

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

2004 721

int.Cl.³

3(51) C 12 Q 1/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q/ 2314 847

(22) 06.07.81

(44) 04.05.83

- (71) PAEDAGOGISCHE HOCHSCHULE "WOLFGANG RATKE" KOETHEN;DD;
(72) KRAMER, CLAUS-RUEDIGER,DR. SC. NAT. DOZ.;BORNS, EIKE,DR. RER. NAT.;
BOEHM, HEINZ,PROF. DR. SC. NAT.;DD;
(73) siehe (72)
(74) DR. KRAMER, CLAUS-R. 4090 HALLE-NEUSTADT BLOCK 216/2

(54) **VERFAHREN ZUR DIFFERENZIIERTEN SELEKTION VON EFFEKTOREN MITTELS AUTOTROPHER ZELLSUSPENSIONEN**

(57) Die Erfindung „Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren mittels autotropher Zellsuspensionen“ dient der Suche nach Pflanzenschutzmitteln und nach Effektoren biologischer Prozesse. Sie verfolgt das Ziel, möglichst in einem Arbeitsgang die Ergebnisse von Tests mit autotrophen Zellsuspensionen auszuwerten und dabei primäre Photosyntheseeffektoren von primär nichtphotosynthetischen Effektoren zu trennen. Die Erfindung basiert auf einem Auswertungsverfahren, das die optischen Eigenschaften substanzbehandelter autotropher Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen nutzt und deren substanzinitiierte Variation mit Hilfe der Spektralkolorimetrie, der Spektralphotometrie oder der Nephelometrie bei 2 bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich erfaßt und vergleichend betrachtet. Das Verfahren wird an 7 Zeichnungen erläutert.

231484 7

1

Titel der Erfindung

Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren
mittels autotropher Zellsuspensionen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Suche nach Regulatoren biologischer Prozesse, Naturstoffchemie

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß der Einfluß chemischer Substanzen auf biologische Prozesse auf vielfältige Weise geprüft werden kann. Als Indikatoren lassen sich auch Zellsuspensionen autotroph kultivierter einzelliger Grünalgen nutzen. Die dabei zu praktizierende Methodik legt das Patent "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen", WP 94 2 34, fest. Verfährt man danach, so lassen sich aus einer Stichprobe von Chemikalien diejenigen selektieren, die den fundamentalen Prozeß des autotrophen Zellwachstums, die Photosynthese, unmittelbar oder mittelbar beeinträchtigen oder fördern. Substanzen, die die Photosynthese nicht beeinflussen, aber dennoch biochemisch wirksam sind, lassen sich auf die genannte Weise nicht definieren. Sie werden notwendigerweise als biochemisch unwirksam eingestuft. Solche Substanzen müssen dann in einer Kette nachfolgender Tests spezifischer Zielstellung auf entsprechend spezifischen Effekt geprüft

werden, so zum Beispiel potentielle Atmungshemmer in einem Heterotrophtest, Effektoren des Nukleinsäurehaushalts in einem Nukleinsäure-Test. Demnach ist es also unumgänglich, alle im "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" geprüften und für unwirksam befundenen Chemikalien einem erneuten Prüfungsgang zu unterwerfen.

Auch die als "biochemisch wirksam" eingestuften Substanzen bilden hinsichtlich ihrer Wirkungsweise keine einheitliche Gruppe. Sie können die Photosynthese unmittelbar beeinflussen, also als primäre Photosyntheseeffektoren wirken. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß sie nur mittelbar bzw. im Ergebnis ihrer Metabolisierung den Photosyntheseprozess tangieren, während sie ihre Hauptwirkung in anderen Stoffwechselbereichen manifestieren. Daraus ergibt sich der Wunsch nach einem Verfahren, das zwar ebenfalls auf Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen beruht, dessen Auswertungsmodus jedoch neben der Selektion primärer Photosyntheseeffektoren auch die Charakterisierung primär nichtphotosynthetischer Effektoren in einem Arbeitsgang erlaubt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für Tests mit autotrophen Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen einen Auswertungsmodus vorzuschlagen, der in einem Arbeitsgang die Selektion primärer Photosyntheseeffektoren und primär nichtphotosynthetischer Effektoren ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mittels eines speziellen Auswertungsverfahrens die in Anwendung des "Verfahrens zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" selektierten Effektoren in einem geschlossenen Arbeitsgang als primäre

Photosyntheseeffektoren bzw. primär nichtphotosynthetische Effektoren zu charakterisieren, sie also zu differenzieren, und gleichzeitig den Nachweis zu führen, ob sich unter den als biochemisch unwirksam eingestuften Substanzen Effektoren anderer Stoffwechselbereiche befinden. Das geschieht, indem man zunächst grundsätzlich so verfährt, wie es das "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" empfiehlt, also definierte Mengen chemischer Verbindungen mit autotroph kultivierten Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen in unmittelbaren Kontakt bringt und diese Proben parallel mit unbehandelten Vergleichskulturen bei einheitlicher Temperatur zwischen 20 °C und 38 °C im Licht belüftet, so daß sie auf der Grundlage des sich vollziehenden Photosyntheseprozesses wachsen und sich entwickeln. Zu festgelegten Zeitpunkten werden dann Proben und Vergleichskulturen oder Anteile von beiden parallel oder in definierter Folge mittels spektralanalytischer Verfahren bei zwei oder mehreren Wellenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums untersucht und die dabei gewonnenen Ergebnisse vergleichenden Betrachtungen unterzogen.

Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Autotroph kultivierte Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen der Species *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, Stamm BÖHM u. BORNS 1972/1 in einer Suspensionsdichte von 7×10^6 Zellen/cm³ werden mit verschiedenen konzentrierten wässrigen Lösungen der zu prüfenden Substanz A beimpft und zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 37 °C belichtet und belüftet, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Photosynthese gegeben sind. Deshalb wachsen und entwickeln sich die in Nährlösung suspendierten Zellen in den unbehandelten Vergleichskulturen normal.

In den mit Chemikalien versetzten Proben sind Wachstum und Entwicklung mehr oder weniger beeinflusst, wenn verschiedene Substanzkonzentrationen den Photosyntheseprozess mehr oder weniger stören. Die Ergebnisse der Analyse sind den Figuren 1 und 2 zu entnehmen. Figur 1 enthält die dekadischen Logarithmen der Extinktionsmessungen bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle 1 und die mit abgestuften Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 2, 3, 4, 5, 6, die zu den Zeitpunkten vorgenommen wurden, Figur 2 die entsprechenden Ergebnisse solcher Extinktionsmessungen bei 750 nm. Ein Vergleich der auf diese Weise parallel, also in einem Arbeitsgang gewonnenen Wirkbilder zeigt trotz unterschiedlicher Spektralbereiche weitgehende und prinzipielle Übereinstimmung im Wirkungsverlauf. Dies wird besonders deutlich bei einer Zusammenfassung beider Wirkbilder in Form einer Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm und 750 nm gegeneinander in Figur 3 oder in Form einer Auftragung der Q-Werte = E_{680}/E_{750} in Abhängigkeit der Einwirkzeit in Figur 7, Kurve 1. Aus diesen vergleichenden Betrachtungen läßt sich der Schluß ziehen, daß Substanz A auf jeden Fall biochemisch aktiv ist, wobei sich ihre Wirkung offensichtlich im Photosyntheseprozess manifestiert. Da der Effekt sich jedoch erst nach Stunden und dann deutlich widerspiegelt, ist Substanz A entweder ein primärer Photosyntheseinhibitor, der nur allmählich die Membranbarriere überwindet, oder ein unspezifischer Inhibitor, dessen allgemein destruktive Wirkung schließlich auch den Photosyntheseprozess beeinflusst.

2. Ausführungsbeispiel

Mit Substanz B wird wie im 1. Ausführungsbeispiel verfahren. Allerdings werden 9 unterschiedliche Konzentrationen von B (2 - 10) getestet und mit der unbehandelten Kontrolle 1 ver-

glichen. Die Auswertung des Tests erfolgt wiederum bei zwei verschiedenen Wellenlängen, bei 680 nm und bei 750 nm. Figur 4 informiert über die Ergebnisse der Extinktionsmessungen bei 680 nm. 2 Stunden lang lassen sich keine signifikanten Abweichungen zwischen der behandelten Proben 2 - 10 und der Kontrolle 1 feststellen. Danach ist ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt nachweisbar, der bis zum Ende des Versuchs erhalten bleibt. Ganz anders ist das Bild bei Sichtung der Extinktionsmessungen bei 750 nm. Hier übersteigen die Extinktionswerte der behandelten Proben sogar die Kontrollwerte, was zu der Annahme berechtigt, daß das Zellwachstum der mit Substanz B behandelten Proben gegenüber der Kontrolle gefordert wird. Erst nach 4 Stunden stimmen die Extinktionswerte behandelter und unbehandelter Proben wieder weitgehend überein. Dieser Zustand bleibt für weitere 2 Stunden erhalten. Danach erst erweisen sich die Proben 4 - 10 auch bei dieser Wellenlänge als merklich gehemmt.

Vergleichen wir die Aussagen der Figuren 4 und 5 für die Substanz B mit denen der Figuren 1 und 2 für die Substanz A, so wird deutlich, daß die Auswertung solcher Tests bei verschiedenen Wellenlängen für die die Extinktionsmessungen bei 680 und 750 nm lediglich eine mögliche Kombination von vielen darstellen, in einem Arbeitsgang zu sehr differenzierten Aussagen hinsichtlich der Wirkung beider Substanzen führen kann. Besonders deutlich zeigen sich diesbezügliche Unterschiede bei Korrelation der dekadischen Logarithmen der Extinktionswerte zueinander in Figur 3 bzw. 6 bzw. bei Auftragen der Q-Werte, $Q = E_{680}/E_{750}$, in Abhängigkeit von der Wirkdauer. Dieser Q-Wert ist im Falle der Substanz B bis zu 50% kleiner als z. B. der Q-Wert unbehandelter Chlorella-Kulturen. Daraus ergibt sich bei streng standardisierten Chlorella-Kulturen die Möglichkeit, die an behandelten Proben gemessenen Q-Werte mit standardisierten Werten zu vergleichen, also ohne unbehandelte Kontrolle arbeiten und an ihrer Stelle sogar Eich Tabellen nutzen zu können.

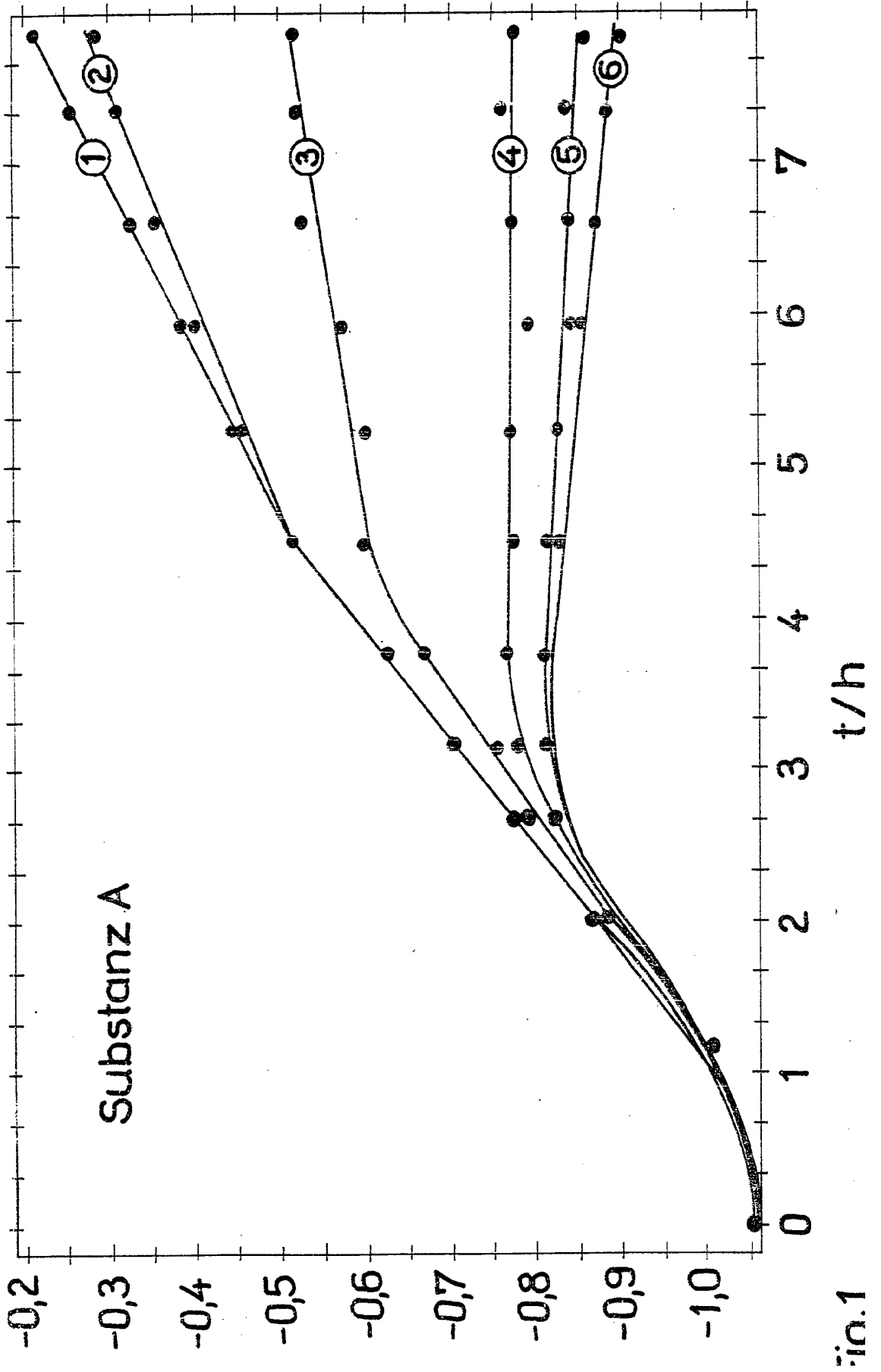
3. Ausführungsbeispiel

Von einer neu synthetisierten organischen Verbindung C, über deren biologischen Wirkeigenschaften noch nichts bekannt ist, wird wie in Figur 7 im Bereich zwischen den Kurven 4 und 10 dargestellt, durch gleichzeitige Wachstumsmessungen bei 680 nm und 750 nm bzw. x und y nm ein abweichender Q-Wert gefunden. Deshalb werden von dieser Substanz C die Wirkspektren aufgenommen. In der nachfolgenden Auswertung bei der die Wirkspektren und andere Daten der Substanz C mit entsprechenden Wirkspektren bzw. Daten bekannter Substanzen, von denen gute Kenntnisse über empirische bzw. halbempirische Zusammenhänge zwischen gezeigten Wirkspektren und spezifischen Wirkeigenschaften bzw. Wirkmechanismen vorliegen, mit Hilfe der elektrischen Datenverarbeitung verglichen werden, zeigen sich gute Übereinstimmungen zwischen den Substanzen B und C. Daraufhin wird die Substanz C in Analogie zu B als ein potentieller Mitosehemmer eingestuft. In nachfolgenden Spezialuntersuchungen, wie dem autotrophen Vermehrungstest auf der Basis synchroner Flüssigkeitskulturen von *Chlorella vulgaris* und anderer Tests werden die spezifische Wirkung auf die Zellteilung durch Substanz C bestätigt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels autotropher Zellsuspensionen, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften substanzbehandelter autotropher Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen genutzt werden, um mittels substanzinitiiertener Variation der optischen Eigenschaften solcher Suspensionen die Effektoren in primäre und sekundäre Photosyntheseeffektoren sowie in photosyntheseneutrale Effektoren differenzieren zu können.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als autotrophe Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen alle suspendierbaren autotrophen Bakterien, Blaualgen und Grünalgen verwendet werden können.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften der Zellsuspensionen mittels Spektralkolorimetrie, Spektralphotometrie oder Nephelometrie bei 2 bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen oder ganzen Spektralbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich analysiert werden.

Hierzu 7 Seiten Zeichnungen



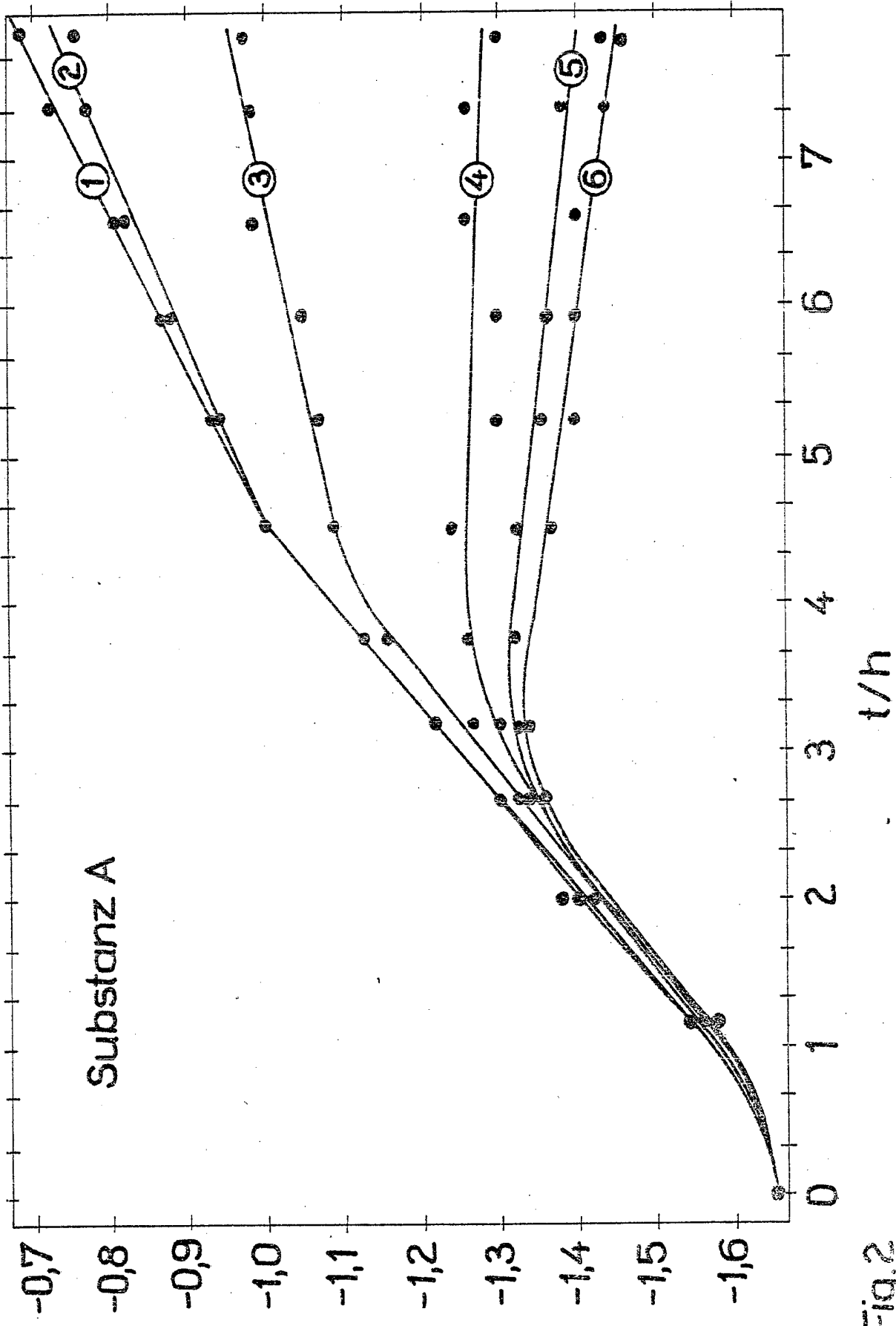


Fig.2

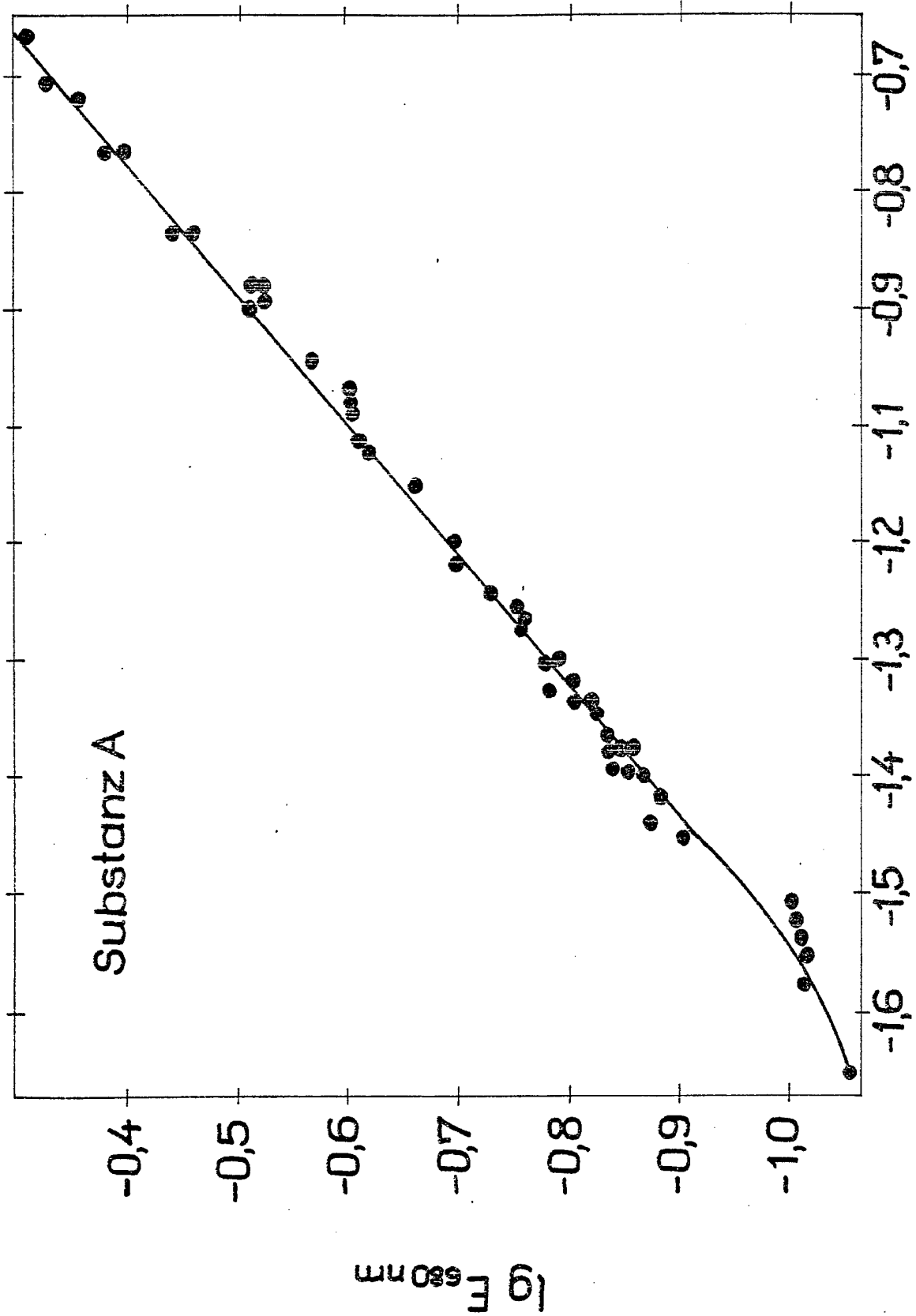


Fig. 3

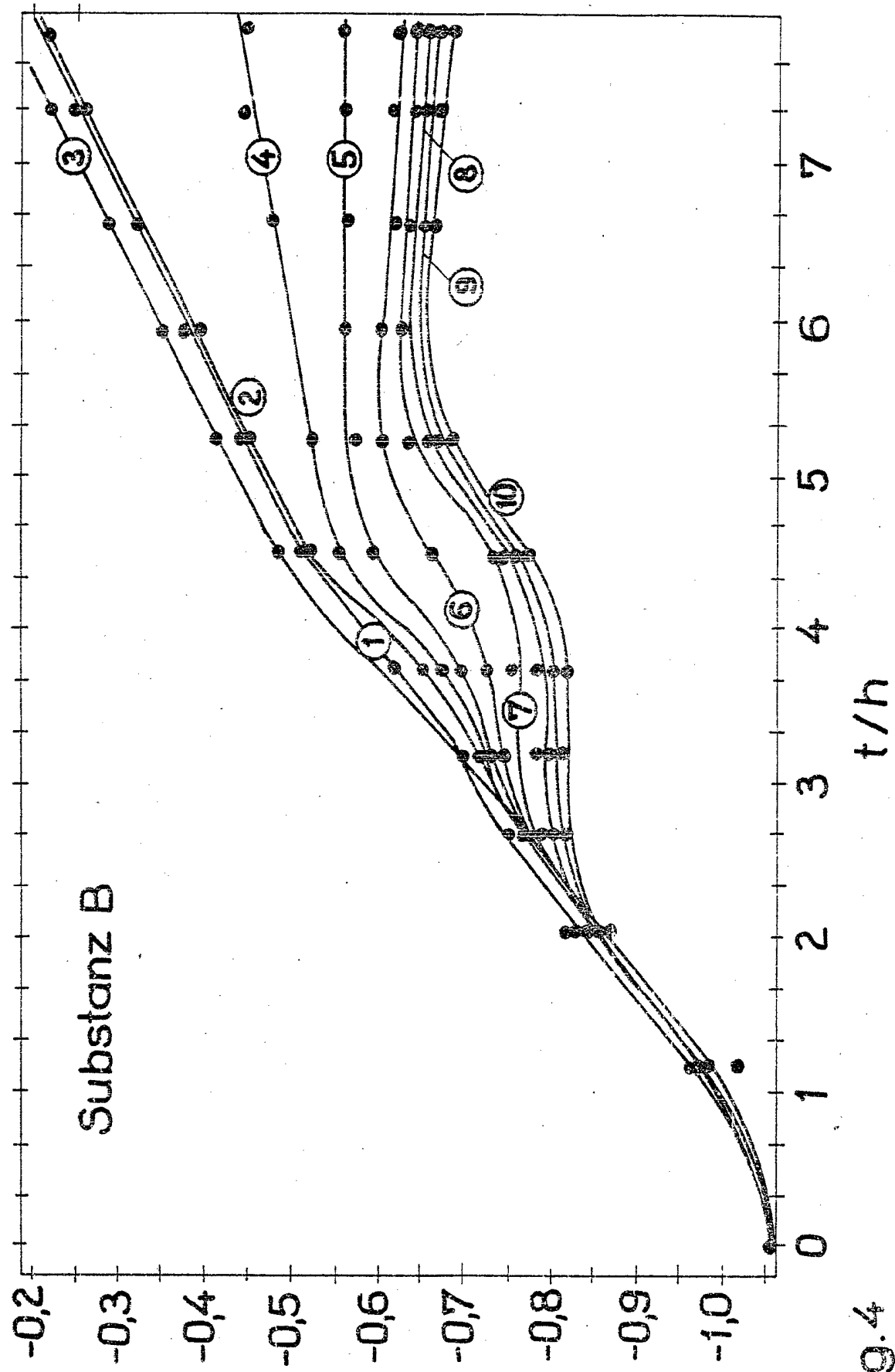
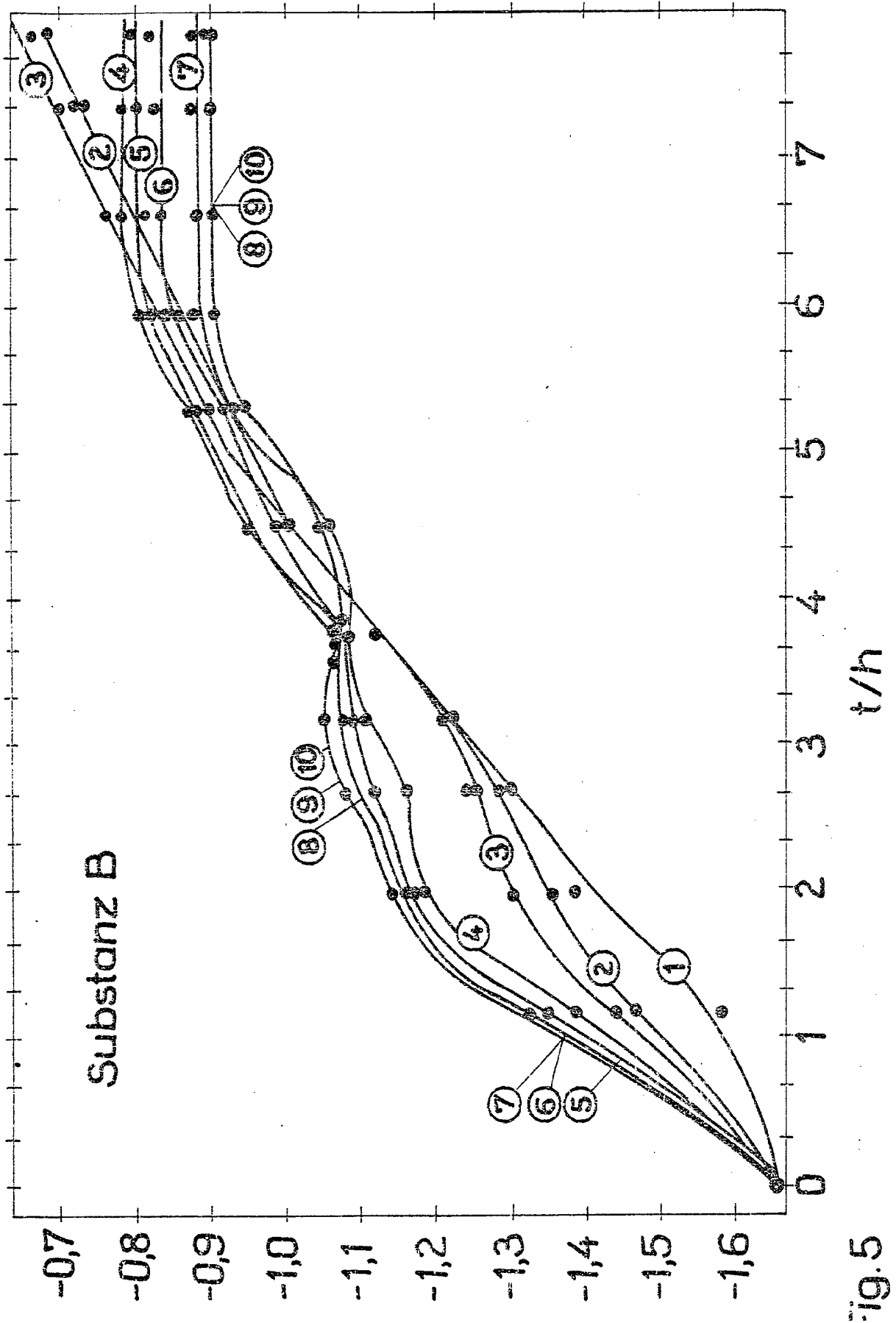


Fig. 4



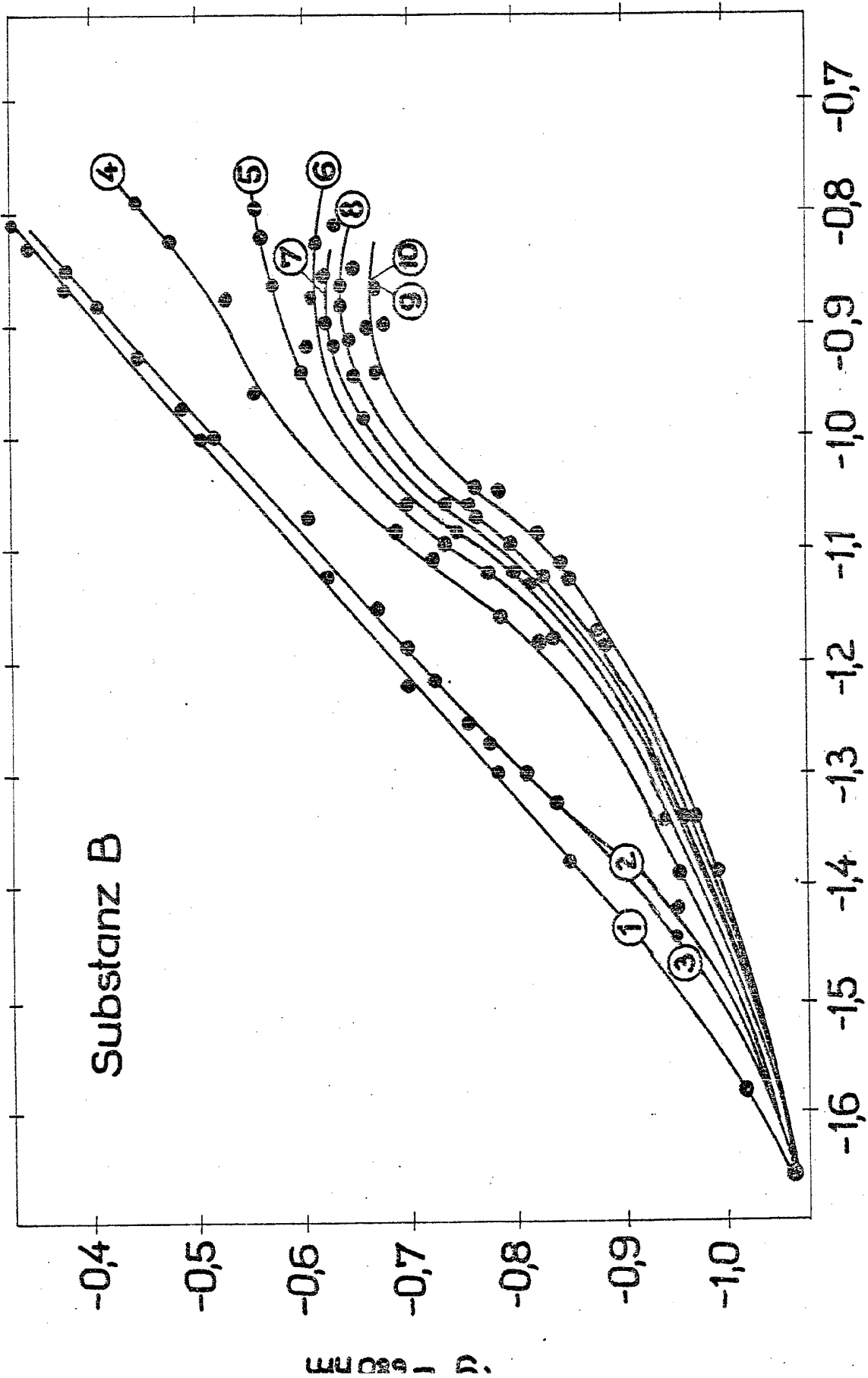
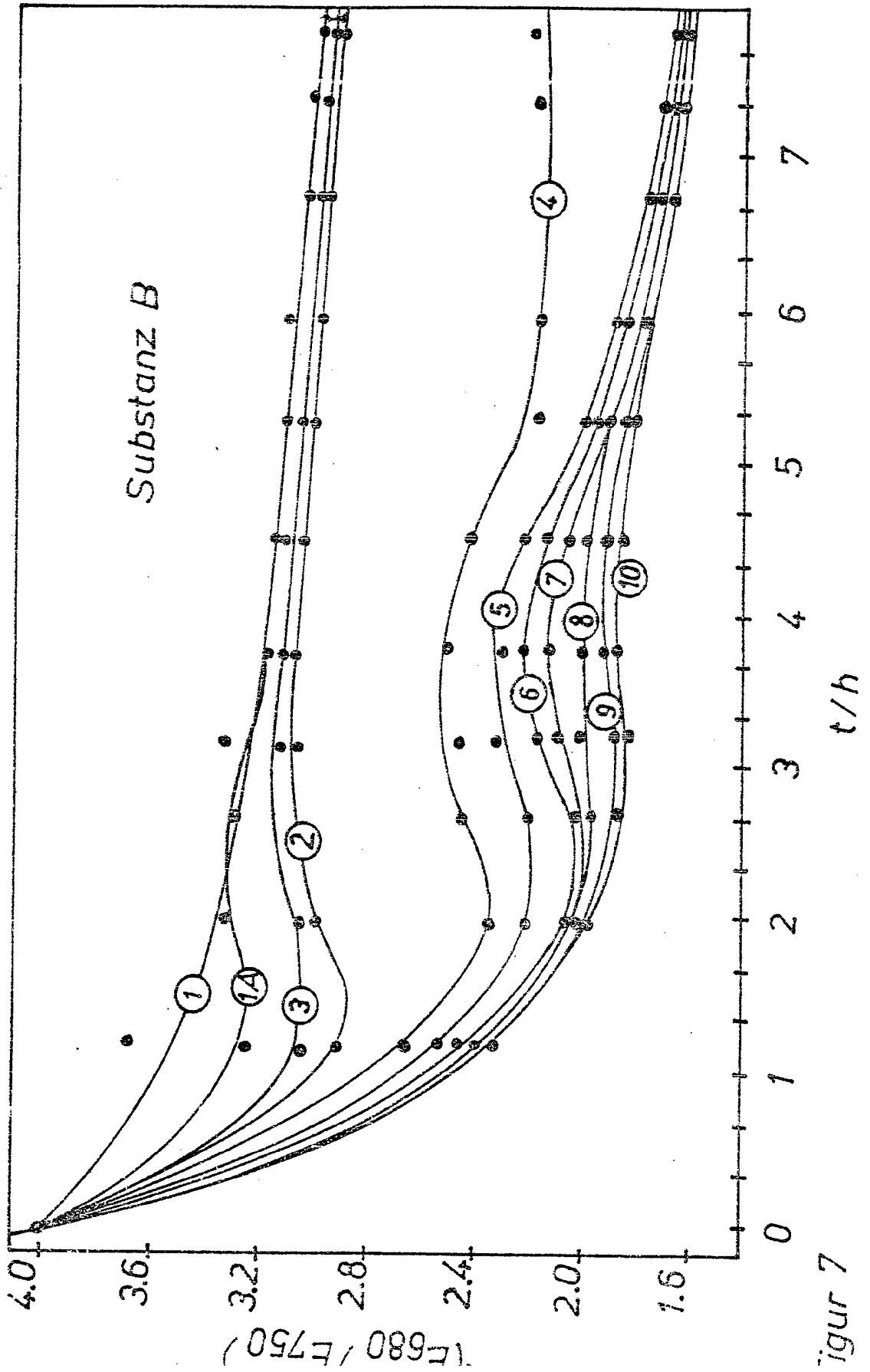


Fig. 6



figur 7