Zusammenfassung

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-Aktivität
- 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 DCBioassays, 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.