatten für das Sreening wird so kurz wie möglich gehalten, damit es nicht zu einem Wachstum von Mikroorganismen kommen kann.

Die mangelnde Löslichkeit der über die HPLC erhaltenen Fraktionen nach der Evaporation der Wells konnte dadurch minimiert werden, dass als Lösemittel, das nach der Evaporation zugegeben wird, DMSO verwendet wird. Darin sind beinahe alle Naturstoffe löslich.

Bis jetzt aber konnte die Schwierigkeit der unterschiedlichen Viskositäten noch nicht zufriedenstellend behoben werden, so dass eine einheitliche Füllung der Wells über den Dispenser mit genau einem Mikroliter nicht immer gewährleistet werden kann.

Ein weiteres Problem, das bis heute auch noch nicht gelöst werden konnte, ist die fehlende Quantifizierung der Komponenten in den einzelnen Wells. Da es sich bei den von uns untersuchten Extrakten überwiegend um solche mit unbekannten Inhaltsstoffen handelt, ist eine Aussage über die Art und

Menge an Komponenten nicht möglich. Für die HPLC-Kopplung bedeutet dies aber, dass keine quantitativen Angaben über den Inhalt eines Wells gemacht werden kann. Im Screening kann dann folglich auch nicht mit Sicherheit festgelegt werden, dass ein Well, in dem keine Aktivität verzeichnet wird, keine aktive Verbindung enthält. Es kann natürlich auch sein, dass in diesem Well durchaus eine aktive Substanz enthalten ist, deren Konzentration jedoch so gering ist, dass man keine Aktivität verzeichnen kann. Allerdings ist die Empfindlichkeit des Systems so hoch, dass die negative Aussage dieses Problems eher gering zu bewerten ist. Viel wichtiger an dem beschriebenen Sachverhalt, ist die Tatsache, dass bei einem positiven Hit zunächst keine Aussage darüber getroffen werden kann, durch welche Menge an Substanz dieser Hit verursacht wird.

Auf noch ein weiteres Problem sei hingewiesen: wir mussten die Erfahrung machen, dass flüchtige und lipophile Komponenten im HTS nicht erfasst werden (z.B. etherische Öle).

Dies wäre jedoch sehr wichtig, da, wie auch unsere Untersuchung des Wasserdampfdestillates von *Heterobasidion annosum* gezeigt hat, diese Verbindungen ein beträchtliches Bioaktivitätspotential aufweisen.

Die leichtflüchtigen Komponenten werden beim Entfernen des Lösungsmittel durch einen Gasstrom mit eliminiert und die lipophilen Verbindungen lösen sich nicht im wässrigen Medium der Assays.

Dieses Problem konnte jedoch schließlich durch ein entsprechendes Coating der Wells behoben werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Organismen standen am Ende einer langen Reihe von Pflanzen und Pilzen, die von unserer Arbeitsgruppe gesammelt, gereinigt, eingelagert und extrahiert wurden.

Während der Zeit, in der bei EVOTEC OAI die Technik des HTS und die Weiterentwicklung zur Kopplung mit der HPLC vorangetrieben wurde, wurden ca. 600 unterschiedliche Extrakte von uns hergestellt und für ein späteres Screening bei EVOTEC OAI eingelagert. Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten, konnten von dieser Vielzahl an Extrakten nur ein Bruchteil überhaupt bis zum endgültigen Screening stabil gehalten werden. Und auch die 16 Untersuchungslösungen, die dann positiv in einem vielversprechenden Caspaseassay getestet wurden, erzeugten zwar interessante, aber leider nicht reproduzierbare Ergebnisse.
Aus diesen für uns sehr unbefriedigenden Umstände ergab sich letztlich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, schnelle, kostengünstige und vor allem einfach zu handhabende Testsysteme zu entwickeln, um bei einer Vielzahl von Pflanzenextrakten sehr schnell bioaktive Extrakte herauszufiltern und diese gezielt dem HTS zuzuführen.
Beispielhaft sollte jedoch auch versucht werden, derartige aktive Extrakte aufzutrennen, einzelne bioaktive Komponenten zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären.
Die Organismenauswahl der Gruppe der Baumpilze für die durchgeführten Untersuchungen beruhte vor allem auf der Tatsache, dass diese Gruppe zwar z.T. pharmakologisch insbesondere in Asien genutzt wird, über mögliche pharmakologische Wirkungen und z.T. auch die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der heimischen Arten aber kaum etwas bekannt ist.

Entwicklung der Assays

Bei der Auswahl und Entwicklung der Testsysteme sollte natürlich besonders auf die bei EVOTEC OAI eingesetzten Assays eingegangen werden.
Da hier eine breite Palette zur Verfügung stand, sollte einerseits versucht werden, diese teilweise mit einfachen Testsystemen nachzuahmen, zum anderen sollten auch ergänzende Tests eingesetzt werden.
Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entwicklung der Testsysteme war deren Anwendbarkeit auf der Dünnschichtplatte, da mit dem Auftragegerät, dem TLC-Scanner und dem ProViDoc eine optimale Ausrüstung für diese Analysetechnik zur Verfügung stand und zusätzlich über die Trennung der Extrakte auf der Platte gleichzeitig eine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob es sich um eine Reihe aktiver Komponenten pro Extrakt handelt oder ob die pharmakologische Aktivität im Idealfall nur von einer Substanz hervorgerufen wird.

Zur Simulierung des HIR-Kinase-Assays sollte ein Enzymtest genutzt werden. Hierbei wurden die toxikologischen Arbeiten von Weins et.al. [34] zur Detektion von Verunreinigungen in Trinkwasser durch eine Cholinesterasehemmung auf der DC-Platte als Grundlage genommen.
Da bei den von uns untersuchten Pilzextrakten sehr komplexe Fließmittelgemische zur optimalen Trennung benutzt wurden, war zunächst nicht sicher, ob der Test einfach auf unsere Systeme übertragen werden konnte. Erste Versuche zeigten dann auch, dass leichte Modifikationen des Tests notwendig waren, damit ein positives Ergebnis erzielt werden konnte. Diese bestanden vor allem in der Anpassung an unsere technischen Möglichkeiten, da wir keine Klimaschränke zur Verfügung hatten, um eine

exakte rel. Feuchte von 90 % sowie eine genaue Temperatur von 37°C zu realisieren.

Die Untersuchungen wurden bei uns im Trockenschrank durchgeführt, der auf 37°C Innentemperatur eingestellt war. Zur Erreichung der benötigten Luftfeuchtigkeit wurde ein in Wasser getränktes Filterpapier in einer Petrischale in den Trockenschrank mit eingestellt.

Eine weitere Modifikation wurde bei der Aufbringung des Farbreagenzes vorgenommen. In der Originalarbeit wurde das Gemisch von Naphthylacetat und Echtblausalz als Tauchlösung eingesetzt. Es zeigte sich aber, dass das Reagenz ebenso gut als Sprühlösung verwendet werden konnte, wobei sogar weniger Reagenz verbraucht wurde.

Ob diese Maßnahmen ausreichten, wurde mit Hilfe des bekannten Hemmstoffes für die Cholinesterase, Physostigmin, überprüft. Es stellte sich heraus, dass die von uns gewählten Parameter vollständig ausreichten, um mit Physostigmin eine Hemmung hervorzurufen. Zusätzlich wurde in dieser Versuchsreihe auch gleich die Nachweisgrenze des Assays festgelegt, wobei man jedoch nicht davon ausgehen kann, dass diese für die Pilzextrakte genauso niedrig liegt, da es sich bei den Extrakten ja um komplex zusammengesetzte Mischungen handelt, während wir den Test an einer Einzelkomponente mit extremer Hemmwirkung durchgeführt haben. Dennoch kann man die ermittelte Grenze von 0,001% bei einer Auftragemenge von 5µl als Anhaltspunkt dafür heranziehen, bis zu welcher Verdünnung eine Aktivität noch nachzuweisen ist.

Nach der Adaption der Parameter an unsere Bedingungen wurde der Assay mit den Pilz- und Pflanzenextrakten durchgeführt. Die Übertragung gelang problemlos, so dass wir mit diesem Assay reproduzierbar ein Testsystem für eine Enzymhemmung geschaffen hatten , das in kurzer Zeit auf der DC angewendet werden konnte. Besonders hervorzuheben ist noch, dass die

gebildeten Hemmzonen sehr scharf umgrenzt sind, so dass auch bei eng zusammenliegenden Zonen auf der Platte noch eine eindeutige Zuordnung der aktiven Bereiche möglich war. Damit konnten die gezielten Untersuchungen der Pilzextrakte erfolgen.

Ein weiterer Assay sollte etabliert werden, der all jene Komponenten detektierte, die in der Lage sind, freie Radikale abzufangen.
Für EVOTEC OAI bestand hier zwar kein direkter Zusammenhang zu einem Assay, dennoch konnte ein solcher Test dazu dienen, eventuelle reaktive Gruppen einer Substanz zu detektieren bzw. einen Hinweis darauf liefern, welche Substanzen in der Lage sein könnten, Bindungen oder Reaktionen einzugehen.
In der Literatur fand sich ein solcher „Radikalfängertest“ bereits beschrieben von Hwang [39] aus dem Jahr 2001, der aktive Flavonglykoside in einer Pflanze auf diese Art detektierte. Dieser Test wurde jedoch in Mikrovials durchgeführt und beruhte darauf, dass eine violette Lösung des freien Radikals DPPH durch die Glykoside entfärbt wurde.
In Arbeiten von R. Richter und A. Koch [mündl. Mitteilung] an dem als Nootropikum (Medikament zur Steigerung der Hirndurchblutung) eingesetztem Ginseng wurde dieser Versuch bereits auf die DC-Platte übertragen. Hierbei wurde das beständige freie Radikal in Ethanol gelöst und dann auf die Platte mit dem entwickelten Chromatogramm aufgebracht. Dort, wo Substanzen durch ihre Struktur in der Lage sind, das Radikal zu binden, entfärbt sich die Lösung und es bleibt eine weiße Zone zurück.

Zunächst wurde der Assay in der Form wie von Koch und Richter beschrieben von uns übernommen, doch brachte er nicht das gewünschte positive Ergebnis.

Es schlossen sich unterschiedliche Modifikationen an, die zunächst darin bestanden, das Reagenz nicht als Sprüh-, sondern als Tauchlösung einzusetzen und die Temperatur im Trockenschrank während der Reaktionsphase zu variieren. Daneben wurde auch die Reaktionszeit verändert, sowohl zu kürzeren, als auch zu längeren Zeiten hin, aber all diese Veränderungen brachten keine Vorteile bezüglich des Ergebnisses.

Erst der Austausch des Lösemittels für das Radikal von Ethanol zu Aceton führte dazu, dass eine Detektion erfolgreich war. Die übrigen Parameter wie den Einsatz des Reagenzes als Sprühlösung und die Inkubation der besprühten Platten im Trockenschrank bei 37°C für 30 min konnten gemäß der Ausgangsarbeiten beibehalten werden.

Auch dieser Test wurde natürlich auf seine Funktionalität und bezüglich der Nachweisgrenze mit bekannten Substanzen überprüft, wobei hier eine Nachweisgrenze von 0,005 % bei 2 µl Auftragemenge (= 0,001 µg) festgestellt werden konnte. Allerdings gilt auch hier, dass die komplexen Mischungen in den Extrakten zu Abweichungen führen könnten.

Nach der Optimierung der Bedingungen wurde der Test mit Erfolg auf die Pilzextrakte übertragen und es stand somit ein weiterer Assay zur Verfügung, der einfach und schnell durchzuführen ist.

Neben der Enzymhemmung spielte für EVOTEC OAI auch die antibakterielle Aktivität der Extrakte eine Rolle.

Hierfür konnten zwei unterschiedliche Testsysteme entwickelt bzw. optimiert werden.

Ein auf der Hemmung des aeroben Sporenbildners Bacillus subtilis beruhender Test gibt es von der Firma Merck als Kit zu kaufen. Die Durchführung dieses Tests erwies sich jedoch nicht als so problemlos, wie zunächst vermutet. Obwohl es nicht erforderlich ist, die Arbeiten in einem mikrobiologischen Labor mit zuvor autoklavierten Laborgeräten durchzuführen, sollten gewisse Sterilitätsparameter genau eingehalten werden. So stellte es sich als besonders wichtig heraus, dass alle verwendeten Gegenstände zuvor gut mit Ethanol (99%)gespült wurden und anschließend auch ausreichend getrocknet wurden; zusätzlich mussten alle geforderten Temperaturen während der Inkubation und der Bebrütung der beschickten Platten im Trockenschrank exakt eingehalten werden und auch die Feuchtigkeit in den Reaktionskammern, in denen die beimpften Platten gelagert wurden, war von großer Bedeutung. Da sich auch hier das Problem der nicht vorhandenen Klimaschränke stellte, wurde durch umfangreiche Optimierungsarbeiten herausgefunden, dass das Einlegen eines vollständig mit Wasser benetzten Filterpapiers in die Reaktionskammer ausreichte. Der Trockenschrank wurde auf genau 37°C eingestellt.

Dennoch traten immer wieder Schwierigkeiten mit diesem Test auf, so dass auch aufgrund der hohen Anschaffungskosten eines aus 15 Ansätzen bestehenden Kits ein weiterer mikrobiologischer Test entwickelt wurde.

Dieser Test wurde als Agardiffusionstest in Petrischalen durchgeführt in Anlehnung an die Agardiffusionstest mit vorgefertigten Antibiotikaplättchen, die es im Fachhandel zu kaufen gibt.

Dazu wurde die Arbeitsgruppe von Prof. Heisig, die sich mit der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen befasst, einbezogen, da hier die nötige Ausrüstung und das Know-How im Umgang mit mikrobiologischen Fragestellungen zur Verfügung stand.

Als Keime wurden der grampositive S. aureus und der gramnegative E. coli gewählt, um ein breites Spektrum an Mikroorganismen abzudecken.

Die Petrischalen wurden mit einem Agar-Nährboden beschickt, die Bakteriensuspensionen in einer McFarlandlösung angesetzt und auf dem Nährboden ausgestrichen. Im Gegensatz zu den üblichen Antibiotikaplättchen wurden nun aber unbehandelte Filterpapierplättchen genommen und diese mit den Pilzextrakten getränkt. In aufwändigen Versuchen musste die optimale Menge der aufzubringenden Lösung bestimmt werden. Es stellte sich heraus, dass eine Menge von 50 µl Extrakt nötig ist, um einen sichtbaren Hemmhof zu erzeugen. Diese Menge wurde durch sechsmaliges Eintauchen der Plättchen in die Lösung und einer anschließenden Zwischentrocknung nach jedem Tauchvorgang aufgebracht.

Da die Zwischentrocknung durch das von uns üblicherweise verwendete Lösemittel Ethylacetat verhältnismäßig lange dauert, wurden Versuche unternommen, die Pilzextrakte in Ether herzustellen, da dieser wesentlich leichter flüchtig ist und damit schneller von den Plättchen verdunstet.

DC-Überprüfungen zeigten, dass sich die Extrakte von Ethylacetat und Ether oft nur unwesentlich unterschieden, so dass eine Verwendung der Etherextrakte für den Agardiffusionstest durchaus gerechtfertigt ist.

Mit diesem Test konnte also ein dritter Assay etabliert werden, der für ein sinnvolles Vorscreening in der Routine eingesetzt werden kann.

Mit dem Blutgelatineassay konnte das Spektrum der Assays noch um einen für toxikologische Aspekte wichtigen Punkt ergänzt werden.
Ein ähnlicher Test wurde in Arzneibüchern für den Nachweis von Saponinen herangezogen und detektiert Substanzen, die eine hämolysierende Wirkung besitzen.
Bei manchen giftigen Pilzen kann man die Giftwirkung bis heute nicht sicher begründen. Dieser Test könnte einen Anhaltspunkt dafür liefern, endgültige Gewissheit müssten natürlich dann weitere toxikologische Tests erbringen. Auch dieser Assay wurde für die Verwendung auf den DC-Platten mit den Pilzextrakten optimiert und es gelang durch marginale Veränderungen bezüglich der Viskosität der Blutgelatinelösung ein Testsystem zu schaffen, welches sich ohne großen Aufwand im Labor auf der Dünnschicht durchführen lässt.

Es ist somit gelungen 4 sehr einfach zu handhabende und kostengünstig durchzuführende Biotest zu etablieren, die für eine Vorauswahl der Organismen herangezogen werden können, die dem HTS zugeführt werden sollen.
Neben der rationalen Vorauswahl für das HTS dienen diese entwickelten Assays, allen voran der Test auf Hemmung der Cholinesterase und die antibakteriellen Tests, auch der eigenen Auffindung pharmakologisch aktiver Verbindungen, die unter Umständen als Leitstrukturen bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe dienen könnten.

Vorauswahl für das HTS

Durch die Etablierung der dünnschichtchromatografischen Bioassays sowie des Agardiffusionstests waren wir in der Lage, eine Vielzahl an Organismen systematisch zu untersuchen bevor sie dem Highthroughput-Screening zugeführt wurden.

Bei der Auswahl dieser Untersuchungsobjekte wurden unterschiedliche Aspekte berücksichtigt, von besonderem Interesse waren jedoch für uns die einheimischen Baumpilze, da diese Gruppe bisher nur sehr unzureichend auf ihre pharmakologischen Effekte hin untersucht worden ist und zudem Untersuchungsmaterial oft das ganze Jahr über geerntet werden kann. Im asiatischen Raum hingegen werden Baumpilze bereits in unterschiedlichster Form als Therapeutika bei den verschiedensten Krankheitsbildern eingesetzt.

Insgesamt sind von uns 50 verschiedene Pilze und Pflanzen in den Assays getestet worden, wobei bei 46 davon eine positive Wirkung in mindestestens einem der verwendeten Testsysteme gefunden wurde. Ein Großteil der getesteten Organismen sprach auf den DPHH-Assay positiv an, was damit zu erklären ist, das die Naturstoffe überwiegend ungesättigte Verbindungen sind und damit gute Radikalfängereigenschaften zeigen.

22 Untersuchungsobjekte zeigten eine z.T. (*H. annosum*) sehr starke Hemmung der Cholinesterase, damit kamen diese für ein anschließendes HTS-Screening mit einem Enzym-Assays (HIR-Kinase, Caspase) besonders in Frage.

Von drei Baumpilzen wurden zusätzlich Wasserdampfdestillate angefertigt, die ebenfalls eine positive Wirkung zeigten.

Insgesamt wurden 23 der 50 in dieser Arbeit vorgestellten Arten bei EVOTEC OAI im Highthroughput-Screening in verschiedenen Assays

untersucht. Verwendet wurden die Extrakte, die bei unseren Vorversuchen in mehreren Bioassays positiv abschnitten.
Für das aufwändigere Verfahren der HPLC/EVOscreen-Kopplung kamen nur die Extrakte in die nähere Wahl, die sehr deutliche positive Reaktionen in mehreren dc-Bioassays zeigten (insgesamt 3).
Die weiteren Extrakte wurden ohne vorherige HPLC-Trennung als Gesamtmischung dem Caspase-Assay unterworfen.
Es stellte sich heraus, dass besonders mit dem in der vorliegenden Arbeit im Detail beschriebenen HIR-Kinase-Assay sehr gute Ergebnisse bei den Pilzextrakten erzielt werden konnten.
Bei zwei Ethylacetat-Extrakten, dem von *Lenzites betulinus* sowie von *Heterobasidion annosum* wurde ein deutliches Signal detektiert.
Herauszustellen ist hierbei, dass der letztgenannte Baumpilz *Heterobasidion annosum* bereits in den bei uns durchgeführten Assays als deutlich positiv auffiel und für weitere Strukturaufklärungsarbeiten herangezogen wurde.

Es ist also erfolgreich gelungen, durch die Durchführung der bei uns entwickelten Testsysteme auf biologische Aktivität eine effektive und sinnvolle Vorauswahl derjenigen Organismen zu treffen, die dem HTS zugeführt werden sollen, obwohl z.T. gegen ganz unterschiedliche Aktivitäten geprüft wurde (Enzymhemmung bei EVOTEC OAI vs. antibakterielle Aktivität bei uns).
Darüber hinaus sind die positiven Effekte des Baumpilzes *Heterobasidion annosum* hinsichtlich der pharmakologischen Bedeutung von besonderem Interesse.

Bioaktive Komponente in Heterobasidion annosum

Bei der Durchführung der Bioassays fiel der Baumpilz *Heterobasidion annosum* besonders ins Auge, da er sowohl im Extrakt, als auch im Wasserdampfdestillat eine Reihe bioaktiver Zonen aufwies.
Nach säulenchromatografischer Fraktionierung und dc-Auftrennung eines Ethylacetatextraktes von *Heterobasidion annosum* gelang es, durch entwickelte „in situ"-Bioassays entsprechende bioaktive DC-Zonen zu detektieren. Diese wurden mittels HPLC auf Reinheit hin überprüft und einer HPLC/MS-Analyse unterwofen.
Nur eine Zone der SC-Fraktion 5 (DC Rf 0,32), die starke Aktivität im DPPH- und Cholinesterasetest zeigte, repräsentierte eine fast reine Verbindung und konnte in relativ aufwändiger Weise mittels präparativer DC in ausreichender Menge für eine detaillierte NMR-Untersuchung gewonnen werden.
Ihre Struktur konnte als die des Fomajorin S bestimmt werden.

Das Molekül wurde von Donelly et.al. 1982 [58, 59] sowie in mehreren Arbeiten von Sonnenbichler 1983 bzw. 1989/1993 [51 – 56] bereits als in dem Pilz vorkommend beschrieben, allerdings wurden diese Untersuchungen an Kulturfiltraten durchgeführt und nicht an dem frisch aus der Natur gesammelten Objekt.
Damit konnten wir beweisen, dass es sich bei dem Fomajorin S nicht um ein bei der Anzucht entstehenden Stoff handelt, sondern um eine nativ im Pilz vorkommende Komponente.
Da in verschiedenen Tests, die von den Arbeitsgruppen um Sonnenbichler durchgeführt wurden, eine antibiotische Aktivität dieser Verbindung gegen antagonistische Pilze, gegen Zellen von Nicotiana tabacum und Picea abies

und auch gegen E. coli nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass der Pilz diesen Stoff zur Abwehr von Feinden produziert.
Umso interessanter ist die Entdeckung, dass man das Fomajorin S auch in Extrakten des Frischmaterials nachweisen kann, was die Überlegung, dass es sich um ein Abwehrstoff des Pilzes handelt noch unterstreicht.
Eine sehr wichtige Entdeckung war diesbezüglich die pharmakologische Aktivität dieser Substanz, hinsichtlich der Cholinesterasehemmung und Hemmung von freien Radikalen.
Daraus könnten weitere Ansatzpunkte für die Überlegung gewonnen werden, auf welche Weise der Pilz seinem Wirt Schaden zufügt, bzw. wie es ihm gelingt, sich so massiv in seiner Umgebung zu behaupten.
Für unseren Forschungsschwerpunkt stand aber vielmehr im Vordergrund, dass Cholinesterasehemmer heute in der modernen Therapie als Antidementiva bei Morbus Alzheimer eingesetzt werden, wobei es sich bei den im Handel befindlichen Arzneistoffen um Alkaloide bzw. Strukturanaloge von Alkaloiden handelt, die aus verschiedenen Pflanzen isoliert wurden.
In der bisherigen Forschung auf diesem Gebiet wurden weder einheimische Pflanzen noch Pilze näher untersucht.
Schon aus diesem Grund ist die Entdeckung einer cholinesterase-hemmenden Wirkung bei Pilzen von Bedeutung.
Weiterhin bemerkenswert ist, dass es sich bei der von uns gefundenen Komponente um eine stickstofffreie Verbindung handelt, sie also nicht zu den Alkaloiden zählt.
Worauf die Enzymhemmung des Fomajorin S zurückzuführen ist, konnte durch unsere Untersuchungen nicht geklärt werden. Da es sich aber bei dieser Komponente um ein Molekül mit einigen reaktiven Gruppen handelt sind unterschiedliche Mechanismen denkbar.

Die gefundene Verbindung könnte aber als Leitstruktur für die Entwicklung weiterer Inhibitoren der Cholinesterase herangezogen werden, da ihre Struktur einige Ansatzpunkte bietet, sie chemisch zu modifizieren.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der „in-situ"-Biotests wurde der Ethylacetatextrakt von *Heterobasidion annosum* in das HTS gegeben und über die NACONA-Einheit im HIR-Kinase-Assay gescreent.
Hierbei stellte sich der Extrakt ebenfalls als aktiv heraus, wodurch wir eindeutig zeigen konnten, wie sinnvoll eine Präselektionierung von Organismen für ein rationelles und effektives Screening sein kann.
Interessant war die Tatsache, dass die bei EVOTEC OAI determinierte Aktivität in einem Bereich im Chromatogramm gefunden wurde, in dem kein UV-aktiver Peak zu detektieren war, d.h. die Verbindung besaß kein Chromophor.
Mittels einer HPLC/ESI-MS-Messung gelang der Nachweis und die Festlegung des Molekulargewichtes dieser Komponente, welches sich jedoch nicht mit den bereits in dem Pilz gefundenen Verbindungen deckt.
Allerdings erlaubten die sehr geringe Menge und schwierige Detektion keine Isolierung dieses Inhaltsstoffes.

4. Zusammenfassung / Summary

Die moderne Analytik von Naturstoffen durch das Highthroughput-Screening (HTS) kann bei einer sinnvollen Auswahl der Untersuchungsobjekte sehr schnell und effizient zur Findung aktiver Organismen führen.

Koppelt man das HTS zusätzlich noch mit einer vorgeschalteten HPLC zur Gewinnung von vorgetrennten Fraktionen der komplexen Gemische, kann man die Effizienz dieser Methode noch erheblich steigern, da man nun in der Lage ist, eine gefundene Aktivität direkt einem Peakcluster oder im Idealfall direkt einem einzelnen Peak zuzuordnen. Der Vorteil dieser Kopplung ist ganz eindeutig darin zu sehen, dass eine somit als aktiv determinierte Komponente wesentlich einfacher und gezielter isoliert werden kann.

Die systematische Suche nach neuen Wirkstoffen mit dieser revolutionären Screening-Technologie führte zur Etablierung eines BMBF-Leitprojektes (Titel: „Validierte Lead/Target-Systeme – eine horizontale integrierte Verbundstruktur zur automatisierten Pharma-Wirkstofffindung“) in dem diese Arbeit angesiedelt war.

Ziel war es nicht nur, dem Screnningsystem möglichst aussichtsreiche Naturstoffextrakte zur Verfügung zu stellen, sondern auch die Anzahl der Organismen, die mit diesem instrumentell und arbeitstechnisch sehr aufwändigen HTS (bzw. HPLC/HTS) untersucht werden sollen, sinnvoll einzugrenzen.

Ein solches Vorscreening kann man durch folgende vier von uns etablierten dünnschichtchromatografischen Bioassays erreichen:

- Cholinesterasehemmung
- DPPH-Aktivtät

- antibakterielle Aktivität gegen Bacillus subtilis, E. coli und S. aureus
- Hämolysetest mittels Blutgelatine

Hierbei wurde durch die Entwicklung und Optimierung von einfach, schnell und vor allem kostengünstig durchzuführenden Tests eine Möglichkeit geschaffen, eine große Zahl an Pflanzen- und Pilzextrakten in kurzer Zeit und ohne großen technischen Aufwand auf ihre pharmakologische Aktivität zu testen.

Die systematische Auswertung der erhaltenen Ergebnisse von 50 durchgeführten „in-situ"-Assays führte dann zu einer gezielten Einschleusung von 23 Extrakten in das HTS. Dabei zeigten 16 Gesamtextrakte, die direkt im HTS vermessen wurden (ohne vorgeschaltete HPLC-Kopplung) eine positive Reaktion im Caspase-Assay; 3 Extrakte wurden wegen ihrer vielversprechenden Ergebnisse im Vorscreening mit den DC-Bioassays schließlich mittels der aufwändigen HPLC/EVOScreen-Kopplung untersucht und waren hier im HIR-Kinase-Assay positiv.

Neben den 50 vorgetesteten Assays gingen jedoch zu Beginn der Kooperation zahlreiche (> 200) Extrakte in das HTS als Gesamtextrakte ein, die jedoch aus - technologisch bedingten - Gründen nur in wenigen Fällen zu reproduzierbaren Ergebnissen führten.

Dieses unbefriedigende Ergebnis führte schließlich zur Etablierung der DC-Bioassays, mit denen wir, wie oben gezeigt, die „Hitrate" deutlich erhöhen konnten und somit die inzwischen etablierte arbeitsintensive Kombination der Screening-Einheit mit vorgeschalteter HPLC effizienter einsetzen zu können.

Neben der konzentrierten Vorauswahl für das HTS bieten diese „in-situ"-Bioassays die Möglichkeit, pharmakologisch aktive Verbindungen zu detektieren und von diesen Strukturinformationen zu sammeln, mit deren

Hilfe Leitstrukturen entwickelt werden, die zu neuen Arzneistoffen führen können.

So gelang uns der Nachweis, die Isolierung und die Strukturaufklärung einer cholinesterase-inhibierenden Verbindung (Fomajorin S) aus dem Baumpilz *Heterobasidion annosum*.

Die „in-situ"-Bioassays auf der DC haben zudem den Vorteil, Bioaktivität auch in der Fraktion leichtflüchtiger Verbindungen (Wasserdampfdestillat) nachweisen zu können, die sich dem HTS entziehen (Verlust bei technischen Einengungsprozessen, Schwierigkeiten mit Assays in wässrigen Medien).

Im Wasserdampfdestillat unseres Baumpilzes konnte eine derartige Aktivität im Cholinesterase- und DPPH-Test nachgewiesen werden und die acht verantwortlichen Komponenten massenspektrometrisch erfasst werden.

Wie sinnvoll ein derartiges Vorscreening durch etablierte DC-Bioassays ist, erwies sich auch daran, dass Extrakte von *Heterobasidion annosum* auch im HTS (HIR-Kinase-Assay) einen positiven Effekt, d.h. eine Inhibierung zeigten, die einem bestimmten Signal im HPLC-(ESI)-MS-Chromatogramm zugeordnet werden konnte.

Summary

The modern analysis of natural products by highthroughput-screening (HTS) could be more faster and efficient by specific selection of the screeningobjects.

A combination of the HTS with a preconnected HPLC-system can increase the effectiveness of this method because of the possibility to directly assign a bioactivity in HTS to a specific HPLC peak. The advantage of this

combination is that isolation of a compound only starts when it has shown activity in HTS previously.

The systematic search for new actives in medicine with this revolutionary screening technology has induced a BMBF-Project (Title: „Validierte Lead/Target-Systeme – eine horizontale integrierte Verbundstruktur zur automatisierten Pharma-Wirkstofffindung“) in which these work was integrated.

The aim was not only to supply as many natural extracts with promising active candidates as possible but also to limit the number of extracts which will be used in the lavish and costly HTS (or HPLC/HTS).

Therefore a prescreening system was established allowing the determination of several bioassays directly on the thin-layer plate as e.g.:

- Inhibition of Cholinesterase
- DPPH-activity
- antibacterial activity with Bacillus subtilis, E. coli and S. aureus
- Haemolytical effects with blood-agar

With the development and improvement of such easy, quick and economical test systems we create a platform to screen a lot of plants and fungi of their pharmacological activity in a short time without expensive technical instruments.

The evaluation of these data of 50 organisms used in these bioassays led to a selective input to the HTS of 23 extracts. 16 total extracts (not preseperated by HPLC) thereof show activity in a caspase-assay. Three further extracts out of the 50 pretested were screened with the combined technique HPLC/HTS because of their strong positive effects in our established “in-situ”-assays on the TLC plates. They also showed significant effects with HIR-kinase-assay.

In addition to these 50 prescreened organisms we tested different total extracts from more than 100 organisms in HTS against the caspase-assay at EVOTEC OAI. However, most of them failed these test due to various technical problems.

Those negative results let us build up our "in-situ"bioassays and in this way we could successfully increase the rate of positive hits by a useful preselection.

Apart from a specific selection for the HTS these bioassays itself offer the possibility to detect active compounds which could be isolated and subjected to structural elucidation in order to find new active lead compounds.

For example in this way we could detect and isolate a cholin-inhibiting compound (Fomajorin S) of the root-rotting fungi *Heterobasidion annosum.*

These "in-situ"bioassays have also the advantage that they can detect bioactivity of volatile compounds gained by hydro distillation, which are not detectable by HTS due to evaporating processes. In the volatile fraction of our fungi we could detect inhibition of the cholinesterase activity and radical capture activity in the DPPH-Test and measure the MS spectra of these eight active compounds.

The meaning of such a pre-screening with TLC-Bioassays was also shown by the positive effect the extract of *Heterobasidion annosum* exhibited in the HTS (HIR-kinase-assay), which allowed to assign the inhibition activity to a specific peak in the HPLC-(ESI)-MS-chromatogram.

5. Material und Methoden

5.1 Verwendete Organismen

5.1.1 Allgemein [60]

Es wurden insgesamt 66 verschiedene Organismen auf ihre Bioaktivität getestet, die in Tabelle 6 aufgelistet sind.

(Die Familien sowie der Autor der Pilze wurden dem derzeit aktuellsten feldmykologischen Bestimmungsbuch von Laux entnommen; die Angaben der untersuchten Pflanzen sind [47] entnommen)

Art	**Familie**
Acer pseudoplatanus *L.*	Aceraceae
Agrocybe praecox *(Pers:Fr.) Fay*	Bolbitiaceae
Angelica sylvestris *L.*	Apiaceae
Azolla filiculoides *Lam.*	Azollaceae
Bjerkandera adusta *(Willd.:Fr.) Karst.*	Polyporaceae
Boletus erythropus *(Fr.:Fr) Krbh.*	Boletaceae
Bulgaria inquinans *(Pers.) Fr.*	Helotiaceae
Cakile maritima *Mill.*	Brassicaceae
Camellia sinensis *L.*	Theaceae
Cantharellus tubeaformis *Fr.*	Cantheraceae
Euphorbia cyparissias *L.*	Euphorbiaceae
Galerina marginata *(Batsch) Kuehn.*	Cortinariaceae
Gloeophyllum odorata *(Wulf.:Fr.) Imaz.*	Polyporaceae
Gloeophyllum sepiarium *(Wulf.:Fr.) Karst.*	Polyporaceae
Grifola frondosa *(Dicks.:Fr.) Gray*	Polyporaceae
Heterobasidion annosum *(Fr.) Bref.*	Bondarzewiaceae
Hygrophorus discoxanthus *(Fr.) Rea* (Syn. . H. cossus)	Hygrophoraceae
Hypericum perforatum *L.*	Hypericaceae
Hypholoma capnoides *(Fr. :Fr.) Kumm.*	Strophariaceae
Hypholoma fasciculare *(Huds.:Fr.) Kumm.*	Strophariaceae

Art	Familie
Hypholoma sublateritium *(Fr.) Quèl.*	Strophariaceae
Impatiens glandulifera *Royle*	Balsaminaceae
Inonotus nodulosus *(Fr.) Karst.*	Hymenochaetaceae
Inonotus obliquus *(Bolt. :Fr.) Pil.*	Hymenochaetaceae
Iris pseudacorus *L.*	Iridaceae
Ischnoderma benzoinum *(Wahlenb.:Fr.) Karst.*	Polyporaceae
Kuehneromyces mutabilis *(Schaeff.:Fr.) Sing&Smith*	Strophariaceae
Laccaria proxima *(Boud.) Pat.*	Tricholomataceae
Lactarius rufus *(Scop. :Fr.) Fr.*	Russulaceae
Lactarius vellereus *(Fr.) Fr.*	Russulaceae
Laetiporus sulphureus *(Bull. :Fr.) Murr.*	Polyporaceae
Langermannia gigantea *(Batsch:Pers.) Rostkov.*	Lycoperdaceae
Lenzites betulinus *(L. :Fr.) Fr.*	Polyporaceae
Lycoperdon perlatum *(Pers.:Pers)*	Lycoperdaceae
Macrolepiota procera *(Scop.:Fr.) Sing.*	Agaricaceae
Macrolepiota rachodes *(Scop.:Fr.) Sing.*	Agaricaceae
Marsilea quadrifolia *L.*	Marsileaceae
Mercurialis perennis *L.*	Euphorbiacea
Meripilus giganteus *(Pers. :Fr.) Karst.*	Polyporaceae
Merulius tremellosus *Schrad. Fr.*	Corticaceae
Nicandra physalodes *(L.) Gaertn.*	Solanaceae
Panellus serotinus *(Pers. :Fr.) Kuehn.*	Tricholomataceae
Panellus stipticus *(Bull.:Fr.) Karst.*	Tricholomataceae
Paxillus involutus *(Batsch. :Fr.) Fr.*	Paxillaceae
Phaeolus schweinitzii *(Fr.) Pat.*	Polyporaceae
Phallus impudicus *L.: Pers.*	Phallaceae
Pholiota lenta (Pers.:Fr.) *Sing.*	Strophariaceae
Piptoporus betulinus (Bull. :Fr.) *Karst.*	Polyporaceae
Psathyrella piluliformis (Bull. :Fr.) *Ort.*	Coprinariaceae
Quercus robur *L.*	Fagaceae

Art	Familie
Russula emetica var. sylvestris *Singer*	Russulaceae
Schizophyllum commune *Fr. :Fr.*	Schizophyllaceae
Scleroderma citrina *Pers*.	Sclerodermataceae
Scytinostroma portentosum *(Berk.+Cut. apnd Berk.) Donk*	Lachnocladiaceae
Stereum hirsutum *(Willd.) Pers.*	Corticiaceae
Stropharia aeruginosa *(Cke.) Ort.*	Strophariaceae
Tabebuia impetiginosa *(Martius Ex DC) Stadley*	Bignoniaceae
Thelephora palmata *Scop.:Fr.*	Thelephoraceae
Trametes gibbosa *(Pers.:Fr.) Fr.*	Polyporaceae
Trametes versicolor *(L.) Pil.*	Polyporaceae
Tricholoma basirubens *(Bon) A.Riva & Bon*	Tricholomataceae
Tricholomopsis rutilans *(Schaeff. :Fr.) Sing.*	Tricholomataceae
Tyromyces stipticus *(Pers.:Fr.) Kotl.&Pouz*	Polyporaceae
Vinca minor *L.*	Apocynaceae

Tabelle 6: Bezeichnung und Systematik der verwendeten Organismen

5.1.2 Herkunft

Alle bearbeiteten Pilze wurden im norddeutschen Raum, speziell dem Hamburger Umland gesammelt.
Die untersuchten Objekte von *Heterobasidion annosum* stammen zum überwiegenden Teil aus dem „Ohe Moor“ einem Waldstück im Nordosten von Hamburg.
Die Sammlung der Pilze erfolgte über einen Zeitraum von 3 Jahren (1998 bis 2001).

5.1.3 Mikroskopische Bestimmung von *Heterobasidion annosum*[61]

Verwendetes Mikroskop: Olympus BX 51 mit Fluoridobjektiven und differentiellem Interferenzkontrast (DIC) (nach Nomarski)

Farbreaktion: a) 0,05 g Baumwollblau in 30 ml Milchsäure 80-85%

b) Amyloidreaktion mit Meyers Reagenz:

20 ml Wasser, 1,5 g Kaliumiodid, 0,5 g Iod mischen, nach Lösung der Feststoffe Zugabe von 20 g Chloralhydrat

Kamera: Spiegelreflexkamera von Minolta Dynax 5

5.2 Verarbeitung des Pilzmaterials

5.2.1 Aufarbeitung und Lagerung

Die gesammelten Pilze wurden zunächst von Hand gereinigt, wobei versucht wurde die Organismen weitgehend intakt zu belassen, um eventuelle chemische Reaktionen zu verhindern.
Nach der Säuberung wurden die Pilze gewogen und ohne weitere Zerkleinerungsschritte bei –18°C eingefroren, wenn zunächst keine weitere Verarbeitung erfolgte.

5.2.2 Extraktionsmethoden

Für die geplanten Untersuchungen auf Bioaktivität wurden die Pilze wieder aufgetaut. Ein Teil wurde bei 40°C im Trockenschrank 24h getrocknet.
Je 50,0 g der getrockneten, als auch der aufgetauten Pilze wurden mit je 100,0 –150,0 ml Pentan, Methanol oder Ethylacetat versetzt.
Diese Ansätze wurden 2 Stunden bei 50 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.
Die so gewonnenen Extrakte wurden filtriert, mit Na_2SO_4 getrocknet und anschließend bei 40°C am Rotationsverdampfer auf ca. 10 ml eingeengt.
Diese Extrakte dienten direkt als Untersuchungslösungen.

5.2.3 Wasserdampfdestillation[62]

Für die Gewinnung der flüchtigen Bestandteile der Pilze wurden Wasserdampdestillate erzeugt.
Hierzu wurde eine 1963 nach Sprecher modifizierte Rücklaufapparatur verwendet.
Je nach verfügbarer Menge der Organismen wurden bis zu 300,0 g eingewogen und mit ca. 1l Wasser versetzt.
Als Destillationsvorlage wurden 1-2 ml Pentan verwendet.
Die Destillation wurde 4 Stunden lang aufrecht erhalten.
Die so erzeugten Destillate konnten nach Einengen auf ca. 0,5 ml für das Biotestscreening genutzt werden.

5.3 Chromatographische Trennmethoden

5.3.1 Dünnschichtchromatografie (DC)

5.3.1.1 Material

Die Überprüfung der Untersuchungslösungen und die Durchführung der Bioassays erfolgte auf DC-Platten mit Normalphasen-Kieselgel (Kieselgel 60 F_{254} ; Merck) oder HPTLC-Platten (HPTLC Kieselgel 60 F_{254}; Merck) von je 10 x 10 bzw. 10 x 20 cm Größe und einer Schichtdicke von
0,25 µm.
Zur Substanzisolierung wurden semipräparative 20 x 20 cm Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (PSC-Platten Kieselgel 60 F_{254}, 0,5mm Schichtdicke; Merck) gewählt.

Bioaktive Banden wurden mit einem Spatel ausgekratzt und mit Ether desorbiert. Das Kieselgel wurde anschließend abfiltriert und der Ether ohne Wärmeeinwirkung am Rotationsverdampfer abgezogen.

5.3.1.2 Fließmittelsysteme

Als Laufmittel für die Extrakttrennungen wurde ein Gemisch aus 3T Dichlormethan, je 1T Ethylacetat und Methanol und 5T Hexan gewählt. Die Auftragemengen variierten zwischen 5 und 25µl.
Für die Bioautographie der Wasserdampfdestillate wurde eine Mischung aus Toluol/Ethylacetat 93/7 als Fließmittel gewählt.

5.3.1.3 Instrumentelle DC

Zum bandenförmigen Auftragen der Untersuchungslösungen auf die Dünnschichtplatten wurde ein ATS3-Probenautomat (Versionsnummer 2.13.01) verwendet, zur Auswertung der in-situ-UV-Spektren konnte ein TLC-Scanner (Versionsnummer 1.14.06) genutzt werden. Bei den von uns durchgeführten Messungen stellten die folgenden Parameter eine gute Grundlage für solide und wiederholbare Daten dar:

Messwertauflösung:	50µm
Messgeschwindigkeit:	20 mm/s
Spektrenmessgeschwindigkeit:	20 nm/s
Peakschwelle Höhe:	10 Absorptionseinheiten
Peakschwelle Fläche:	50
Peakschwelle Steigung:	5
Filterfaktor:	3
Datenreduktionsfaktor:	1

Beide Geräte wurden mit entsprechender Software von der Firma CAMAG im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.
Die entwickelten Platten wurden mit Hilfe des ProViDoc VD 40 (Programmversion 3.01.510) Dokumentationssystems der Firma DESAGA aufgenommen und ausgewertet.

5.3.2 Säulenchromatographie (SC)

Zur groben Vortrennung der komplex zusammengesetzten Extrakte in einfacher zusammengesetzte Fraktionen wurden 2 ml des Extraktes auf eine mit Kieselgel gefüllte Säule (ICN Silica TSC, 60A, ICN Biomedicals, Säulendurchmesser 2 cm, Füllhöhe 10 cm) gegeben und mit je 50 ml Elutionsmittel (Pentan-Ethylacetat-Gemische) steigender Polarität von 100 % Pentan in 11 Abstufungen zu 0 % Pentan wieder ausgewaschen. Die gewonnen Eluate wurden über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 5 ml eingeengt. Auf diese Art wurden 11 Fraktionen erhalten.

5.3.3 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC-Chromatogramme wurden mit einer Merck Hitachi LaChrom-Anlage aufgenommen. Diese besteht aus den folgenden Einzelkomponenten:

Interface	D-7000
DAD	L-7455
Autosampler	L-7200
Pumpe	L-7100

Als Säule wurde eine Bischoff LiChroSpher 100 RP Säule verwendet mit 5 µm-Partikel und 125 x 2,0 mm Maßen, wodurch die Kompatibilität mit der HTS gekoppelten HPLC der Firma EVOTEC OAI gegeben war.
Zur Elution wurde ein ebenfalls kompatibler Standardgradient verwendet,
Die Laufmittel setzen sich zusammen aus :

A) 95% Wasser/ 5% Acetonitril/ 0,1% Ameisensäure und

B) 5% Wasser/ 95% Acetonitril/ 0,1% Ameisensäure.

Damit wird der folgende Gradient gefahren:

Time (min)	**A (%)**	**B (%)**
0,00	100	0
15,00	0	100
20,00	0	100
21,00	100	0
33,00	100	0

Flow: 0,4 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

5.3.4 Gaschromatographie (GC)

Nachfolgend in Tabelle 7 werden die Parameter der GC-Untersuchungen aufgeführt:

Gerät	*HP 6890 Series*	*HP 5890 Series II*
Säule	J&W DBWax EN 30m x 0,25 mm i.D. df 0,25 µm	Phenomenex ZB-1 30m x 0,25 mm i.D. df 0,25 µm
Trägergas	Stickstoff	Stickstoff
Flow	0,7 ml/min	0,7 ml/min
Injektor	Split	Split
Temperaturprog.	45°C-240°C/3 min 40 min halten bei 240°C	45°C-240°C/3 min 40 min halten bei 240°C
Injektortemp.	200°C	200°C
Detektor	FID	FID
Injektionsvolumen	1µl	1µl

Tabelle 7: Gaschromatographische Parameter

5.4 Spektroskopische Methoden

5.4.1 Massenspektrometrie (MS)

Die EI-Spektren wurden an einem Varian-Gerät MAT 311 A durch Direkteinlass erzeugt. Die Einlasstemeperatur betrug 280°C, die Ionenquelltemperatur lag bei 200°C, die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

Für die ESI-Spektren konnte ebenfalls ein Varian-Gerät des Typs MAT 95 XL Trap genutzt werden.
Nachfolgend werden die Messbedingungen tabellarisch aufgeführt (Tabelle 8):

Massenspektrometer	MAT 95 XL Trap Beschleunigungsspannung 5kV Auflösung 1500 (bzw bei Hochauflösung 4600, 9000, 11000) Scanbereich m/z 40-800 mit 3 s/Massendecade
Elektrospray	API III ESI-Einrichtung Positive Ionen Heated capillary bei 230°C ESI-Spannung 3,2 kV
Probenzufuhr	Havard-Spritzenpumpe 5µl/min Methanol/Wasser 1:1 mit 5% Diethylether

Tabelle 8: Messbdingungen der massenspektrometrischen Untersuchungen

5.4.1.1. GC/MS-Kopplung

Die GC/MS-Messungen wurden an einer Hewlett-Packard-Anlage mit den unten genannten Parametern durchgeführt (Tabelle 9):

Gaschromatograph	HP5890 Series II
Massenspektrometer	MSD HP 9570 B
Säule	J&W DBWax 60m x 0,25 mm i.D. df 0,25 µm
Trägergas	Helium
Flow	0,9 ml/min
Injektor	Split 1:17
Temperaturprogramm	45°C-220°C 3°C/min; bei 220°C halten für 20 Min.
Injektortemperatur	200°C
Ionenquelltemperatur	220°C
Injektionsvolumen	1µl
Ionisationsenergie	70 eV

Tabelle 9: Parameter der GC/MS-Kopplungsexperimente

5.4.1.2. HPLC/MS-Kopplung (LC/MS)

Die Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer erfolgte an einem Hewlett-Packard Gerät der Serie 1100. Die Spektrenaufnahme wurde sowohl im ESI-, als auch im APCI-Mode durchgeführt.
Die Auswertung und Bearbeitung der Chromatogramme und ihrer zugehörigen Spektren erfolgte mit Hilfe der HPChemStation-Software.
Der HPLC-Gradient entsprach dem oben genannten Gradienten.
Die Fragmentorspannung im MS variierte zwischen 40 und 120 eV.

5.4.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektren wurden mit den Geräten AMX 400 und DRX 500 der Firma Bruker aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „WIN-NMR 61“ und „2D-WIN-NMR“ der Firma Bruker. Als interner Standard wurde TMS verwendet. Als Lösemittel wurde d-DMSO verwendet.

5.4.3 Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarot-Spektren wurden an einem Perkin-Elmer 841 Gerät durchgeführt.
Als Trägematerial wurden KBr-Presslinge erzeugt.

5.5 Bioaktivitätsbestimmungen

5.5.1 Highthroughput-Screening (HTS)

Das HTS wurde auf Anlagen der Firma EVOTEC OAI, Hamburg durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die EVOScreen Einheiten Mark II bzw. Mark III. Gekoppelt waren diese Screeninganlagen mit einer HPLC mit Fraktionssammler (NACONA-Einheit), über den das ankommende Elutionsmittel auf Nanotiterplatten zum anschließenden Screening verteilt wird.

Assay: Humaner Isulinrezeptor-Kinase-Assay

Bedingungen: Inkubation nach Enzymzugabe 60 min bei 25°C
Reaktionsstop durch Zugabe von 10mM EDTA
Detektion mittels 2D-FIDA Anistropy bei 633nm
Assaypuffer 50mM Hepes (pH 7,3);
0,1% Pluronic F127, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT

HPLC-Parameter: Säule: Bischoff LiChroSpher 100 RP, 5µm-Partikel
125 x 2,0 mm

Laufmittel: A) 95% Wasser/ 5% Acetonitril/
0,1% Ameisensäure

B) 5% Wasser/ 95% Acetonitril/
0,1% Ameisensäure

Gradient:

Time (min)	A (%)	B (%)
0,00	100	0
15,00	0	100
20,00	0	100
21,00	100	0
33,00	100	0

Injektionsvolumen: 10 µl

Flow: 0,4 ml/min

5.5.2 Dünnschichtchromatografische Bioassays

Im Folgenden werden die entwickelten dünnschichtchromatografischen Bioassays und die hierzu benötigten Reagenzien und Materialien aufgelistet:

1. <u>Cholinesterasehemmtest</u>

Chemikalien: Cholinesterase vom Pferd; Fa. Merck
Kälberserum; Fa. Merck
Naphthylacetat; Fa. Acros
Echtblausalz B; Fa. Acros
Ethanol 99,9%
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid; Fa. Merck

Chromatografie :	10 x 10 cm TLC-Platten Si F60 254 nm eindimensionale DC
Cholinesteraselösung:	11 mg Cholinesterase in 180 ml 0,05M TRIS-HCl-Pufferlösung pH 7,8 lösen; Zugabe von 0,1% Kälberserum zur Stabilisierung; Haltbarkeit 3 Wochen bei +4°C
Substratlösung:	1. 250 mg Naphthylacetat in 100 ml Ethanol 2. 400 mg Echtblausalz B in 160 ml dest. Wasser
Tauchlösung:	1 Teil Lösung 1 und 4 Teile Lösung 2 werden direkt vor der Benutzung gemischt
Durchführung:	Nach der Trennung wird das Chromatogramm 3 min. im warmen Luftstrom mittels eines Föns getrocknet. Anschließend wird die Platte mit der Cholinesteraselösung besprüht, getrocknet und dann bei 37°C und 90% rel. Feuchte 30 min. inkubiert. Dazu wird ein befeuchtetes Filterpapier (20 cm Durchmesser, 5 ml Wasser) in einem geeigneten Gefäß (Petrischale) mit in den Trockenschrank gelegt.

Nach der Inkubation wird die Platte mit der Substratlösung besprüht. Nach ca. 3 min. werden inhibierend wirkende Flecken als weiße Zonen auf violettem Grund sichtbar.

2. DPPH-Test auf Hemmung freier Radikale

Chemikalien: 2,2-Bis-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-1-picryl-hydrazyl (DPPH); Fa. Sigma-Aldrich
Aceton

Sprühlösung: 5 mg DPPH in 10 ml Aceton Entwicklung wird das Chromatogramm getrocknet und dann mit der DPPH-Lösung gleichmäßig besprüht.
Anschließend wird die Platte für 30 min. bei 37°C im Trockenschrank inkubiert.
Aktive Zonen werden als weiße Flecken auf violettem Grund sichtbar.

3. Bacillus subtilis Test auf antimikrobielle Aktivität

Chemikalien: ChromBiodip® Antibiosetest Firma Merck KgA bestehend aus:
Nährmedium, Bacillus subtilis- Sporensuspension und MTT-Nachweisreagenz (Thiazolblau)
Aqua bidest.

Tauchlösung: 200 ml Aqua bidest. werden mit dem Nährmedium in einem Erlenmeyerkolben 10 min. aufgekocht, bis eine klare, partikelfreie Lösung entstanden ist. Nach Abkühlen der Nährlösung auf Raumtemperatur wird diese mit der Sporensuspension angeimpft. Die so erzeugte Mikroorganismenlösung (MO-Lösung) wird 4 Stunden bei 25°C im Trockenschrank bebrütet.

Sprühlösung: Das MTT-Nachweisreagenz wird in 20 ml Wasser gelöst.

Durchführung: Das entwickelte, getrocknete Chromatogramm wird für ca. 2 sec. in die Tauchlösung, die sich in einer entsprechenden Tauchkammer befindet, eingetaucht. Anschließend wird überschüssige MO-Lösung von der Plattenunterseite entfernt und die Platte in eine, mit feuchtem Filterpapier (Filter 20 cm Durchmesser, 5 ml Wasser) ausgelegte, Aufbewahrungsbox auf einen Abstandshalter

gelegt. Die Aufbewahrungsbox wird dann bei 37°C für 19 Stunden in den Trockenschrank zum Bebrüten gegeben, wobei das Gefäß leicht schräg gestellt werden muss, damit überschüssige MO-Lösung zum oberen, nicht chromatografierten Rand ablaufen kann. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Platte entnommen und eventuell vorhandene Feuchtigkeitsflecken am Plattenoberrand entfernt. Anschließend wird das Chromatogramm mit dem MTT-Reagenz bis zur leichten Gelbfärbung der Platte besprüht. Die besprühte Platte wird dann wieder in die Aufbewahrungsbox zurückgelegt. Inhibierend wirkende Zonen werden nach 5–30 min. als weiße Flecken auf violettem Untergrund sichtbar.

4. Agardiffusionstest auf antibakterielle Aktivität

Chemikalien: NI-Agar = Standard I-Nähragar (Merck®), 37g/l in Milipore-Reinstwasser

Bakteriensuspension: Kolonien von Escherichia coli und Staphylococcus aureus werden in 4,5 ml steriler, isotonischer Kochsalzlösung bis zur leichten Trübung eingerührt (McFarland); photometrische Einstellung auf McFarland 0,5 (= 10^8 KBE/ml) bei 550nm Absorption von $0{,}125^{+}/-\ 0{,}02$

Durchführung: Für den Agardiffusionstest werden mittels eines sterilen Wattestäbchens der sterile McFarland-Ansatz in 3 verschiedenen Richtungen auf dem Nährmedium in der Petrischale ausgestrichen.

Von den zu untersuchenden Extrakten bzw. Fraktionen werden 50,0 µl in ein kleines Vial abpipettiert. Diese Menge wird nun auf ein kreisrundes Filterpapier von ca. 6 mm Durchmesser und 0,7 mm Schichtdicke durch 6-maliges eintauchen in die Lösung aufgebracht und das Lösemittel vollständig abgedunstet.

Die getränkten Filterpapiere werden jetzt auf den beimpften Agar in der Petrischale

aufgelegt ohne das Nährmedium zu beschädigen. Die Petrischalen werden dann für 18 $^{+}/-$ 2 Stunden bei 36 $^{+}/-$ 1°C im Wärmeschrank inkubiert.

Die Auswertung erfolgt visuell durch Ausmessen der Hemmhofgröße um das Filterpapierplättchen herum mit dem Hemmhof eines genormten, mit Gemifloxacin 5µl beschichteten Filterpapiers.

5. <u>Blutgelatinetest auf hämolysierende Substanzen</u>

Chemikalien: Ethanol 70% (V/V)
Gelatine
isotonische Phosphatpufferlösung
Konservenblut

Pufferlösung: 40,08 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O
4,36 g $Na_2H_2PO_4$ x 2 H_2O
0,74 g NaCl
alle drei Bestandteile werden genau gewogen und 160 ml Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst. Nach Abkühlen wird auf 1000,0 ml mit Wasser ergänzt. Der pH-Wert sollte jetzt bei 7,4 liegen.

Blutgelatine:	4,6 g Gelatinepulver werden mit 100 ml isotonischer Phosphatpufferlösung versetzt. Nach 30 min. Quellungszeit wird die Gelatine durch leichtes Erwärmen im Wasserbad gelöst, danach wird die Lösung auf unter 40°C heruntergekühlt. Ist diese Temperatur erreicht, werden unter ständigem Rühren 20 bis 30 ml Blut zugegeben. Das Blut stammt aus der Blutbank des Universtätsklinkums Hamburg-Eppendorf
Durchführung:	Die entwickelten und vollständig vom Laufmittel befreiten Dünnschicht-chromatogramme werden bis zur vollständigen Benetzung mit der Phosphatpufferlösung besprüht und anschließend in eine große Petrischale gelegt. 25 ml der abgekühlten, aber noch fließfähigen Blutgelatine werden über die Platte gegossen, so dass die Oberfläche gleichmäßig bedeckt ist. Neben die Platten werden befeuchtete Filterpapierstreifen gelegt und die Petrischale, mit einem Deckel verschlossen, im Kühlschrank auf-bewahrt. Die Auswertung erfolgt ca. 12 Stunden später. Dazu werden die Petrischale von unten

gegen das Licht betrachtet betrachtet und mit dem ProViDoc aufgenommen. Positive Zonen sind als helle Hemmhöfe erkennbar.

6. Gefahrstoffanhang

Chemikalie	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, X_i	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Ascorbinsäure	/	/	/
Ameisensäure	C	35	23.2-26-45
Benzol-D6	F, T	45-11-E48/23/24/25	53-45
Chloramphenicol		45-46-63-42/43	45-36/37/39
Cholinesterase	/	/	/
Dichlormethan	X_n	40	23.2-24/25-36/37
DMSO	X_i	36/38	26
DPPH		20/21/22-36/38-43	26-36
Echtblausalz B	X_n	22-41	22-26-39
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F, X_i	11-36-66-67	16-26-33
Hexan	F, X_n, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Hydrochinon	X_n, N	22-40-41-43-50	26-36/37/39-61
Kälberserum			
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
MTT-Reagenz		46-20/21/22	45-36/37/39-22-3/7
Naphthylacetat			23-24/25
Pentan	F_+, X_n, N	12-51/5365-66-67	9-16-29-33-61-62
Physostigmin	T	26/28	25-45
Resorcin	X_n, N	22-36/38-50	26-61
Rutin	/	/	/
Streptomycin	T	61-22	53-36/37/39-45
Toluol	F, X_n	11-20	16-25-29-33
TRIS-HCl	X_i	36/38	/

Tabelle 10: verwendete Gefahrstoffe mit Gefahrensymbolen und zugehörigen R- und S-Sätzen

7. Literatur

1. Weber, H., *Allgemeine Mykologie*. 1993: Gustav Fischer Verlag.
2. Schwantes, H.O., *Biologie der Pilze*. 1996: Ulmer TB.
3. Agerer, R., *Mykologie-warum?* Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Mykologie; Müchen, 2001.
4. Sitte, P., et al., *Strassburger-Lehrbuch der Botanik*. Vol. 35. 2002, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademische Verlag.
5. Hanssen, H.-P., *Ganoderma.* Deutsche Apothekerzeitung, 1988. **15**: p. 789-792.
6. Wagner, H., *Pharmazeutische Biologie Band 2; Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*. Vol. 6. 1999, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
7. Lindequist, U., et al., *Neue Wirkstoffe aus Pilzen des Meeres.* Zeitschrift für Phytotherapie, 1999. **20**: p. 29-36.
8. Lindequist, U., E. Teuscher, and G. Narbe, *Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten.* Zeitschrift für Phytotherapie, 1990. **11**: p. 139-149.
9. Molitoris, H.P., *Pilze als Heilpflanzen in der Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft.* forum mikrobiolgie, 1978. **1/78**: p. 11-18.
10. Frohme, D. and U. Jensen, *Systematik des Pflanzenreiches*. Vol. 5. 1998, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
11. Turner, R., S. Sterrer, and K.-H. Wiesmüller, *High-Throughput Screening*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 1999, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
12. Schultze, W. and B. Lindemann, *Suche nach pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffen in einheimischen Pflanzen.* uniHH Forschung, Beiträge aus der Universität Hamburg, 1998. **32**: p. 45-50.
13. *HTS mit Naturstoffen.* LaborPraxis, 1999: p. 158-160.
14. Elson, E.L. and D. Magde, *Fluorescence Correlation Spectroscopy I, Conceptual Basis and theory.* Biopolymers, 1974. **13**: p. 1-27.
15. Krietsch, T., S. Sterrer, and T. Schönknecht, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS): Ein neues analytisches Verfahren zur Charakterisierung molekularer Wechselwirkungen.* DGZ-Mitteilungen, 1996. **1**: p. 21-24.
16. Sterrer, S. and K. Henco, *Fluorescence Correlation Spectroscoy (FCS) - a highly sensitive method to analyze drug/target interactions.* J. Receptor & Signal Transduction Res., 1997. **17**: p. 511-520.
17. *Screening*, in *Naturstoff-Römpp*, ThiemeVerlag Stuttgart.
18. Wagner, H., *Neue Arzneistoffe durch modernes Pflanzensreening.* Pharmazeutische Zeitung, 1998. **27**: p. 2344.
19. Cox, P.A. and M.J. Balick, *Neue Medikamente durch ethnobotanische Forschung*, in *Pharmaforschung*. 1994, Spektrum Akademischer Verlag. p. 20-26.
20. Hostettmann, K., *Moderne Aspekte der Naturstoffforschung.* Deutsche Apothekerzeitung, 1997. **41**: p. 3594-3596.
21. Hamburger, M. and K. Hostettmann, *Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine.* Phytochemistry, 1991. **30**: p. 3864-3874.
22. Stalpers, J.A., *The Aphyllophoraceous Fungi III - Key to the species of the Hericiales*. Studies in Mycology, ed. C.v. Schimmelcultures. Vol. 40. 1996: Baarn und Delft.

23. Butin, H., *Krankheiten der Wald- und Parkbäume*. 1996, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
24. Breitenbach, J. and F. Kränzlin, *Pilze der Schweiz, Bd. 2; Nichtblätterpilze*. 1986, Luzern: Verlag Mykologia.
25. Kirk, P.M., et al., *Dictionary of Fungi*. Vol. 9. 2001, Wallingford: CAB International.
26. Jahn, H., *Pilze an Bäumen*. 1990: Patzer Verlag.
27. Schwerdtfeger, F., *Die Waldkrankheiten*. 1981: Parey.
28. Anwer, U., *Dünnschichtchromatographische Pilzdiagnostik*. 1980, TU München.
29. Williams, D.H. and I. Fleming, *Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung*, Stuttgart: Thieme.
30. Kline, R.M. and T. Golab, *A simple technique in developing thin-layer bioautographs.* Journal of chromatography, 1965. **18**: p. 409 - 411.
31. Homans, A.L. and A. Fuchs, *Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances.* Journal of chromatography, 1970. **51**: p. 327-329.
32. Begue, W.J. and R.M. Kline, *The use of tetrazolium salts in bioautographic procedures.* Journal of chromatography, 1972. **64**: p. 182 - 184.
33. Mendoza, C.E., *Thin-layer chromatography and enzyme inhibition techniques.* Journal of chromatography, 1973. **78**: p. 29 - 40.
34. Weins, C. and H. Jork, *Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography.* Journal of chromatography, 1996. **A 750**: p. 403-407.
35. Rhee, K., et al., *Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining.* Journal of chromatography A, 2001. **915**: p. 217-223.
36. Forth, Henschler, and Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 8. 2001, München: Urban & Fischer.
37. Hunnius, *Pharmazeutisches Wörterbuch*. Vol. 7. 1993, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
38. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*. Vol. 257. 1994, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
39. Hwang, B.Y., *Antioxidant Benzoylated Flavan-3-ol Glycosides from Celastrus orbculatus.* Journal of natural products, 2001. **64**: p. 82-84.
40. Koch, A. and R. Richter, *mündliche Mitteilung über die Verwendung des Tests auf der DC*: Hamburg.
41. Sievers, A., et al., *Simple thin-layer chromatographic test for antioxidative compounds using DPPH assay.* CBS Camag Bibliography service, 2002. **88**: p. 14-15.
42. Takao, T., et al., *A simple Screening method for antioxidants and Isolation of several antixoidants produced by marine bacteria from fisch and shellfish.* bBiosci. Biotech. Biochem., 1994. **58 (10)**: p. 1780-1783.
43. Seeger and Wiedemann, *Zum Vorkommen von Hämolysinen und Agglutininen in höheren Pilzen (Basidiomyceten).* Arch. Toxicol., 1972. **29**: p. 189-217.
44. Winterstein, D., *Hämolysine in Pilzen.* Der Tintling, 2000. **4**: p. 10-26.
45. Wichtl, M., *Die pharmakognostische Analyse*. 1971, Frankfurt am Main: Akademischer Verlag. 82-83.

46. Fugmann, B., B. Lang-Fugmann, and W. Steglich, *Römpp Lexikon Naturstoffe*. Vol. 10. 1997, Stuttgart: Thieme-Verlag.
47. Schmeil and Fitschen, *Flora von Deutschland*. Vol. 89. 1993: Quelle & Meyer Bestimmungsbücher.
48. Wichtl, M., *Teedrogen und Phytopharmaka*. Vol. 3. 1997, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
49. Schauer, D.T. and C. Caspari, *Der grosse BLV Pflanzenführer*. Vol. 8. 2001, München: BLV Verlagsgesellschaft.
50. Donelly, D.M.X. and D.J. Coveney, *Antibacterial sesquiterpene aryl esters from Armillaria mellea*, in *Biologically active natural products*, K. Hostettmann and P.J. Lea, Editors. 1987, Clarendon Press, Oxford. p. 19-32.
51. Peipp, H., *Isolierung und Charakterisierung toxischer Metabolite aus den forstpathogenen Pilzen Armillaria ostoyea, Heterobasidion annosum und Gleophyllum abietinum und Untersuchungen zur Synthesestimulation dieser Stoffe in Gegenwart von Wirtszellen (Fichten) oder von antagonistischen Pilzen*. 1992, Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 145.
52. Sonnenbichler, J., et al., *Isolation of antibiotic compounds from cultures of Heterobasidion annosum synthesized in the presence of antagonistic fungi or host plant cells.* Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1989. **370**: p. 1295-1303.
53. Zweimüller, M., *Untersuchungen zur Biotransformation von Fomannoxin durch Koniferenzellkulturen und Charakterisierung eines Fomannoxin-detoxifizierenden Enzyms aus Pinus sylvestris*. 1995, Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 140.
54. Dietrich, J., *Biologisch aktive Pilzmetabolite aus den Basidiomyzeten Heterobasidion annosum und Gleophyllum abietinum. Untersuchung zur Induktion ihrer Synthese und zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen*. 1992, Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 141.
55. Sonnenbichler, J., et al., *Synthesis of compounds with structural similarities to the toxic metabolites of the pathogenic fungus Heterobasidion annosum and investigation of their antibiotic activities.* Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1993. **374**: p. 1047-1055.
56. Sonnenbichler, J., et al., *A cyclopentabenzopyranone produced by the fungus Heterobasidion annosum in dual cultures.* Phytochemistry, 1983. **22**(6): p. 1489-1491.
57. Sonnenbichler, J., H. Peip, and J. Dietrich, *Further Metabolites from Dual Cultures of the antagonistic Basidiomycetes Heterobasidion annosum and Gloeophyllum abietinum.* Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1993. **374**: p. 467-473.
58. Donelly, D.M.X., et al., *Dihydrobenzofurans from Heterobasidion annosum.* Phytochemistry, 1988. **27**(8): p. 2709-2713.
59. Donelly, D.M.X., et al., *Fomajorin S and D from Fomes annosus.* Tetrahedron Letters, 1982. **23**(51): p. 5451-5452.
60. Laux, H.E., *Der große Kosmos Pilzführer*. 2001: Franckh-Kosmos Verlag.
61. Erb, B. and W. Matheis, *Pilzmikroskopie*. 1983, Stuttgart: Franck Kosmos.
62. Sprecher, E., *Rücklaufapparatur zur erschöpfenden Wasserdampfdestillation ätherischen Öls aus voluminösem Destillationsgut.* Deutsche Apothekerzeitung, 1963. **103**: p. 213.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 19.1.2004

Astrid Sievers

Lebenslauf

Name:	Astrid Sievers
Geburtsdatum:	27. September 1974
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung

1980-1984	Besuch der Grundschule Nettelnburg, Hamburg
1984-1994	Besuch des Luisen-Gymnasiums Bergedorf, Hamburg
1994	Abitur ebenda
1994-1998	Pharmaziestudium an der Universität Hamburg
02.-08.1999	Pharmaziepraktikum GlaxoWellcome, Bad Oldesloe
08.1999- 01.2000	Pharmazieprakikum Löwen-Apotheke Bergedorf, Hamburg
16.02.2000	Approbation als Apothekerin
03.2000	Beginn der Dissertation am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie der Universität Hamburg
10.2000-09.2002	Stipendiant der Landesgraduiertenförderung Hamburg
04.2000-06.2003	Teilzeitbeschäftigung in der Oldenfelder Apotheke, Hamburg
seit 09.2003	wiss. Mitarbeiterin bei der Firma Hermal, Reinbek

Astrid Sievers