

**Neue Wirkstoffe gegen Pankreaskrebs aus der Ostsee-Braunalge
Fucus vesiculosus: Etablierung eines Aufreinigungsschemas nach
dem Prinzip der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung**

vorgelegt von
Dipl.-Ing.
Marion Zenthoefner

an der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Peter Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr. Holger Kalthoff

Gutachter: Prof. Dr. Juri Rappsilber

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. Februar 2021

Berlin 2021

*Ganz gleich,
wie beschwerlich das Gestern war,
stets kannst du im Heute von Neuem beginnen.*

Buddha

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Eidesstattliche Erklärung.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Abstract	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Therapieoptionen und Überleben	3
1.1.3 Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapeutika	7
1.1.4 Potential der Phytotherapie bei Pankreaskrebs	9
1.2 Potential von Braunalgen als Wirkstoffproduzenten	10
1.2.1 Diversität der Algen und die besonderen Eigenschaften von Braunalgen	11
1.2.2 Einsatz von Algen und Braunalgen für medizinische Zwecke	12
1.2.3 Biomoleküle von Braunalgen und deren therapeutisches Potential.....	13
1.2.4 Braunalgen in anti-tumoralen und anti-proliferativen Studien.....	16
1.2.5 <i>Fucus vesiculosus</i> und die Ostsee als Sammelstandort	17
1.3 Wirkstoffsuche nach dem Ansatz der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung.....	18
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 <i>Fucus vesiculosus</i> L. (Blasentang).....	21
2.2 Zelllinien.....	21
2.3 Chemikalien und Lösungsmittel.....	22
2.4 Chromatographiematerialien und -puffer	23
2.5 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren	25
2.6 Geräte	26
2.7 Software.....	26
2.8 Algensammlung	27
2.9 Extraktion.....	30
2.9.1 Initiale Rohextrakte aus gefrorenem Algenmaterial (FvR_W, FvR_E, FvR_A, FvT_W, FvT_E, FvT_A).....	30
2.9.2 Variante: Acetonischer Rohextrakt aus getrocknetem Thallus-Algenmaterial (FvTt_AW)	32
2.9.3 Rohextrakte (FvT_A) im größeren Maßstab	33
2.10 Fraktionierung und Aufreinigung.....	33
2.10.1 Fraktionierung durch Festphasenextraktion an Amberlite® XAD16.....	33
2.10.2 Chromatographie-Experimente der Bindungsstudie.....	35

2.10.3	Mehrstufiges Aufreinigungsprotokoll: Fällung, Normalphase-HPLC an Pharmprep60CC SiO ₂ und Umkehrphase-HPLC an Amberlite® XAD7HP	37
2.11	Zellkultur und <i>in vitro</i> -Experimente	38
2.11.1	Aufrechterhaltung der Zellkultur	38
2.11.2	Zellviabilitäts-Assay (XTT-Assay)	38
2.12	Analytik	41
2.12.1	Untersuchung der Hitzestabilität der Wirkstoffe	41
2.12.2	NMR-Spektroskopie	41
2.12.3	UV/Vis-Spektroskopie	42
2.12.4	HPLC-MS.....	42
2.12.5	IR-Spektroskopie	43
2.12.6	Folin-Ciocalteu-Assay zur Bestimmung des Gesamt-Polyphenolgehalts.....	43
2.12.7	Quantitative Bestimmung bakterieller Endotoxine	44
2.12.8	Qualitative und quantitative Bestimmung von Schwermetallen.....	45
2.13	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Inhibition der Viabilität von Pankreas-Krebszelllinien durch Rohextrakte aus <i>F. vesiculosus</i>	47
3.1.1	Herstellung initialer Rohextrakte.....	47
3.1.2	Untersuchung der Aktivitäten der Rohextrakte im XTT-Viabilitäts-Assay	49
3.1.2.1	Aktivität von FvT_A im Detail.....	50
3.1.3	¹ H-NMR-Monitoring.....	52
3.2	Entwicklung eines Aufreinigungsschemas für die Wirkstoffe des acetonischen Thallus-Extrakes (FvT_A).....	54
3.2.1	Grobfraktionierung durch Festphasenextraktion an Amberlite® XAD16	54
3.2.2	Bindungsstudie: Fraktionierung an verschiedenen Chromatographie-Materialien.....	56
3.2.3	Formulierung und Etablierung des Aufreinigungsschemas	65
3.2.4	Charakterisierung des Aufreinigungserfolgs.....	72
3.2.5	Bestimmung der Ausbeute der Fraktionen F15 und F16.....	74
3.2.6	Reproduzierbarkeit	76
3.2.7	Gehalt an Endotoxinen und Schwermetallen in F15/F16	81
3.3	Identifizierung und Ansatzweise-Strukturaufklärung der aktiven Substanzen in F15/F16	81
3.3.1	Hitzestabilität.....	82
3.3.2	¹ H-NMR-Spektroskopie	83
3.3.3	DOSY-NMR	83
3.3.4	Schlussfolgerungen aus der RP-HPLC an Amberlite® XAD7HP mit Gradientenelution.....	83
3.3.5	UV/Vis-Spektroskopie	83

3.3.6	Folin-Ciocalteu-Assay	85
3.3.7	HPLC-MS-Analyse	86
3.3.8	Gesamtinterpretation anhand weiterer NMR-Experimente sowie IR-Spektroskopie	87
4	Diskussion	89
4.1	Aktivitäten der Rohextrakte	89
4.2	Aktivitäten der Fraktionen	93
4.3	Entwicklung des Aufreinigungsschemas	95
4.4	Ansatzweise Strukturaufklärung und Versuch der De-Replikation	97
4.5	Aussichten	101
4.6	Zusammenfassende Schlussfolgerung	103
	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	104
	Literaturverzeichnis	105
	Wissenschaftliche Artikel, Bücher, Sammelbände, Berichte, Abschlussarbeiten, Verordnungen	105
	Internetquellen	126
	Produktbeschreibungen und Protokolle	127
	Bildquellen	127
Anhang	VIII
A.1	Studien mit <i>Fucus vesiculosus</i>	VIII
A.2	Fraktionen der XAD16-Grobfraktionierung	XIII
A.3	Fraktionen der Bindungsstudie	XIII
A.4	Aktivitäten der nachproduzierten Fraktionen im Standard-Viabilitäts-Assay und Identifizierung der Aktivitätspeak-Fraktionen	XV
A.5	Gehalt an Endotoxinen in F15/F16	XXIII
A.6	Gehalt an Schwermetallen in F15/F16 und im Rohextrakt FvT_A	XXV
A.7	Experimente zur Strukturaufklärung	XXIX
A.8	RP-Chromatographie	XXXIV

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation in einem so spannenden und ursprünglichen Feld wie der marinen Wirkstoffforschung ermöglicht und mich dabei auf verschiedenste Art und Weise unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Levent Piker von CRM, früher ein außergewöhnlicher und wunderbarer Chef, stets ein wohlwollender Mentor und inspirierender lateraler Denker und heute ein guter Freund. Vielen Dank für Dein Vertrauen, die vielen Wege, die Du mir ermöglicht hast, Deine stets positive Herangehensweise und die motivierenden Worte. In bemerkenswerter Art und Weise hast Du mich immer wieder in die erste Reihe „geschubst“ und mir gleichzeitig sehr großen Freiraum gegeben, meine Vorhaben zu entwickeln. Vielen Dank dafür!

Dem gesamten Team von CRM danke ich für die entgegengebrachte Warmherzigkeit und Besonderheit. Eigene Gedanken und Ideen hervorzubringen, ohne dafür gewertet zu werden, war ausdrückliches Credo von CRM, das ich, in dieser Ausprägung gelebt, bisher nicht wieder erfahren konnte. Als Ausgangspunkt meiner beruflichen Karriere wird CRM für immer mein Zuhause und Inspirationsgeber bleiben.

Ganz außerordentlich danken möchte ich auch Prof. Dr. Holger Kalthoff, ehemaliger Leiter der Sektion für Molekulare Onkologie am UKSH Kiel und in Wirklichkeit mein geschätzter Doktorvater vor Ort. Vielen Dank für die stets wohlwollende Betreuung, die wertvollen, zielgenauen Ratschläge und kritischen Fragen, für die Überlassung der Labormöglichkeiten und die Einbeziehung ins Team. Von unschätzbarem Wert war das langjährige Interesse an der Doktorarbeit, ganz allgemein die vielseitige Unterstützung im Projekt „Algen gegen Krebs“ und nicht zuletzt die Offenheit gegenüber alternativen Methoden in der Krebstherapie.

Dem gesamten Team des AAC-Projektes, insbesondere Prof. Dr. Matthias Peipp aus der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie am UKSH Kiel und Dr. Roland Geyer von der numares AG, danke ich ganz herzlich für die passionierte Zusammenarbeit, den außerordentlich guten fachlichen Austausch und die vielen einprägsamen Erläuterungen. Dr. Ulf Geisen danke ich für die gemeinsame Zeit im Labor und den konstruktiven sowie kritischen fachlichen Austausch.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Roland Lauster, Leiter des Fachgebiets Medizinische Biotechnologie an der TU Berlin, danke ich ganz besonders für die positive und unkomplizierte externe Betreuung, das langjährige Interesse an der Arbeit und vor allem für das hohe Maß an Geduld und Vertrauen darin, dass ich die Dissertation neben dem Job doch eines Tages noch beenden werde.

Nicht zuletzt danke ich

Karsten Hofmann-Peiker von der Planton GmbH für den besten fachlichen Austausch, das kritischste Nachbohren und das gemeinsame Nachsitzen an Zusatzexperimenten und meinen tausend Fragen. Danke für das Aufzeigen vieler Begrenzungen und Mauern und Deine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Axel Zeeck, Emeritus der Georg-August-Universität Göttingen sowie Gründer und Geschäftsführer der BioViotica Naturstoffe GmbH, für den fundierten Austausch und die Überlassung wertvoller Analyseergebnisse.

Dr. Dirk Schmidt-Arras und seinem Team für den Unterschlupf im Biochemie-Labor der CAU Kiel, für den Raum zum praktischen und gedanklichen Experimentieren, den guten fachlichen und freundschaftlichen Austausch und die wertvollen Tipps zum Schreiben einer wissenschaftlichen Veröffentlichung. Bei Euch im Labor hat es so richtig Spaß gemacht!

Priv.-Doz. Dr. Christoph Plieth vom Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie der CAU Kiel für die Möglichkeiten zur UV-Messung und die selbstlose und wohlwollende fachliche Beratung.

Meinen Freundinnen und Weggefährtinnen, Dr. Constanze Yue, Dr. Judith Sewing, Dr. Yvonne Roessner und Dr. Constance Schmelzer, die die Höhen und Tiefen einer Promotion selbst miterlebt haben und daher stets die besten Austauschpartnerinnen, die wertvollsten Motivatorinnen und die kritischsten Begleiterinnen waren.

Meinen Eltern und meiner Schwester, die mich stets unterstützt und irgendwann auch nicht mehr zu viel gefragt haben. Fiete, der mich auf die Idee gebracht hat, Naturwissenschaftlerin zu werden. Meiner süßen Nichte für das gemeinsame Mikroskopieren von Algen und allerlei anderem Grünzeug.

Meinem besten Freund Sebastian, der mich stets zum Lachen gebracht und mich von der Doktorarbeit abgehalten hat.

All meinen Freunden und Begleitern in der langen Zeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind. Die geltende Promotionsordnung der Technischen Universität Berlin ist mir bekannt.

Kiel, den 17.09.2020

Zusammenfassung

Braunalgen werden seit dem Altertum in der Phytotherapie eingesetzt [Hoppe et al. 1979; Liu et al. 2012]. In neuerer Zeit ist von vielfältigen medizinischen Wirkungen dieser Algengruppe und ihrer isolierten Substanzen berichtet worden. Diese umfassen auch Wirkungen gegen Krebs [Gupta und Abu-Ghannam 2011]. Die Ostsee ist mit ihrem geringen Salzgehalt und den fehlenden Gezeiten ein besonderes Habitat für marine Algen [Rheinheimer 1996]. Über das Potential der dort am weitesten verbreiteten und auffälligsten Braunalge, dem Blasentang (*Fucus vesiculosus* L.) [Kautsky et al. 1992], für Wirkungen gegen Krebs war bisher jedoch nichts bekannt.

Mit der vorliegenden Arbeit als Teil des Verbundprojekts „Algae against Cancer (AAC)“ sollte diese Wissenslücke geschlossen werden. Das AAC-Projekt, das von 2010 bis 2013 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert worden ist, widmete sich in einem seiner zwei Projektteile der Aufklärung des Anti-Krebs-Potentials des aus der Ostsee stammenden *F. vesiculosus* [Zenthoefer et al. 2017]. Auch die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Wirkung, die ein nachweislich aktiver Extrakt dieser Alge in Pankreaskrebszellen induzierte, wurden in diesem Projektteil beleuchtet [Geisen et al. 2015].

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren im Einzelnen die systematische Analyse der zytotoxischen Aktivität des *F. vesiculosus* aus der Ostsee gegenüber den zwei dukталen Pankreasadenokarzinom-Zelllinien Panc89 und PancTU1 sowie die Entwicklung und Etablierung eines Extraktions- und Aufreinigungsschemas für eine aufgefundene Aktivität. Die Analysen wurden entsprechend des Ansatzes der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung (*bioassay-guided fractionation*) durchgeführt, bei dem alle initialen Rohextrakte und sukzessive produzierten Fraktionen in einem 72-stündigen Viabilitätsassay (XTT-Assay) auf ihre Aktivität und per ¹H-NMR-Spektroskopie auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht worden sind.

Aus frisch-gefrorenem Algenmaterial, das im späten Frühjahr aus der Kieler Förde in der westlichen Ostsee gesammelt worden ist, wurden sechs verschiedene Rohextrakte angefertigt. Vier dieser sechs Rohextrakte zeigten deutliche zytotoxische Aktivität gegenüber der Zelllinie Panc89, drei davon gegenüber der Zelllinie PancTU1. Der aktivste Rohextrakt, FvT_A, der vom zentralen Thallusmaterial der Alge unter Einsatz von Aceton in einem Verhältnis von 1:2 (w/v) angefertigt wurde, zeigte im Standard-XTT-Assay eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von 72 bzw. 77 µg/ml gegenüber den Panc89- bzw. PancTU1-Zellen. Für FvT_A wurde ein mehrstufiges Fraktionierungs- und Aufreinigungsschema implementiert, das, hintereinandergeschaltet, die Prozesse Präzipitation, Normalphase-Chromatographie an Pharmprep60CC SiO₂-Material und Umkehrphase-Chromatographie an Amberlite® XAD7HP-Material beinhaltet. Dieses Aufreinigungsschema führte, ausgehend vom Rohextrakt bis hin zu den aktivsten Fraktionen, F15/F16, zu einer rund vierfachen Reduktion des IC₅₀-Werts. Die vergleichende Auswertung aller ¹H-NMR-Spektren ergab einen

charakteristischen "Fingerabdruck" (*fingerprint*), der signifikant mit der Viabilitäts-inhibierenden Aktivität korrelierte. Aus den Ergebnissen erster Strukturanalysen mit Hilfe verschiedener NMR-Spektroskopie-Methoden sowie IR- und UV-Spektroskopie wurde geschlossen, dass es sich bei den aktiven Substanzen in F15/F16 um zwei ähnliche Moleküle mit Molekulargewichten von 1331 ($\pm 5\%$) und 1173 ($\pm 5\%$) g/mol handelt, die zur Gruppe der Polyphenole gehören und höchstwahrscheinlich Phlorotannine sind. Eine weitere Auftrennung von F15/F16 und weitere Strukturanalysen sind jedoch notwendig, um die Struktur im Detail aufzuklären.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Braunalge *F. vesiculosus* aus der Ostsee potentielle Wirkstoffe gegen Pankreaskrebs enthält. Die Ergebnisse sind vielversprechend, da sie nicht nur technisch, sondern auch biologisch reproduzierbar sind und da die aktiven Substanzen offenbar noch nicht bekannt sind.

Abstract

Brown seaweeds have been used in phytotherapy since ancient times [Hoppe et al. 1979; Liu et al. 2012]. In recent years, a multitude of medical effects have been reported for this group of algae and for their isolated substances that also cover anti-tumor activities [Gupta and Abu-Ghannam 2011]. Though being the most common and most conspicuous brown seaweed species in the Baltic Sea [Kautsky et al. 1992], nothing was known, so far, about the anti-cancer potential of the Bladderwrack, *Fucus vesiculosus* L., grown in this particular habitat with low salinity and non-tidal shores [Rheinheimer 1996].

With the present work which was part of the national research project “Algae against Cancer (AAC)” this knowledge gap should be closed. The AAC-project, funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) from 2010 to 2013, was in one of its two parts dedicated to the examination of the anti-cancer potential of the Baltic Sea *F. vesiculosus* [Zenthoefer et al. 2017] followed by the elucidation of the cellular mechanisms of the anti-cancer effect that one verifiably active *F. vesiculosus* extract induced in pancreatic cancer cell lines [Geisen et al. 2015].

In detail, the objectives of the present work were to provide a systematic analysis of the cytotoxic activity of *F. vesiculosus* against the two pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines Panc89 and PancTU1 and for a detected anti-cancer activity, a tailor-made extraction and purification procedure should be developed and implemented. To come closer to these objectives, a bioassay-guided fractionation approach was used in which all initial crude extracts and successively produced fractions were examined for their activity in a 72 h viability assay (XTT assay) and monitored for their ingredients using ¹H-NMR spectroscopy.

Six different crude extracts were prepared from freshly frozen algae material collected from the Kiel Fjord, Western Baltic Sea, at late springtime. Four out of these six crude extracts showed considerable cytotoxic activity against the Panc89 cells and three out of them were active against the PancTU1 cells. The most active crude extract, FvT_A, prepared from central parts of the thallus of the alga by the use of acetone at the rate of 1:2 (w/v) revealed a half maximal effective concentration (IC₅₀) of 72 and 77 µg/ml, respectively, against the Panc89 and PancTU1 cells in the standard XTT assay. For FvT_A, a multistep fractionation and purification procedure was implemented consisting of the processes precipitation, normal-phase chromatography on a Pharmprep60CC SiO₂ and reversed-phase chromatography on Amberlite® XAD7HP. This purification scheme resulted in a fourfold reduction of the IC₅₀ from the crude extract to the most active fractions F15/F16. Evaluation of all ¹H-NMR spectra revealed a characteristic fingerprint which significantly correlated with the anti-cancer activity. Structural analysis using different methods of NMR spectroscopy as well as IR and UV spectroscopy revealed for the active compounds in F15/F16 two similar molecules with a molecular weight of 1331 (±5 %) and 1173 (±5 %) g/mol which belong to the group of polyphenols and are most

probably phlorotannins. However, further separation of F15/F16 and further structural analysis is needed in order to present the chemical structure in all details. In summary, the results show that *F. vesiculosus* from the Baltic Sea holds potent anti-cancer substances. The findings are promising as they are not only technically but also biologically reproducible and the isolated active substances seem to be as yet unknown.

Abkürzungsverzeichnis

>	größer als
≥	größer/gleich
≤	kleiner/gleich
±	plus/minus
≐	entspricht
≈	rund
'	Minute
"	Sekunde
*	Signifikanzstern
%	Prozent
% D	Deuterierungsgrad
‰	Promille
∅	Durchmesser
&	und
°	Grad
°C	Grad Celsius
©	für <i>engl.</i> copyright - Urheberrecht
®	für <i>engl.</i> registered trademark - eingetragene Handelsmarke
x g	relative Zentrifugalbeschleunigung, Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung
1D	eindimensional
¹ H	Wasserstoff
2D	zweidimensional
5-FU	5-Fluorouracil
¹³ C	Kohlenstoff
Å	Ångström, eine Längeneinheit
A2780	humane Ovarialkarzinomzelllinie
A549	humane Lungenadenokarzinomzelllinie
AAC	für <i>engl.</i> Algae Against Cancer - Algen gegen Krebs, Name des Forschungsprojektes, in das die Dissertation eingegliedert war
Abb.	Abbildung
AC	für <i>engl.</i> affinity chromatography - Affinitätschromatographie
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADM	azinär-duktales Metaplasie
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
ANOVA	für <i>engl.</i> analysis of variance - Varianzanalyse
Art.	Artikelnummer
B16-BL6	murine Melanomzelllinie
Bel7402, BGC-823	humane Zervixkarzinomzelllinien (Abkömmlinge von HeLa)
bidest.	zweifach destilliert
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Br	Brom
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
C4	Butyl-
C8	Octyl-
C12	Dodecyl-
C18	Octadecyl-
C ₂ H ₆ O ₂	Ethylenglycol

C ₆ H ₅	Phenyl-
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caco-2	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
CAU Kiel	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CC	für <i>engl.</i> for column chromatography - für die Säulenchromatographie
CCD	für <i>engl.</i> charge coupled device - ladungsgekoppeltes Bauelement, hochempfindlicher Photonendetektor (CCD-Sensor)
CEM	humane Akute-Lymphatische-Leukämie-Zelllinie
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COSY	für <i>engl.</i> correlation spectroscopy - Korrelationsspektroskopie
CRM	Coastal Research & Management GbR, Kiel
CRT	Chemoradiotherapie
CSCs	für <i>engl.</i> cancer stem cells - Krebsstammzellen
CSE	für <i>engl.</i> control standard endotoxin - Endotoxin-Standardlösung
CT	Chemotherapie
D	Deuterium
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethanol-Sepharose (Sepharose = quervernetzte Agarose)
DEV	Droge (Frischpflanze)-Extrakt-Verhältnis
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO D6	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	für <i>engl.</i> desoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
DOSY	für <i>engl.</i> diffusion ordered spectroscopy - Diffusionsgeordnete Spektroskopie
DPBS	für <i>engl.</i> Dulbecco's phosphate-buffered saline - Phosphat-gepufferte Salzlösung
DU 145	humane Prostatakarzinomzelllinie
δ _H , δ _C	delta H, delta C - chemische Verschiebung, _H bei ¹ H-NMR, _C bei ¹³ C-NMR, relativer Abstand des Zentrums einer Resonanzlinie der Probe von dem eines gewählten Standards
<i>E. coli</i> O113:H10	<i>Escherichia coli</i> O113:H10 - Kolibakterium, Stamm O113:H10
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	für <i>engl.</i> European Medicines Agency - Europäische Arzneimittel-Agentur
<i>engl.</i>	englisch
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	für <i>lat.</i> et alii - und andere
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EU	für <i>engl.</i> Endotoxin Units - Endotoxin-Einheiten
F	Fluor
F15, F16, F36, F37	Fraktionen
F15 ² , F15 ³ , F15 ⁴ , ...	Fraktionsreplikate
F2_15, F3_15, F4_15, ...	Fraktionen der Fraktionierungsläufe 2, 3, 4, ...
FC-Assay	Folin & Ciocalteu-Assay
FC-Reagenz	Folin & Ciocalteu's Phenol-Reagenz
FCS	für <i>engl.</i> fetal calf serum - fötales Kälberserum
FDA	U.S. Food and Drug Administration - Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten
FG	Frischgewicht
<i>frz.</i>	französisch
FTIR-Spektrometer	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer
<i>F. vesiculosus</i> , Fv	<i>Fucus vesiculosus</i> - Blasentang
Fv1	andere Bezeichnung für die gepoolte Fraktion F15/F16
FvR	<i>Fucus vesiculosus</i> Rezeptakelblase

FvT	<i>Fucus vesiculosus</i> restlicher Thallus
_A	acetonisch extrahiert
_AW	acetonisch-wässrig extrahiert
_E	ethanolisch extrahiert
_W	wässrig extrahiert
FvT_A (2), FvT_A (3), FvT_A (4), ...	Rohextraktreplikate
FvTt	<i>Fucus vesiculosus</i> getrocknet restlicher Thallus
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
Gem	Gemcitabin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HCOOH	Ameisensäure
HCOONH ₄	Ammoniumformiat
HCT-8	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
HCT 116	humane Kolonkarzinomzelllinie
HeLa	humane Zervixadenokarzinomzelllinie
Hep-2	humane Zervixkarzinomzelllinie (Abkömmling von HeLa)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz
HMBC	für <i>engl.</i> heteronuclear multiple bond correlation - heteronukleare Mehrfachbindungskorrelation
HPLC	für <i>engl.</i> high performance liquid chromatography - Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HPLC-ESI-MS ⁿ	für <i>engl.</i> high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry - Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie/ Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
hpts.	hauptsächlich
HRMS	für <i>engl.</i> high resolution mass spectrometry - hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	für <i>engl.</i> heteronuclear single quantum coherence correlation - heteronukleare Einzelquantenkohärenzkorrelation
HT-1080	humane Fibrosarkomzelllinie
HT-29	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
HTS	für <i>engl.</i> high-throughput screening - Hochdurchsatztestung
I	Iod
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICP-MS	für <i>engl.</i> inductively coupled plasma mass spectrometry - Massenspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas
ICP-OES	für <i>engl.</i> inductively coupled plasma optical emission spectrometry - optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas
IEX	für <i>engl.</i> ion exchange chromatography - Ionenaustausch-Chromatographie
IR	Infrarot
KB	humane Zervixkarzinomzelllinie (Abkömmling von HeLa)
KF1	andere Bezeichnung für die gepoolte Fraktion F15/F16
kg	Kilogramm
l	Liter
L.	Linnaeus - Carl von Linné, schwedischer Naturforscher
LAL-Test	Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test
<i>lat.</i>	lateinisch
LC	für <i>engl.</i> liquid chromatography - Flüssigchromatographie
LDH	Lactatdehydrogenase
LLUR	Schleswig-Holsteins Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (ehemals LANU)

LNCaP	humane Prostataadenokarzinomzelllinie
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
λ	Lambda, Wellenlänge
λ_{\max}	Wellenlänge, bei der die gemessene Substanz ihr Absorptionsmaximum hat
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
$[M+H]^+$	in der Massenspektrometrie: positiv geladene Form eines Moleküls, die entsteht, wenn ein Proton hinzugefügt wird
m	Meter
M	Molarität, Bsp. 2M = 2 molare Lösung = 2 mol gelöste Substanz pro Liter
MALDI-TOF	für <i>engl.</i> matrix assisted laser desorption ionization-time of flight - Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation mit Flugzeit-Analysator
max.	maximal
MCF-7, MDA-MB231, MDA-MB468	humane Brustadenokarzinomzelllinien
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
MiaPaCa-2	eine Pankreaskrebszelllinie
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MN	Macherey-Nagel
MS	Massenspektrometrie
MS ⁿ	Mehrfach-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Stichprobenumfang, Anzahl der biologischen Replikate
N	Normalität [mol/l] = Äquivalentkonzentration, eine spezielle Stoffmengenkonzentration in der Chemie: $N=z \cdot n/V = \text{stöchiometrische Wertigkeit} \cdot \text{Stoffmenge} / \text{Volumen}$
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
nab	für <i>engl.</i> nanoparticle albumin bound - an Albumin-Nanopartikel gebunden
NaCl	Natriumchlorid
nal-IRI (= MM-398)	Irinotecan (= Onivyde), ein Zytostatikum
NF- κB	für <i>engl.</i> nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells - ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der in praktisch allen tierischen Zelltypen und Geweben vorkommt
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblastenzellen
nm	Nanometer
NMR	für <i>engl.</i> nuclear magnetic resonance - Kernspinresonanz
NOESY	für <i>engl.</i> nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy
NP	für <i>engl.</i> normal-phase chromatography - Normalphase-Chromatographie
Nr.	Nummer

OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
OH-	Hydroxyl-
p	1.) für <i>engl.</i> probability - Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert oder 2.) Prozentzahl
p.a.	für <i>lat.</i> pro analysi - für die Analyse
Panc-1, Panc89, PancTU1	humane Pankreas-Adenokarzinomzelllinien
PanINs	für <i>engl.</i> pancreatic intraepithelial neoplasia - intraepitheliale Neoplasie des Pankreas, prä maligne Vorstufen des duktales Pankreas-Adenokarzinoms
PBMCs	für <i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells - mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	für <i>engl.</i> phosphate-buffered saline - Phosphatgepufferte Salzlösung
PDAC	für <i>engl.</i> pancreatic ductal adenocarcinoma - duktales Adenokarzinom des Pankreas
Pen	Penicillin
PC-3	humane Prostataadenokarzinomzelllinie
PG	Partikelgröße
PGE	für <i>engl.</i> phloroglucinol equivalents - Phloroglucinoläquivalente
PGU	für <i>engl.</i> phloroglucinol units - Phloroglucinoleinheiten
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Ph. Eur.	für <i>lat.</i> Pharmacopoea Europaea - Europäische Pharmacopoeia, Europäisches Arzneibuch
pNA	para-Nitroanilin
PO ₄ ³⁻	Phosphat-Ion
Post-hoc-Test	für <i>lat.</i> mit diesem, also deswegen - Signifikanztest in Form von Einzelvergleichen
pp.	für <i>engl.</i> pages - Seiten
PP	Polypropylen
ppm	für <i>engl.</i> parts per million - Teile pro Million, Einheit für chemische Mischungs- und Konzentrationsverhältnisse
PTFE	Polytetrafluorethylen
PW	Porenweite
QCX	Anionentauscher
Q-Sepharose	quaternäre Amino-Sepharose
R	Rezeptakelblasen
RO	kein Residualtumor
Raji	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie
RNA	für <i>engl.</i> ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
RP	für <i>engl.</i> reversed-phase chromatography - Umkehrphase-Chromatographie
rpm	für <i>engl.</i> revolutions per minute - Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640, ein Fertigmedium
RT	1. Raumtemperatur oder 2. für <i>engl.</i> retention time - Retentionszeit
s	Sekunde
(s)	scharf
S-1	ein orales Fluoropyrimidin, ein Chemotherapeutikum
SCX	starker Kationentauscher
SD	für <i>engl.</i> standard deviation - Standardabweichung
sh	für <i>engl.</i> shoulder - Schulter
SiO ₂	Siliziumdioxid
sog.	sogenannt
SPE	für <i>engl.</i> solid phase extraction - Festphasenextraktion
Strep	Streptomycin
SW1990	humane Pankreas-Adenokarzinomzelllinie
T	restlicher Thallus
T1	Primärtumor ≤ 2 cm und noch innerhalb des Pankreas

T2	Primärtumor > 2 cm und noch innerhalb des Pankreas
T3	Der Tumor hat die Organgrenze überschritten, aber die Arterien noch nicht infiltriert.
T4	Angrenzende große Arterien sind vom Tumor infiltriert.
T47D	humane Brustkarzinomzelllinie
TCM	Traditionelle Chinesischen Medizin
TG	Trockengewicht
THP-1	humane monozytische Leukämiezelllinie
TM	für <i>engl.</i> Trade Mark - unregistrierte Warenmarke
TMS	Tetramethylsilan
TNM	für <i>engl.</i> Tumour-Node-Metastasis-Klassifikation - Klassifikation der UICC zum Staging (zur Stadieneinteilung) von Tumorerkrankungen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, eine Puffersubstanz
<i>t</i> -Tests	Hypothesentest mit <i>t</i> -verteilter Testprüfgröße
U	für <i>engl.</i> unit - atomare Masseneinheit
U-937	humane pro-monozytische myeloische Leukämiezelllinie
u.a.	unter anderem
UICC	für <i>frz.</i> Union International Contre le Cancer - Internationale Vereinigung gegen Krebs
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UHPLC	für <i>engl.</i> Ultra High Performance Liquid Chromatography - Ultrahochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
UPLC-QQQ-MS/MS	für <i>engl.</i> Ultra Performance Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry - Ultrahochleistungsflüssigkeits-Chromatographie mit Tripel-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Vis	visueller (sichtbarer) Bereich
$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	Wellenzahl
vs.	versus
<i>w/v</i>	für <i>engl.</i> weight/volume - Gewicht/Volumen
XAD	Adsorbtionsharz
XAD1180, XAD16, XAD16N, XAD7HP, XAD-7, XAD-4, XAD-2, HP-20, SP-850	spezielle Adsorbtionsharze
XTT	für <i>engl.</i> (sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium) inner salt – ein Tetrazoliumsalz
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Trotz enormer Fortschritte in den vergangenen Jahren besteht nach wie vor ein uneingeschränkter Forschungsbedarf für die Entwicklung effektiver Strategien zur Prävention und Diagnostik von Krebserkrankungen sowie für die Entwicklung neuer Therapieoptionen für Krebspatienten [Wild et al. 2020; AACR 2019 - *Internetquelle*]. Dies gilt insbesondere für Patienten mit Pankreaskarzinom (Bauchspeicheldrüsenkrebs). Denn das Pankreaskarzinom ist eines der aggressivsten und am schlechtesten therapierbaren Krebsarten, für das Inzidenz und Mortalität nach wie vor nah beieinander liegen [Wild et al. 2020; RKI und GEKID 2019; Neoptolemos et al. 2018].

1.1.1 Allgemeines

Die Zahl der Pankreaskrebs-Neuerkrankungen lag in Deutschland im Jahr 2016 bei 18370 Fällen. Mit 18052 Fällen verstarben im selben Jahr nahezu gleich viele Menschen. Die Tendenz ist steigend. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Pankreaskrebs lag 2016 in Deutschland bei nur 9 % (Männer und Frauen). Zum Vergleich: Bei Lungenkrebs, der häufigsten (Männer) bzw. zweithäufigsten (Frauen) Ursache aller tumorbedingten Todesfälle in Deutschland lag sie bei 15 % (Männer) bzw. 21 % (Frauen), bei Darmkrebs (Platz 3 der tumorbedingten Todesfälle bei Männern und Frauen) lag sie bei 62 % (Männer) bzw. 63 % (Frauen), bei Prostatakrebs (Platz 2 der tumorbedingten Todesfälle) bei 89 %, bei Brustdrüsenkrebs (Platz 1 der tumorbedingten Todesfälle bei Frauen) lag sie bei 87 %. Das Pankreaskarzinom wies zusammen mit dem Mesotheliom (ein diffus wachsender Bindegewebstumor) im Jahr 2016 die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf und war die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Männer und Frauen zusammengefasst) [RKI und GEKID 2019].

Weltweit gesehen ist die Prognose bei Pankreaskrebs vergleichbar dramatisch. Hier lag die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2018 bei rund 459000 Fällen. Während Pankreaskrebs im Jahr 2018 weltweit die siebenthäufigste Krebstodesursache war, lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate weltweit bei nur 9 % [Wild et al. 2020].

Die Ursache für diese äußerst schlechte Prognose ist, dass die Mehrzahl der Pankreastumoren aufgrund fehlender Frühsymptome sowie fehlender sensitiver und spezifischer Marker zur Frühdiagnostik erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, für die es derzeit noch keine effektiven Behandlungsmöglichkeiten gibt [Wild et al. 2020; Ying et al. 2016; RKI und GEKID 2015]. Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist seine hohe Neigung zu Invasion und Metastasierung [Seufferlein et al. 2013; Hezel et al. 2006; Trauzold et al. 2005] und sein schlechtes Ansprechen auf verfügbare Krebstherapieformen wie Chemotherapie und Radiotherapie [Arlt et al. 2012; Vincent et al. 2011].

Als Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom gelten Rauchen, starkes Übergewicht, Diabetes mellitus und chronische Pankreatitis. Vermutlich kann auch ein hoher Konsum von Alkohol, von verarbeiteten Fleischwaren sowie von geräucherten und gegrillten Speisen das Risiko für Pankreaskrebs erhöhen. Auch wird eine erbliche Komponente in Betracht gezogen [Wild et al. 2020; RKI und GEKID 2019; Seufferlein et al. 2013].

Länder mit hohem oder sehr hohem Lebensstandard hatten mit 68 % im Jahr 2012 den größten Anteil an der Zahl der Neuerkrankungen. So wurden die höchsten Inzidenzraten in Zentral- und Osteuropa, Nordamerika, Argentinien und Uruguay sowie bei Frauen in Australien nachgewiesen. Relativ niedrige Inzidenzraten wurden in den meisten Ländern Afrikas und Ostasiens beobachtet [Steward und Wild 2014].

Das mittlere Erkrankungsalter lag in Deutschland im Jahr 2016 für Männer bei 72 und für Frauen bei 76 Jahren. Es ist identisch mit dem mittleren Erkrankungsalter bei Darmkrebs [RKI und GEKID 2019]. Aufgrund der zellulären und physiologischen Diversität des Pankreas (Abb. 1.1) sind Neoplasien dieses Organs histologisch sehr vielfältig [Leischner 2010; Ghaneh et al. 2007; Klöppel et al. 1996]. Die meisten Tumoren gehen aus dem exokrinen Anteil des Pankreas hervor. Endokrine Tumoren oder Mischformen sind seltener [Seufferlein et al. 2013; Klöppel et al. 1996]. 90 bis 95 % aller Pankreaskarzinome sind duktale Adenokarzinome (PDAC für *engl.* Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) [Wild et al. 2020; Seufferlein et al. 2013; Klöppel et al. 1996]. Sie entwickeln sich aus prä-malignen Vorstufen von Zellen des Gangepithels, den sog. PanINs (für *engl.* Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) [Seufferlein et al. 2013; Hruban et al. 2000]. Durch azinär-duktales Metaplasie (ADM) können auch die sekretproduzierenden azinären Zellen zur Entstehung der PanINs beitragen [Zhu et al. 2007]. Zystische Tumoren, die ebenfalls aus den Gangzellen hervorgehen, oder azinäre Tumoren, die von den azinären Zellen ausgehen, sind seltener [Seufferlein et al. 2013; Klöppel et al. 1996]. Die seltenen endokrinen Tumoren leiten sich von den endokrinen Zellen der Langerhansschen Inseln ab [Seufferlein et al. 2013; Klöppel et al. 1988]. Lokalisiert sind die malignen Tumoren des PDAC am häufigsten im Pankreaskopf (ca. 65 %), seltener im Pankreaskörper (ca. 15 %) oder Pankreasschwanz (ca. 10 %). Einige (10 %) sind multifokal lokalisiert (an mehreren Orten) [Ghaneh et al. 2007; Klöppel et al. 1996].

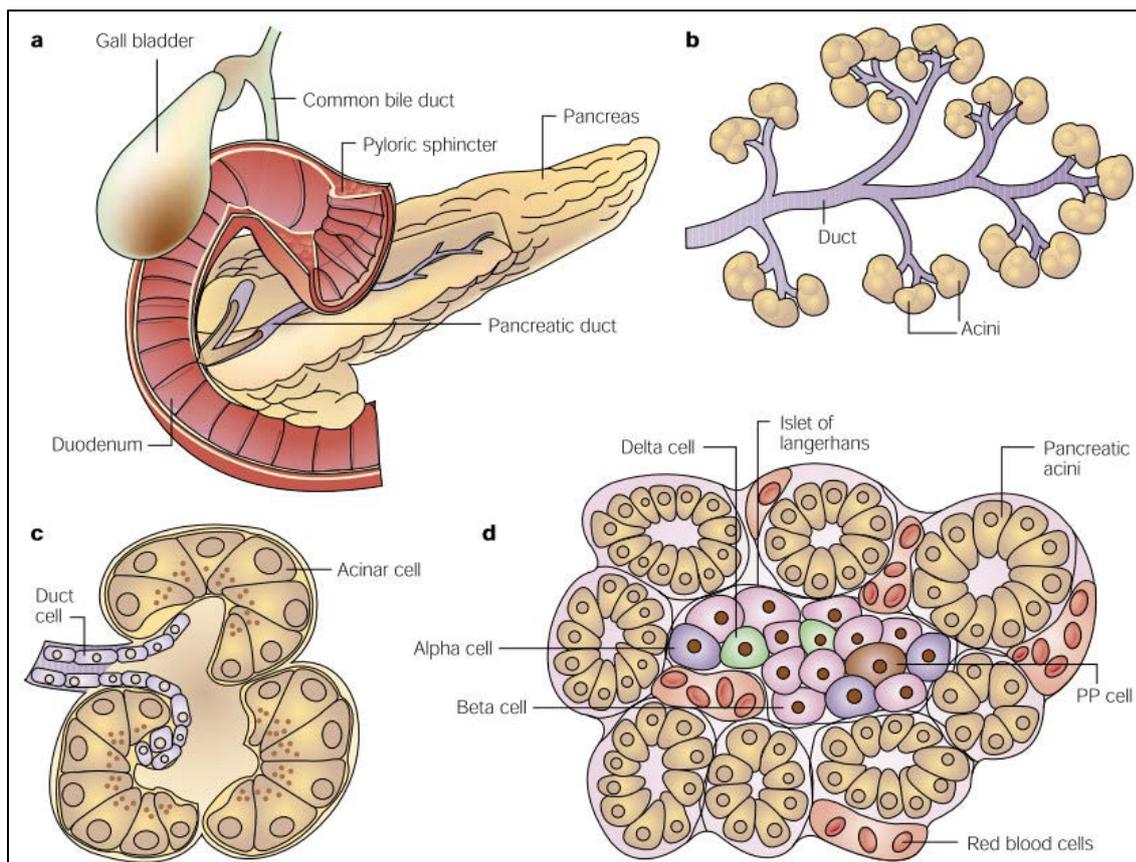


Abbildung 1.1: Anatomie der Bauchspeicheldrüse (Pankreas): a) Gesamtüberblick, b) exokriner Anteil, c) Azinus, d) Langerhanssche Inselzellen (endokriner Anteil) eingebettet in exokrines Gewebe. [Reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [NATURE REVIEWS CANCER] (Vol. 2, pp. 897-909, Bardeesy and DePinho), copyright (2002)].

Die Bauchspeicheldrüse ist die wichtigste Verdauungsdrüse und reguliert die Protein-, Kohlenhydrat- und Fettverdauung durch Produktion von täglich bis zu 2L Verdauungssekret (exokrine Drüsenfunktion). Der exokrine Anteil, der ca. 80 % der Gewebemasse der Bauchspeicheldrüse ausmacht, besteht aus einem verzweigten Netzwerk von Azinus- und Gangzellen. Die sekretproduzierenden Azinuszellen sind um feine Drüsengänge angeordnet und bilden mit ihnen funktionelle Einheiten (Azini). Über die Azini werden die Verdauungsenzyme zunächst in das duktales Pankreaslumen und später in den Zwölffingerdarm abgegeben. Innerhalb der Azini, nahe der Gänge, liegen die zentroazinären Zellen. Die Bauchspeicheldrüse ist außerdem verantwortlich für die Blutzuckerregulation (endokrine Drüsenfunktion). Spezialisierte endokrine Epithelzellen, die in den sog. Langerhansschen Inseln organisiert sind, bilden die verschiedenen Hormone und geben sie direkt ins Blut ab [Hezel 2006; Bardeesy und DePinho 2002].

1.1.2 Therapieoptionen und Überleben

Die chirurgische Therapie ist nach heutigem Wissensstand die einzige potentiell kurative Therapieoption beim Pankreaskarzinom. Allerdings weisen rund 80 bis 85 % der Pankreaskrebs-Patienten bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium auf, bei dem eine Tumor-Resektion im Gesunden (R0-Resektion) nicht mehr möglich ist [Strobel et al. 2019; Seufferlein et al. 2013; Vincent et al. 2011]. Nicht weniger entmutigend ist, dass der geringe Anteil an Patienten, bei dem der Tumor rezidiert werden kann, in den meisten Fällen ein Rezidiv entwickelt [Seufferlein et al. 2013; Wolfgang et al. 2013; Hishinuma et al. 2006]. So lag das mittlere Gesamtüberleben (*engl.* median overall

survival) bei alleiniger Resektion in unterschiedlichen Studien bei nur 14,8 bis 20,2 Monaten (Tabelle 1.1).

Empfohlen wird eine zusätzliche adjuvante Chemotherapie [Seufferlein und Ettrich 2019; Seufferlein et al. 2013], da in mehreren Studien bezüglich Gemcitabin-Gabe gezeigt wurde, dass das mittlere krankheitsfreie Überleben (*engl.* median disease-free survival) durch entsprechende Therapie signifikant, von etwa 5,0 auf 13,4 Monate, verlängert werden kann [Ueno et al. 2009; Oettle et al. 2007]. Das mittlere Gesamtüberleben kann mittels adjuvanter Chemotherapie jedoch nur um wenige Monate, und zwar bis auf 23,6 Monate, verlängert werden (Tabelle 1.1). Zur adjuvanten Therapie sind sowohl Gemcitabin als auch 5-Fluorouracil (5-FU) + Folinsäure (= Leucovorin) als Standard etabliert [Seufferlein et al. 2013], da gezeigt wurde, dass beide Chemotherapeutika vergleichbare Effekte auf das mittlere Gesamtüberleben haben (Tabelle 1.1) [Neoptolemos et al. 2010]. Ergebnisse einer neueren Phase-III-Studie zeigen eine Verlängerung des mittleren Gesamtüberlebens von 25,5 auf 28,0 Monate bei adjuvanter Chemotherapie mit Gemcitabin in Kombination mit Capecitabin gegenüber alleiniger Gemcitabin-Gabe (Tabelle 1.1), sodass empfohlen wird, diese Therapieoption als neuen Standard in der adjuvanten Chemotherapie von PDAC zu etablieren [Neoptolemos et al. 2017].

Patienten mit lokal fortgeschrittenem, inoperablem Tumor, bei denen nicht eindeutig abgeschätzt werden kann, ob es sich bei ihnen um eine potentiell resektable oder rein palliative Therapiesituation handelt, können mittels Chemotherapie und Chemoradiotherapie nach verschiedenen sequentiellen Therapieprotokollen und mit verschiedenen Therapeutika (z.B. Gemcitabin, Bevacizumab, Erlotinib, Capecitabin, Oxaliplatin, 5-FU, Cetuximab, Leucovorin, S-1) behandelt werden. In manchen Fällen kann nach der eingeleiteten Therapie noch rezidiert werden. Eine Standardtherapie ist für diese spezielle Situation noch nicht etabliert [Seufferlein et al. 2013; Wolfgang et al. 2013]. Das mittlere Gesamtüberleben lag bei Patienten in dieser uneindeutigen Situation in unterschiedlichen Studien bei 9,2 - 19,2 Monaten (Tabelle 1.1).

Patienten mit lokal fortgeschrittenem, inoperablem Tumor in eindeutig palliativer Situation werden ebenso wie Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom in der Erstlinientherapie standardmäßig mittels Gemcitabin-Chemotherapie behandelt. Diese palliative Chemotherapie ist auf Basis einer Studie von Burris et al. im Jahre 1997 als Standard etabliert worden, in der Gemcitabin gegenüber 5-FU Vorteile bei der Minimierung von Schmerzen und Gewichtsverlusten sowie eine moderate Verlängerung des mittleren Überlebens (5,65 vs. 4,41 Monate) zeigte. Zuvor war 5-FU das Standardtherapeutikum für fortgeschrittene Stadien des Pankreaskarzinoms. Alternativ können inzwischen auch die Kombinationstherapien Gemcitabin/Erlotinib, FOLFIRINOX (hochtoxisch) oder Gemcitabin/nab-Paclitaxel als Erstlinientherapie eingesetzt werden. Bei Versagen der Erstlinientherapie stehen Folinsäure/Oxaliplatin/5-FU für Gemcitabin-Patienten und Gemcitabin für

FOLFIRINOX-Patienten zur Verfügung [Seufferlein et al. 2013; Wolfgang et al. 2013]. In den zugrundeliegenden Studien [Pelzer et al. 2011; Conroy et al. 2011] konnte das mittlere Gesamtüberleben der Patienten um weitere 4,4 - 4,82 Monate verlängert werden (Tabelle 1.1). Jedoch sind viele Patienten zu schwach für eine Zweitlinientherapie [Wolfgang et al. 2013]. Seit 2016 ist in der Zweitlinientherapie ein neuer Behandlungsstandard für Gemcitabin-Patienten zugelassen (durch die EMA, für das metastasierte Pankreaskarzinom): das nanoliposomal verpackte Irinotecan in Kombination mit 5-FU und Leucovorin [Wang-Gillam et al. 2016].

Tabelle 1.1: Aktuell empfohlene Therapieoptionen für verschiedene Stadien des PDAC in Gegenüberstellung mit dem in verschiedenen klinischen Studien ermittelten mittleren Gesamtüberleben nach Seufferlein et al. [2013] und Wolfgang et al. [2013]. Definition der Tumor-Stadien nach Wittekind [2017]: T1: Primärtumor ≤ 2 cm und noch innerhalb des Pankreas, T2: Primärtumor > 2 cm und noch innerhalb des Pankreas, T3: Tumor hat die Organgrenze überschritten, aber die Arterien noch nicht infiltriert, T4: angrenzende große Arterien sind vom Tumor infiltriert, N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: regionäre Lymphknotenmetastasen, M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasen; CT: Chemotherapie, CRT: Chemoradiotherapie (angegeben ist jeweils nur das Chemotherapeutikum).

UICC-Stadium (TNM-Klassifikation)	Therapieoption	Chemotherapeutikum	Klinische Studien	Mittleres Gesamtüberleben (engl. median overall survival) in Monaten (Angabe histologischer Klassifikation, wenn abweichend vom PDAC und Angabe von Stadien, wenn abweichend von linker Spalte)
IA (T1, N0, M0), IB (T2, N0, M0), IIA (T3, N0, M0), IIB (T1-3, N1, M0): lokale Tumoren; III: im Grenzfall resizierbare Tumoren	chirurgische Resektion	-	Chakraborty und Singh 2013	18,0 (I, IIA, IIB)
			Han et al. 2006	14,8 (hpts. PDAC, I-IV)
			Winter et al. 2006	18,0 (I-IV, hpts. II)
			Wagner et al. 2004	16,0 (I-IV, hpts. III)
	chirurgische Resektion + adjuvante Chemotherapie vs. <i>alleinige chirurgische Resektion</i>	Gemcitabin	Ueno et al. 2009	22,3 vs. 18,4 (I-IV)
			Oettle et al. 2007	22,1 vs. 20,2 (hpts. PDAC)
			Neoptolemos et al. 2004	21,6 vs. 16,9 (keine Angabe von Stadien)
5-FU + Folinsäure vs. Gemcitabin	Gemcitabin + Capecitabin vs. Gemcitabin	Neoptolemos et al. 2010	23,6 vs. 23,0 (I-IV)	
		Neoptolemos et al. 2017	28,0 vs. 25,5 (I-IV, hpts. III)	
III (T4, N0-1, M0): lokal	unklare Therapiesituation	CRT: Gemcitabin, Oxaliplatin,	Crane et al. 2011	19,2

fortgeschrittene, inoperable Tumoren ohne Fernmetastasen	(adjuvante oder palliative): Chemotherapie (CT) oder/und Chemoradiotherapie (CRT), verschiedene Therapieprotokolle, kein Standard etabliert	Cetuximab, Capecitabin		
		CT vs. CRT: beide Gemcitabin	Loehrer et al. 2011	9,2 vs. 11,4
		CRT: S-1	Sudo et al. 2011	16,8
		CRT: 5-FU oder Gemcitabin vs. CT: Gemcitabin	Sawaki et al. 2009	13,0 vs. 12,0
		CRT: Capecitabin + Bevacizumab + CT: Gemcitabin + Bevacizumab	Crane et al. 2009	11,9
		CT: Gemcitabin + Oxaliplatin + CRT: 5-FU + Oxaliplatin	Moureau-Zabotto et al. 2008	12,6
		CRT + CT: beide Erlotinib (=Tarceva) + Gemcitabin	Duffy et al. 2008	18,7
		CT + CRT: 5-FU vs. CT; beide CT mit Folinsäure (=Leucovorin) + 5-FU + Gemcitabin oder Oxaliplatin oder Gemcitabin	Huguet et al. 2007	15,0 vs. 11,7
		eindeutig palliative Situation: Chemotherapie wie für Stadium IV		
IV (T1-4, N0-1, M1): lokal fortgeschrittene, inoperable Tumoren mit Fernmetastasen	palliative Chemotherapie: Erstlinientherapie	nab-Paclitaxel (=Abraxane) + Gemcitabin vs. Gemcitabin	Von Hoff et al. 2013	8,5 vs. 6,7
		FOLFIRINOX (Leucovorin + 5-FU + Irinotecan + Oxaliplatin) vs. Gemcitabin	Conroy et al. 2011	11,1 vs. 6,8
		Erlotinib + Gemcitabin vs. Gemcitabin	Moore et al. 2007	6,24 vs. 5,91 (hpts. IV)
		Gemcitabin vs. 5-FU	Burriss et al. 1997	5,65 vs. 4,41 (hpts. IV, keine Angabe zur Histologie)
	palliative Chemotherapie: Zweitlinientherapie	nach Versagen von Gemcitabin: nanoliposomales Irinotecan (=Onivyde, nal-IRI oder MM-398) + 5-FU + Leucovorin vs. 5-FU + Leucovorin	Wang-Gillam et al. 2016	6,1 vs. 4,2 (ab Zweitlinientherapie)
		nach Versagen von Gemcitabin: Folinsäure + Oxaliplatin + 5-FU vs. beste supportive	Pelzer et al. 2011	4,82 vs. 2,30 (ab Zweitlinientherapie)

		Therapie		
		nach Versagen von FOLFIRINOX: Gemcitabin	Conroy et al. 2011	4,4 (ab Zweitlinientherapie)

Um die nach wie vor schlechte Therapiesituation für Pankreaskrebs-Patienten zu verbessern, bedarf es einerseits verbesserter Methoden für die Frühdiagnostik und andererseits effektiverer Therapieoptionen, insbesondere für fortgeschrittene Stadien [Ying et al. 2016; Arlt et al. 2012].

1.1.3 Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapeutika

Für das PDAC wurde in der jüngeren Vergangenheit eine Vielzahl an genetischen und epigenetischen Modifikationen nachgewiesen, die für die Frühdiagnostik und die Entwicklung effektiverer Therapieoptionen hoffnungsvolle Ansatzpunkte darstellen [Ying et al. 2016; Li, Go et al. 2015; Neureiter et al. 2014; Wolfgang et al. 2013; Arlt et al. 2012; Wong und Lemoine 2009; Bardeesy und DePinho 2002]. Die Herausforderung besteht darin, dieses umfangreiche, spezifische Wissen in eine deutliche Verbesserung der Patientensituation zu übersetzen [Ying et al. 2016], was bisher noch nicht gelungen ist [Neoptolemos et al. 2018].

Somatische Mutationen wurden am häufigsten beim Onkogen KRAS und bei den drei Tumorsuppressorgenen p16/CDKN2A, TP53 und SMAD4 beobachtet [Biankin et al. 2012; Jones et al. 2008]. KRAS spielt nach den gewonnenen Erkenntnissen eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese, und Mutationen im KRAS-Gen können schon in den Vorläuferstadien von PDAC nachgewiesen werden [Wolfgang et al. 2013; Arlt et al. 2012; Bardeesy und DePinho 2002]. Daneben wurden zahlreiche Keimbahnmutationen beobachtet, die für 5 - 10 % aller PDAC-Fälle verantwortlich gemacht werden, u.a. bei den Genen PRSS1 (erbliche Pankreatitis), CDKN2 (Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM)) sowie BRCA2 (Eierstock- und Brustkrebs), ATM und PALB2 (DNA-Reparaturgene) [Rustgi 2014; Shi et al. 2009]. Zu den epigenetischen Modifikationen zählen u.a. DNA-Methylierungen, Histonacetylierungen und -methylierungen sowie veränderte microRNA (miRNA)-Expression [Ying et al. 2016; Li, Go et al. 2015; Neureiter et al. 2014; Delcuve et al. 2009]. Beim PDAC wurden u.a. eine Überexpression von DNA-Methyltransferasen (z.B. EZH2), Histon-Deacetylasen (z.B. HDAC2, HDAC7) und der miRNAs miR-21 und miR-221 sowie eine Unterexpression der miRNAs miR-34, miR-200 und let-7 nachgewiesen [Li, Go et al. 2015; Neureiter et al. 2014].

Von Bedeutung für die Entwicklung effektiverer, zielgerichteter Therapeutika ist, dass nach bisherigen Erkenntnissen nur wenige Hauptsignaltransduktionswege der Pankreaskrebszellen, u.a. der KRAS-, Nf-κB-, EGFR-, VEGF-, TGF-β-SMAD4- und der COX-2-Signalweg, von den zahlreichen genetischen und epigenetischen Modifikationen betroffen sind, welche, abgeleitet aus dieser

Erkenntnis, in ihrer Gesamtheit als Angriffspunkte dienen sollten [Li, Go et al. 2015; Arlt et al. 2012; Wong und Lemoine 2009; Jones et al. 2008]. Die einzelnen Modifikationen führen zur Aktivierung dieser Signalwege, was ursächlich ist für die verstärkte Proliferation, die inhibierte Apoptose, die aggressive Invasion, Angiogenese und Metastasierung der Pankreaskrebszellen und auch für deren Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie. Bei der Kontrolle dieser Prozesse spielt der proinflammatorische Transkriptionsfaktor Nf- κ B eine zentrale Rolle. Er reguliert die Expression zahlreicher Gene der Signalwege und fungiert als wichtige Brücke zwischen entzündlichen Prozessen und Krebs. Daher hat er als Angriffspunkt für neue Therapeutika großes Potential [Li, Go et al. 2015; Arlt et al. 2012; Gupta et al. 2010].

Die geringe Sensitivität der Pankreastumore gegenüber Zytostatika wird u.a. auf das die Krebszellen umgebende, einzigartige Stroma (Tumormikroumgebung) zurückgeführt, das bei Pankreaskrebs besonders dicht (fibrotisch) und schlecht vaskularisiert (hypoxisch) ist, sodass die normalerweise systemisch applizierten Chemotherapeutika die Tumorzellen nur schwer erreichen können [Kota et al. 2017; Li et al. 2010]. Das Tumorstroma spielt bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von PDAC eine bedeutende Rolle [Bardeesy und DePinho 2002]. Es besteht aus mesenchymalen Zellen (Fibroblasten und Sternzellen), Blutgefäßelementen (u.a. Vorstufen von Endothelzellen) und Immunzellen (u.a. Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), die im Laufe der Tumorentstehung, vermutlich in Reaktion auf stimulierende Signale der prämaligen Vorläuferläsionen, der PanINs, eine Aktivierung erfahren. Die Aktivierung führt u.a. zur verstärkten Proliferation der Fibroblasten und Sternzellen (Fibrose) und deren massiver Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix (u.a. Matrixmetalloproteinasen und Kollagene), was insgesamt als Desmoplasie bezeichnet wird [Chu et al. 2007; Li, Fan et al. 2007; Bardeesy und DePinho 2002]. Die gleichzeitige Gabe von Chemotherapeutika mit Therapeutika gegen die Sternzellen des Tumorstromas zur Reduktion der Fibrose könnte die Wirksamkeit von Chemotherapeutika erhöhen [McCarroll et al. 2014]. Eine klinische Studie mit dem Desmoplasie-Inhibitor IPI-926 (Saridegib, Infinity Pharmaceuticals, ein Inhibitor des Hedgehog-Signalweges) in Kombination mit Gemcitabin musste allerdings abgebrochen werden, da der Tumor durch die erfolgreiche Reduktion des Stromas, welche mit verstärkter Tumourvaskularisierung einhergeht [Rhim et al. 2014], deutlich aggressiver geworden ist [Madden 2012 - *Internetquelle*]. Dagegen verspricht die Entwicklung neuer Applikationsformen für Chemotherapeutika ein hoffnungsvoller Ansatz zu sein [Li et al. 2010]. Dieser Ansatz ist Grundlage des nab-Paclitaxels (EMA-Zulassung in 2014 für das metastasierte Pankreaskarzinom in Kombination mit Gemcitabin, Erstlinientherapie). Der Wirkstoff ist als Kombination aus humanem Serumalbumin und dem klassischen Zytostatikum Paclitaxel in Form von Nanopartikeln formuliert. Es wird vermutet, dass das Zytostatikum über die Bindung des Albumins an das im Stroma befindliche Albuminbindende Protein SPARC (*engl.* Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) selektiv ins Tumor-

gewebe eingeschleust und dort angereichert wird [Vaz et al. 2015]. Beim nanoliposomal verpackten Irinotecan wurde im Vergleich zum freien Irinotecan durch die Verkapselung des Wirkstoffes in Liposomen eine längere Zirkulationszeit im Plasma und eine längere Aktivitätsdauer in den Tumorzellen erreicht [Ko 2016].

Neben dem Tumorstroma werden auch die Krebsstammzellen (CSCs für *engl.* Cancer Stem Cells), ein kleiner Anteil von stammzellartigen Zellen im Tumor, für die Resistenz des Tumors gegenüber Chemotherapeutika sowie für dessen beharrliches Wachstum und Metastasierung verantwortlich gemacht [Baghwandin et al. 2016; Li et al. 2013; Hermann et al. 2007; Li, Heidt et al. 2007]. Zellen des Tumorstromas fördern die Selbsterneuerung und Invasivität der CSCs [Lonardo et al. 2012]. Der gezielte Angriff der CSCs, bspw. durch Metformin [Lonardo et al. 2013; Bao et al. 2012], Salinomycin [Zhang et al. 2011] oder verschiedene Naturstoffe [Subramaniam et al. 2018], ist einer der neueren Strategien zur Bekämpfung von Pankreaskrebs [Vaz et al. 2014; Li et al. 2013]. Von großer Bedeutung ist auch die Entwicklung von Kombinationstherapeutika, die bspw. gleichzeitig auf Tumorzellen, CSCs und ruhende Krebszellen [Vaz et al. 2014] oder auf CSCs und Stromazellen abzielen [Lonardo et al. 2012].

Weitere Strategien für die Entwicklung neuer Therapeutika sind u.a. Immunomodulation und Vakzinierung [Banerjee et al. 2018; Thind et al. 2017; Heery et al. 2017; Sideras et al. 2014] sowie die Modulation von Autophagie, einem Vorgang, bei dem Zellen eigene Bestandteile abbauen und wiederverwerten [New et al. 2017; Mulcahy Levy et al. 2017; Lin et al. 2017; Gomez et al. 2015]. In der jüngsten Vergangenheit wurden insbesondere bei der Entwicklung von Immuntherapien große Fortschritte erzielt, die jedoch für Pankreaskrebs noch nicht erfolgversprechend waren [Ducreux et al. 2019; Neoptolemos et al. 2018].

1.1.4 Potential der Phytotherapie bei Pankreaskrebs

Pflanzliche Naturstoffe sind für die Suche nach neuen Krebstherapieoptionen nach wie vor von großer Bedeutung [Lin et al. 2017; Singh et al. 2016; Murphy et al. 2014; Gupta et al. 2010; Wani et al. 1971]. Aufgrund der vielen technischen Fortschritte im Bereich der Trennverfahren, spektroskopischen Techniken und *in vitro*-Assays, aber auch aufgrund der Überlegenheit der Naturstoffe hinsichtlich ihrer chemischen Diversität gegenüber synthetisch hergestellten Substanzbibliotheken hat die Naturstoffforschung seit Ende des 20. Jahrhunderts sogar eine Art Renaissance erlebt [Bucar et al. 2013; Sarker et al. 2006].

Abgeleitet wird die potentielle anti-tumorale Wirksamkeit pflanzlicher Naturstoffe von verschiedenen epidemiologischen Studien, die zeigten, dass das Krebsrisiko durch eine mit bestimmten pflanzlichen Stoffen angereicherte Ernährung deutlich minimiert werden kann [Li, Go et al. 2015; Appari et al. 2014; Gupta et al. 2010; Reddy et al. 2003; Van Poppel und Van den Berg

1997]. So wurde durch eine mit Früchten von Kreuzblütlern angereicherte Ernährung, bspw. mit Brokkoli, Blumenkohl, Weißkohl, Rettich oder Kresse, das Risiko für die Entwicklung von Pankreaskrebs um 50 bis 60 % reduziert [Silverman et al. 1998]. Auch durch regelmäßiges Trinken von grünem Tee wurde das Pankreaskrebsrisiko deutlich reduziert [Wang, Zhang et al. 2012]. Der Nachweis direkter Effekte gegenüber Pankreaskrebs erfolgte in jüngster Zeit in zahlreichen Studien (*in vitro* und/oder *in vivo*): u.a. für verschiedene Polyphenole, wie den Catechinen (grüner Tee) [Shankar et al. 2013; Kürbitz et al. 2011], dem Quercetin (Zwiebeln u.a.) [Lan et al. 2019; Fan et al. 2016; Angst et al. 2013], dem Resveratrol (rote Weintrauben u.a.) [Duan et al. 2016; Xu et al. 2015; Ding und Adrian 2002], dem Curcumin (Kurkuma-Wurzel) [Su et al. 2017; Bimonte et al. 2016; Dhillon et al. 2008; Li et al. 2004] und dem Fisetin (Perückenstrauch) [Youns und Hegazy 2017; Murtaza et al. 2009] sowie für das Sesquiterpen Zerumbon (Ingwer) [Shamoto et al. 2014; Zhang et al. 2012], das Isothiocyanat Sulforaphan (Brokkoli u.a.) [Yin et al. 2019; Li et al. 2012; Pham et al. 2004] und das Alkaloid Ancistrolikokin E₃ (Liane *Ancistrocladus likoko*) [Awale et al. 2018]. Außerdem wurde bei Kombination mit verschiedenen pflanzlichen Stoffen von einer Verstärkung der Wirkung von Gemcitabin [Vendrely et al. 2017; Yoshida et al. 2017; Marasini und Sahu 2017; Yue et al. 2017] sowie der Radiotherapie [Naumann et al. 2017] gegenüber Pankreaskrebs berichtet. Pflanzliche Naturstoffe haben für die Entwicklung neuer Therapieoptionen gegen Pankreaskrebs insbesondere deswegen ein außerordentliches Potential, da sie gleichzeitig in mehrere modifizierte Signaltransduktionswege der Pankreaskrebszellen regulatorisch eingreifen, und zwar über Zielmoleküle wie NF-κB, PTEN, KRAS, VEGF, Histondeacetylasen, DNA-Methyltransferasen und miRNAs [Kunnumakkara et al. 2017; Li, Go et al. 2015; Kanai 2014; Arlt et al. 2012; Gupta et al. 2010]. Hinzu kommt, dass sie eine inhibierende Wirkung auf Pankreas-CSCs zeigen [Subramaniam et al. 2018; Appari et al. 2014; Adikrisna et al. 2012; Shankar et al. 2011; Zhou et al. 2010] und dass sie auch bei Langzeiteinsatz scheinbar keine Resistenzen hervorzurufen [Fan et al. 2016]. Auch wurde einigen Naturstoffen inzwischen die Fähigkeit zur Induktion von Autophagie in Pankreaskrebszelllinien und die damit verbundene Einleitung des Zelltods nachgewiesen [Zhu und Bu 2017; Ueda et al. 2014].

1.2 Potential von Braunalgen als Wirkstoffproduzenten

Neben den Landpflanzen gerieten auch deren Vorläufer, die Meeresalgen, immer mehr in den Fokus der anti-tumoralen Naturstoffforschung [Murphy et al. 2014; Folmer et al. 2010; Roussis et al. 2004]. Anlass dafür war u.a. die Beobachtung, dass in Japan, wo Algen ein fester Bestandteil der Nahrung sind, die postmenopausale Brustkrebsrate deutlich geringer war als in den USA [Teas 1981]. Diese Beobachtung wurde inzwischen für die Braunalge *Undaria pinnatifida* in einer klinischen Studie bestätigt [Teas et al. 2013].

1.2.1 Diversität der Algen und die besonderen Eigenschaften von Braunalgen

Zu den Algen zählen alle chlorophyllhaltigen Lebewesen, die Fotosynthese betreiben, mit Ausnahme von Moosen, Farnen, Samenpflanzen, Cyanobakterien und Prochlorophyceen. Algen sind aufgrund fehlender Gametangien bzw. Sporangien von den höheren Pflanzen abgegrenzt. Sie sind in Größe, Lebensformen und Lebensraum sehr heterogen. Die Größenabmessungen reichen vom Nanoplankton von weniger als 1/1000 mm bis hin zu 60 m langen Riesentangen. Algen treten als einzellige Einzellebewesen, als Einzeller in Zellkolonien oder als vielzellige Arten auf, welche kugelig oder fädig organisiert sind bzw. echte Gewebe bilden. Einzellige Algen werden als Mikroalgen, vielzellige als Makroalgen bezeichnet. Algen besiedeln sehr unterschiedliche und auch extreme Lebensräume [Wersal und Madsen 2012; Probst 1997; Lüning 1985]. Aufzufinden sind sie in den kalt- und warmgemäßigten Regionen der Ozeane [Lüning 1985] oder auch im Süßwasser [Belcher und Swale 1976], in tropischen Korallenriffen [Probst 1997; Lüning 1985], in polaren Packeisfeldern, in heißen Quellen und vereisten Hochgebirgsgipfeln [Probst 1997], im Boden oder auch in Symbiose mit Pilzen (Flechten) [Ettl und Gärtner 2014].

Algen werden anhand ihrer Fotosynthese-Pigmente systematisch u.a. in Rotalgen (Rhodophyta), Braunalgen (Phaeophyta) und Grünalgen (Chlorophyta) gegliedert [Probst 1997; Van den Hoek et al. 1993; Lüning 1985; Lobban und Wynne 1981]. Ein wesentliches Charakteristikum der Braunalgen ist das in den Chloroplasten befindliche akzessorische Pigment Fucoxanthin, ein Carotinoid, das den Braunalgen die braune Farbe verleiht [Van den Hoek et al. 1993; Lüning 1985]. Etwa 265 Gattungen und 1500 bis 2000 Arten gehören zur Klasse der Braunalgen [Van den Hoek et al. 1993; Wynne 1981]. Es gibt nur sehr wenige nichtmarine Arten [Wehr 2016; Bourrelly 1981]. Die meisten Braunalgen leben festgewachsen auf Felsküsten oder auf anderen marinen Hartsubstraten im Küstenbereich, wie Deiche, Kaimauern, lose Muscheln, Seegras und andere Meeresalgen [Van den Hoek et al. 1993]. Braunalgen zeigen eine große morphologische Vielfalt [Wynne 1981]. Neben winzigen, fädigen und scheibenförmigen Formen lassen sich Braunalgen in Form von derben Tangen finden, die in auffälligen Zonen wachsen [Lüttge und Kluge 2012; Van den Hoek et al. 1993; Wynne 1981]. Zu nennen sind bspw. die *Fucus*-Zone innerhalb der Gezeitenzone des Nordatlantiks, die *Laminaria*-Wälder unterhalb der Niedrigwasserlinie der nordatlantischen und nordpazifischen Küsten und die tiefliegenden Wälder der 30 bis 60 m langen Riesentange *Macrocystis* und *Nereocystis* an den pazifischen Küsten Nordamerikas [Van den Hoek et al. 1993]. Einzeller und Zellverbände gibt es bei den Braunalgen nicht [Esser 1986].

Für die Wirkstoffforschung sind Braunalgen u.a. aufgrund folgender Eigenschaften interessant:

a. Anpassung an die Stressbedingungen in der Küstenzone:

In den felsigen Küstenzonen sind Braunalgen die vorherrschenden Algenarten. Dort sind sie häufig starken Stressbedingungen ausgesetzt, wie z.B. starker Brandung, dichter Besiedlung, aufgrund der Gezeiten bzw. der unterschiedlichen Windbedingungen ständig wechselnden Wasserständen mit z.T. längerem Trockenliegen, wechselnden Lichtintensitäten bis hin zu starker Sonneneinstrahlung sowie unterschiedlichen Temperaturen und Salinitäten. Gegenüber diesen schwierigen Bedingungen zeigen Braunalgen interessante Anpassungen [Cock et al. 2010]. Die Synthese von Polyphenolen in Braunalgen wird bspw. als Schutzmaßnahme gegenüber UV-Strahlung [Pavia et al. 1997] und Fraßfeinden [Rohde und Wahl 2008; Geiselman und McConnell 1981] angesehen. Wasserlösliche Na-Alginat bilden zusammen mit Fucoidanen eine schleimige Fraktion in den Zellwänden der Braunalgen [Van den Hoek et al. 1993], welche die Algen vor mechanischem Stress schützt [Cock et al. 2010].

b. eine von den Landpflanzen unabhängige evolutionäre Entwicklung:

Braunalgen haben als Mitglieder der Gruppe der Stramenopilen vor etwa 1,5 Milliarden Jahren eine von den Grünalgen (und vor etwa 1,3 Milliarden Jahren eine von den Rotalgen) unabhängige evolutionäre Entwicklung vollzogen [Yoon et al. 2004]. Aus den Grünalgen sind vor etwa 450 Millionen Jahren die Landpflanzen hervorgegangen [Niklas und Kutschera 2010]. Aufgrund der lange zurückliegenden evolutionären Trennung von den Grünalgen weisen Braunalgen im Vergleich zu den Landpflanzen eine Vielzahl außergewöhnlicher Stoffwechselwege auf, die sie dazu befähigen, besondere Biomoleküle zu bilden, die in den Landpflanzen nicht aufzufinden sind, wie z.B. Alginat, sulfatierte Polysaccharide (Fucoidane, Laminarine), Fucoxanthin und Phlorotannine [Teas et al. 2013; Cock et al. 2011].

1.2.2 Einsatz von Algen und Braunalgen für medizinische Zwecke

Die Verwendung mariner Algen für medizinische Zwecke hat ebenso wie die Verwendung als Nahrungsmittel vor allem im asiatischen Raum lange Tradition [Folmer et al. 2010; Steneberg 2004; Teas et al. 2004; Fitton 2003; Burtin 2003]. So werden Algen seit mehr als 2000 Jahren in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) und in der chinesischen Volksmedizin genutzt [Liu et al. 2012; Chengkui et al. 1984; Hoppe 1979]. In der TCM werden u.a. die braunalgenhaltigen Präparate Kunpu (*Laminaria japonica*) und Haicao (*Sargassum pallidum* und *Sargassum fusiforme*) eingesetzt [Liu et al. 2012; Steneberg 2004; Chengkui et al. 1984]. Des Weiteren ist die jahrtausendelange medizinische Nutzung von Algen und Braunalgen in der Ayurvedischen Medizin [Misra und Sinha 1979] sowie bei den alten Ägyptern auf dem Papyrus Ebers [Ebers 1875] dokumentiert [Teas et al. 2004]. Für lange Zeit waren Braunalgen aufgrund des Iods, das sie in großen Mengen aus dem

Meerwasser akkumulieren, von medizinischer Bedeutung, u.a. zur Behandlung des Schilddrüsenkropfes [Teas et al. 2004]. Bis in die 1930er Jahre wurden Braunalgen für die Iodgewinnung als Rohstoff genutzt, bevor sie von preisgünstigeren Mineralquellen (Silber- und Salpeterablagerungen) abgelöst wurden [Van den Hoek 1993; Chapman 1970]. Aufgrund seines hohen Iodgehalts ist der Blasentang (*Fucus vesiculosus*) im Europäischen Arzneibuch [engl. European Pharmacopoeia 9th Edition, Council of Europe 2017] gelistet [Kim 2012; Burtin 2003].

Seit den 1970er Jahren und insbesondere seit der Jahrtausendwende wird in zahlreichen Veröffentlichungen von äußerst vielfältigen, medizinisch nutzbaren Effekten von Braunalgeninhaltsstoffen, die bisher vorrangig in *in vitro*- und Tierstudien nachgewiesen worden sind, berichtet [Sanjeeva et al. 2017; Deniaud-Bouët et al. 2017; Abdul et al. 2016; Wan-Loy und Siew-Moi 2016; Hussain et al. 2016; Murphy et al. 2014; Yende et al. 2014; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014; Gupta und AbuGhannam 2011; Fitton et al. 2003].

1.2.3 Biomoleküle von Braunalgen und deren therapeutisches Potential

Den größten Anteil der Biomoleküle in Braunalgen bilden mit bis zu 70 % des Trockengewichts die Polysaccharide, wie z.B. Cellulose, Alginate, Fucoide und Laminarine. Fucoide und Laminarine gehören zur Gruppe der sulfatierten Polysaccharide [Holdt und Kraan 2011; Fitton 2003; Burtin 2003; Percival 1979]. Cellulose ist zusammen mit Alginaten und Fucoide in den Zellwänden der Braunalgen aufzufinden. Laminarine werden von den Braunalgen als Reservestoffe angelegt [Holdt und Kraan 2011; Van den Hoek et al. 1993; McCandless 1981; Percival 1979].

Braunalgen sind vor allem aufgrund der enthaltenen Alginate, die Salze der Alginsäure, die als sog. Hydrokolloide gelierende, verdickende und stabilisierende Eigenschaften aufweisen, von großer Bedeutung für die Industrie [Bixler und Porse 2011; Draget et al. 2005; Khotimchenko et al. 2001; Van den Hoek et al. 1993]. Neben ihrer Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie werden Alginate auch in der pharmazeutischen Industrie seit langer Zeit vielseitig eingesetzt, u.a. um Emulsionen und Suspensionen zu stabilisieren, als Bindemittel in Tabletten und zur Wundheilung [Sun und Tan 2013; Lee und Mooney 2012; Draget et al. 2005; Khotimchenko et al. 2001; Van den Hoek et al. 1993] sowie zur Therapie des gastroösophagealen Reflux [Washington und Denton 1995; Stanciu und Bennet 1974]. Viele Studien beschäftigten sich mit der kontrollierten Arzneistofffreisetzung durch Alginate, neuerdings in der Form von Nanopartikeln [Kumar et al. 2017; Liew et al. 2006; Fundueanu et al. 1998], aber auch mit dem Einsatz von Alginaten im Bereich der Geweberegeneration [Almeida et al. 2017; Venkatesan et al. 2015; Sun und Tan 2013; Lee und Mooney 2012]. In wenigen verfügbaren Studien zeigten Alginate anti-tumorale Effekte [Alves de Sousa et al. 2007; Fujihara et al. 1984].

Fucoidane sind große, verzweigte Polysaccharide mit einem wesentlichen Gehalt an sulfatierter L-Fucose und geringen Mengen an Galactose, Xylose, Mannose und Uronsäuren [Chevolot et al. 1999; Percival und Ross 1950]. Sie unterscheiden sich von Algenart zu Algenart in ihrer Struktur [Berteau und Mulloy 2003; Chevolot et al. 1999]. Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivitäten werden sie seit der Jahrtausendwende besonders intensiv erforscht [Luthuli et al. 2019; Fitton et al. 2019; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014; Rajeshkumar et al. 2013; Wijesinghe und Jeon 2012; Berteau und Mulloy 2003]. Da sie partiell strukturelle Ähnlichkeit zum humanen Heparin haben [Chevolot et al. 2001], zeigen sie eine Reihe Heparin-ähnlicher Effekte [Fitton 2003], wie bspw. anti-koagulative [Zayed et al. 2016; Jin et al. 2013; Chevolot 1999; Church et al. 1989], anti-virale [Li et al. 2017; Wang et al. 2017; Damonte et al. 2004], anti-adhäsive [Cumashi et al. 2007] und anti-metastatische [Pan et al. 2019; Teng et al. 2015; Alekseyenko et al. 2007] Eigenschaften. Des Weiteren sind den Fucoidanen anti-inflammatorische [Takahashi et al. 2018; Ryu und Chung 2015; Cumashi et al. 2007], immunmodulierende [Yuguchi et al. 2016; Halling et al. 2015; Maruyama et al. 2003], anti-oxidative [Saravana et al. 2016] sowie verschiedene weitere Anti-Krebs-Effekte nachgewiesen worden, und zwar gegenüber verschiedenen Krebszelllinien zytotoxische sowie anti-tumorale [Sanjeewa et al. 2017; Yang et al. 2015; Synytsia et al. 2010; Yamamoto et al. 1984] und anti-angiogene [Cong et al. 2016; Teng et al. 2015; Chen et al. 2015; Koyanagi et al. 2003] Effekte.

Weitere Inhaltsstoffe von Braunalgen sind Proteine, Peptide, Aminosäuren (zusammen max. 24 % des Trockengewichts), Lipide (max. 10 % des Trockengewichts) wie Fette, Glycolipide, Phospholipide, (mehrfach ungesättigte) Fettsäuren, Terpene (z.B. Carotinoide (die Pigmente Fucoxanthin, β -Carotin und Violaxanthin), fettlösliche Vitamine (A, D, E, K) und Sterole (z.B. Fucosterol)), wasserlösliche Vitamine (C, Biotin, Niacin), Mineralien (neben Jod auch Calcium, Arsen), der Zuckeralkohol Mannitol (ein weiterer Reservestoff), weitere Pigmente (Chlorophyll a, c) sowie Phlorotannine (1-10 % des Trockengewichts) und andere Phenole (Ableitung vom Tyrosin) [Gosch et al. 2012; Holdt und Kraan 2011; Steneberg 2004; Burtin 2003; Fitton 2003; Ragan und Glombitza 1986; Ragan 1981].

Verschiedenen Carotinoiden, so auch dem Fucoxanthin aus Braunalgen, wurden anti-oxidative Eigenschaften nachgewiesen und, damit verbunden, vorbeugende Effekte in Bezug auf Krankheiten, die mit oxidativem Stress einhergehen, wie bspw. Krebs [Kang et al. 2014; Heo und Jeon 2009; Rao und Rao 2007; Burtin 2003; Yan et al. 1999; Nishino 1998; van Poppel und van den Berg 1997]. Hinsichtlich seiner medizinisch nutzbaren Eigenschaften ist Fucoxanthin, wie die Fucoidane, in den letzten Jahrzehnten besonders intensiv untersucht worden [Satomi 2017; Zhang, Tang et al. 2015; Murphy et al. 2014; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014]. Neben den anti-oxidativen Effekten wurden auch anti-inflammatorische [Zhao et al. 2017; Tan und Hou 2014], Fettleibigkeits-

reduzierende [Miyashita et al. 2017; Maeda et al. 2005] sowie verschiedene Anti-Krebs-Effekte nachgewiesen, und zwar anti-karzinogene [Satomi 2017; Satomi und Nishino 2013; Okuzumi et al. 1993], gegenüber verschiedenen Krebszelllinien zytotoxische [Almeida et al. 2018; Lopes-Costa et al. 2017; Kotake-Nara et al. 2001; Okuzumi et al. 1990], anti-metastatische [Garg et al. 2019; Chung et al. 2013], anti-angiogene [Sugawara et al. 2006] sowie anti-tumorale Effekte [Terasaki et al. 2019; Wang, Cheng et al. 2012; Yamamoto et al. 2011].

Auch die Phlorotannine, das sind Polyhydroxyphenole, die bisher offenbar nur in Braunalgen entdeckt worden sind [Freile-Pelegrín und Robledo 2013; Ragan und Glombitza 1986], weisen ein enormes Wirkstoffpotential auf [Montero et al. 2018; Catarino et al. 2017; Sanjeewa et al. 2016; Murphy et al. 2014; Li, Wijesekara et al. 2011; Wijesekara et al. 2010]. Wie die Tannine der Landpflanzen präzipitieren Phlorotannine der Braunalgen Proteine aus Lösungen und binden an Metallionen [Ragan und Glombitza 1986]. In ihrem chemischen Aufbau unterscheiden sie sich jedoch deutlich von den Landpflanzen-Tanninen [Isaza Martínez und Torres Castañeda 2013; Boopathy and Kathiresan 2010; Burtin 2003; Van Alstyne 1995]. Während jene auf Gallussäuren bzw. auf Flavonoiden basieren [Khanbabae und van Ree 2001; Haslam 1996], sind die Phlorotannine Polymere des Phloroglucinols (1,3,5-Trihydroxybenzen) [Ragan und Glombitza 1986]. Aufgrund der vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten der Phloroglucinol-Bausteine sind Phlorotannine strukturell äußerst divers [Isaza Martínez und Torres Castañeda 2013; Burtin 2003]. Sie werden entsprechend der Art der Verknüpfung ihrer Monomere in Fucole (nur Phenylbindungen), Phlorethole (nur Aryl-etherbindungen) und Fucophlorethole (Phenyl- und Aryletherbindungen) mit jeweils mehreren Untergruppen eingeteilt [Isaza Martínez und Torres Castañeda 2013; Ragan und Glombitza 1986]. Phlorotannine dienen den Algen offenbar dazu, Fraßfeinde abzuwehren [Rohde und Wahl 2008; Geiselman und McConnell 1981] sowie als Schutz vor UV-Strahlung [Pavia et al. 1997] und Pathogenen [Sieburth und Conover 1965]. In zahlreichen Studien wurden den Phlorotanninen anti-oxidative [Hermund et al. 2018; Sathya et al. 2017; Shibata et al. 2015; Wang, Jónsdóttir et al. 2012; Nakamura et al. 1996] und auch damit verbundene anti-kanzerogene Eigenschaften nachgewiesen [Park und Pezzuto 2013; Parys et al. 2010]. Des Weiteren zeigten Phlorotannine in verschiedenen Studien anti-inflammatorische [Zhang, Zhou et al. 2019; Barbosa et al. 2017; Wei et al. 2016; Shibata et al. 2003], anti-diabetische [Lee et al. 2017; Okada et al. 2004], anti-bakterielle [Kim, Dasagrandhi et al. 2018; Le Lann et al. 2016; Eom et al. 2013; Sandsdalen et al. 2003], anti-virale [Cho et al. 2019; Eom et al. 2015; Ahn et al. 2004] sowie verschiedene Anti-Krebs-Effekte. So wurde von anti-tumoralen [Zhang, Guo et al. 2019; Sadeeshkumar et al. 2017; Ahn et al. 2015], anti-proliferativen bzw. zytotoxischen [Mondal et al. 2017; Montero et al. 2016; Li, Qian et al. 2011], Apoptose-

induzierenden [You et al. 2018; Eo et al. 2016; Kong et al. 2009], anti-angiogenen [Li, Li et al. 2015; Li, Li et al. 2011] und anti-metastatischen [Kim et al. 2015; Park und Jeon 2012] Effekten berichtet.

Begünstigt durch die im Meer verfügbaren Brom-, Chlorid- und Iod-Ionen bilden Braunalgen (wie auch Rot- und Grünalgen) auch halogenierte Moleküle, und dies offenbar als Antwort auf oxidativen Stress. Viele verschiedene Stoffgruppen werden halogeniert, u.a. Peptide, Alkane, Terpene, Fettsäuren, Polyketide, Indole, Phlorotannine und andere Phenole [Cabrita et al. 2010; La Barre et al. 2010]. Den halogenierten Molekülen wird ebenfalls ein weitreichendes Wirkstoffpotential zugeschrieben [Liu et al. 2011; Gupta und Abu-Ghannam 2011; Holdt und Kraan 2011; Cabrita et al. 2010].

1.2.4 Braunalgen in anti-tumoralen und anti-proliferativen Studien

In den frühen Studien der 70er und 80er Jahre wurde die anti-tumorale Wirksamkeit von Braunalgen in Mausmodellen (via Extraktinjektion) nachgewiesen [Murphy et al. 2014], und dies u.a. gegenüber Sarkom 180, Leukämie L1210 und P388 sowie Ehrlich-Aszites-Karzinom. Die untersuchten Braunalgen gehörten vorrangig zu den Gattungen *Sargassum* und *Laminaria*. Aber auch *Ecklonia*, *Eisenia* und *Macrocystis* wurden untersucht. Die Algen stammten vorrangig aus Japan [Yamamoto et al. 1974, 1977, 1981, 1982, 1984; Nakazawa et al. 1974; Ito und Sugiura 1976; Maruyama und Yamamoto 1984]. Zum Teil wurden aber auch Algen aus Argentinien untersucht [Mayer und Panick 1982, 1984]. In diesen frühen Studien wurde mit groben Fraktionen oder auch schon mit partiell aufgereinigten Fraktionen gearbeitet. Zunächst lag der Fokus auf Polysacchariden, und konkret bereits auf dem Fucoïdan [Murphy et al. 2014]. Anschließend wurde das Carotenoid Fucoxanthin isoliert und ab den 90er Jahren verstärkt auf Effekte gegen Krebs untersucht [Hosokawa et al. 1999; Nishino et al. 1998; Okuzumi et al. 1990]. Seit etwa 15 Jahren beschäftigt man sich ganz besonders intensiv mit mehr oder weniger reinem Fucoïdan [Murphy et al. 2014; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014; Senthikumar et al. 2013]. Daneben traten auch Polyphenolfractionen immer mehr in den Fokus von anti-proliferativen Studien [Murphy et al. 2014; Li, Wijesekara et al. 2011].

Die meisten der neueren Studien sind *in vitro*-Studien, in denen bereits umfangreich die Mechanismen der aufgefundenen Effekte untersucht werden. Die Umsetzung des bisherigen Wissens in ein modernes Therapeutikum gegen Krebs erfordert jedoch noch viele Schritte [Murphy et al. 2014]. Mit Fucoïdan als komplementäres Therapeutikum wurden inzwischen erste klinische Studien erfolgreich durchgeführt [Takahashi et al. 2018; Tsai et al. 2017].

Zytotoxische bzw. anti-proliferative Effekte von Braunalgeninhaltsstoffen sind inzwischen gegenüber einer Vielzahl von verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen worden, z.B. gegenüber Darm-, Brust- und Prostatakrebszelllinien sowie Melanom-, Lymphom- und Leukämiezelllinien [Sanjeewa et al. 2017; Hussain et al. 2016; Murphy et al. 2014; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014; Moussavou et

al. 2014]. Die in den Studien untersuchten Braunalgen stammen von vielen verschiedenen Standorten weltweit und umfassen viele verschiedene Arten [Hussain et al. 2016; Murphy et al. 2014].

Auch *Fucus vesiculosus* hat in die Anti-Krebs-Studien inzwischen Einzug gefunden. Die meisten dieser Studien waren jedoch keine breitangelegten Inhaltsstoff-Wirkungs-Analysen, sondern dem aus der Braunalge isolierten Fucoïdan gewidmet, und zwar meist dem kommerziell erhältlichen Fucoïdan von Sigma-Aldrich (siehe Anhang 1, Tabelle A.1). Ob *F. vesiculosus* inhibitorische Effekte gegenüber Pankreaskrebszelllinien aufweist, wurde offenbar noch nicht untersucht (Anhang 1, Tabelle A.1). Derartige Studien gab es bisher nur unter Einsatz anderer Braunalgenarten, durchgeführt von einer indisch-US-amerikanischen Arbeitsgruppe (mit indischen Braunalgen) [Aravindan et al. 2017, 2015, 2013; Delma et al. 2019, 2015] und einer Arbeitsgruppe aus Jamaika (mit jamaikanischen Braunalgen) [Lowe et al. 2016]. Eine neuseeländische Arbeitsgruppe untersuchte Effekte von Fucoxanthin gegenüber Pankreaskrebszelllinien. Die Herkunft des untersuchten Fucoxanthins ist allerdings (noch) nicht veröffentlicht [Wu 2015]. Kürzlich veröffentlichte auch eine chinesische Arbeitsgruppe eine Pankreaskrebszellstudie mit dem in China bezogenen Braunalgenphlorotannin Eckol [Zhang, Zhou et al. 2019].

1.2.5 *Fucus vesiculosus* und die Ostsee als Sammelstandort

Fucus vesiculosus L., der sog. Blasentang (Abb. 2.3 - 2.7), erstmalig beschrieben von Carl von Linné im Jahre 1753 [Linnaeus 1753], gehört zur Familie der *Fucaceae* und ist ein Vertreter aus der Ordnung *Fucales* [AlgaeBase 2017 - *Internetquelle*]. Die mehrjährige Alge weist eine Größe von bis zu 50 cm auf und siedelt mit einer sog. Haftscheibe auf Hartsubstraten, wie Steinen, Kaimauern oder Miesmuschelschalen. Die im lederartigen Thallus meist paarweise auftretenden und mit Luft gefüllten Vesikel haben zur Namensgebung der Algenart beigetragen und sorgen für einen aufrechten Stand [Fürhapter et al. 2008; Hübel 1969].

Der Blasentang ist eine charakteristische Braunalgenart der arktisch-kaltgemäßigten Breiten des Nordatlantiks [Lüning 1985] und die häufigste und auffälligste Braunalgenart der Ostsee [Kautsky et al. 1992; Hübel 1969]. *F. vesiculosus* ist weitestgehend resistent sowohl gegenüber Wärme und Kälte (eurytherm) als auch gegenüber hohen und niedrigen Salzgehalten (euryhalin). So kommt die Algenart bis Nordafrika und auch bis in die innere Ostsee vor [Kautsky et al. 1992; Lüning 1985]. Im Nordpazifik findet man *F. vesiculosus* dagegen nicht [Lüning 1985].

Umweltfaktoren wie Salzgehalt [Ragan und Glombitza 1986], Temperatur [Abdala-Díaz et al. 2006], UV-Einstrahlung [Pavia und Brock 2000] und Fraßfeinde [Pavia und Toth 2000] haben aber offenbar einen Einfluss auf die Synthese von bestimmten Biomolekülen in Algen. So wurden Unterschiede im

Stoffprofil derselben Algenart, die von unterschiedlichen Standorten gesammelt wurden, nachgewiesen [Tanniou et al. 2014; Koivikko et al. 2008; Jensen und Haug 1956].

Die Ostsee wurde als Sammelstandort für *F. vesiculosus* in Anti-Krebs-Studien zu Beginn der vorliegenden Studie und bis zur Veröffentlichung der Studie von Shen et al. [2017] offenbar nicht berücksichtigt (Anhang 1, Tabelle A.1). Dabei weist sie als vom Festland fast vollständig umschlossenes und erdgeschichtlich sehr junges Meer im Vergleich zur Nordsee und dem Nordatlantik eine Reihe besonderer Eigenschaften auf [Rheinheimer 1996, Bäck et al. 1992], die sie als Habitat für *F. vesiculosus* im Hinblick auf die Suche nach potentiell neuen Wirkstoffen gegen Krebs sehr interessant macht. Diese sind u.a.:

- eine geringe Salinität: Die westliche Ostsee (Beltsee) hat einen Salzgehalt von 25-15 ‰. In der zentralen Ostsee liegt der Salzgehalt bei 8 bis 6 ‰, im Finnischen und Bottnischen Meerbusen bei weniger als 2 ‰ [Rheinheimer 1996]. In den Küstengebieten des Nordatlantiks beträgt der Salzgehalt dagegen rund 30-35 ‰ [NASA 2011 - *Internetquelle*]. (Angabe ist jeweils der Salzgehalt im Oberflächenwasser.)
- kaum vorhandene Gezeiten: Der Tidenhub der Ostsee ist geringer als 15 Zentimeter. Die wahrnehmbaren Wasserstandsschwankungen der Ostsee werden überwiegend durch Wind verursacht. Deren Maxima liegen aber unterhalb derer der Nordseeküsten [Rheinheimer 1996]. An den Küsten des Nordatlantiks beträgt der Tidenhub in den meisten Gebieten mehrere Meter bis zu einem Maximum von 14,5 Metern [Spektrum 2000 - *Internetquelle*].
- große jährliche Temperaturunterschiede: Die mittlere Temperaturjahresschwankung beträgt im Oberflächenwasser der Ostsee 15-16 °C. Im Winter kommt es zur Eisbildung. In der Nordsee sorgen der Einfluss des Golfstroms (bzw. des Nordatlantikstroms) für deren Nichtgefrieren im Winter und die vorhandenen Gezeiten für kühlere Wassertemperaturen im Sommer [Rheinheimer 1996].

1.3 Wirkstoffsuche nach dem Ansatz der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung

Für die Untersuchungen des Potentials des Ostsee-*F. vesiculosus* für Wirkstoffe gegen Krebs wurde der Ansatz der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung (*engl.* bioassay-guided fractionation) angewendet. Dies ist ein Ansatz, der verschiedene Trennverfahren und analytische Methoden mit einer biologischen oder biochemischen Fragestellung verknüpft. Aus dieser interdisziplinären Herangehensweise resultiert die Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen, denen eine biologische Bedeutung - mit Hinweis auf eine Anwendung - zugeordnet werden kann [Weller 2012]. Dies ist ein klarer Vorteil dieses modernen Ansatzes im Vergleich zu einer der älteren Strategien der Naturstoffforschung, welche auf die alleinige Isolierung von Substanzen ausgerichtet war [Weller et al. 2012; Sarker et al. 2006]. Beispiele für diese klassische Herangehensweise sind die vielen Studien

der Arbeitsgruppe von Prof. Glombitza vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn, die seit den 70-er Jahren führend auf dem Gebiet der Isolation von Phlorotanninen aus Braunalgen ist [Isaza Martínez und Torres Castañeda 2013]. Die meisten Substanzen wurden von der Arbeitsgruppe allerdings ohne Hinweis auf eine biologische Anwendung isoliert [Glombitza und Schmidt 1999; Glombitza und Hauperich 1997; Keusgen und Glombitza 1995; Glombitza und Gerstberger 1985; Glombitza et al. 1977, 1975].

Die Aktivitäts-geleitete Fraktionierung als moderner Ansatz hat sich aus der Notwendigkeit entwickelt, aus einer Flut an analytischen Daten, die dank der bedeutenden Fortschritte im Bereich der Trennverfahren und spektroskopischen Techniken, der Entwicklung miteinander gekoppelter Techniken (z.B. GC-MS, LC-MS, LC-NMR-MS) und deren Automatisierung zu High-Throughput Screening-Plattformen (HTS, *engl.* für Hochdurchsatztestung) aufgekommen ist, die relevanten Daten auszuwählen [Weller 2012; Sarker et al. 2006].

Prinzipiell können als Trennverfahren einfache Fraktionierungen bis hin zu anspruchsvollen Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographien (HPLC für *engl.* high-performance liquid chromatography) oder Elektrophoresen, allein oder zu einem mehrstufigen Prozess kombiniert, eingesetzt werden. Die Fraktionen werden gesammelt und in einem (oder mehreren) ausgewählten *in vitro*-Assay(s) auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Gleichzeitig werden mit ausgewählten analytischen Verfahren physikochemische Signale von den Fraktionen aufgenommen. Die Ergebnisse des biologischen Assays werden schließlich mit den analytischen Signalen korreliert, und dem beobachteten Effekt wird auf diese Weise eine bestimmte Substanz zugewiesen. Um von einem komplexen Extrakt zu einer reinen Substanz mit klarer Wirkungsdefinition zu gelangen, müssen gegebenenfalls verschiedene Trennverfahren miteinander kombiniert werden. Der Weg dahin ist gekennzeichnet durch mehrere Zyklen der Auftrennung (angefangen bei der initialen Grobfraktionierung bis hin zur Feinfraktionierung) und Substanz-Wirkungs-Analytik (sog. iterativer Prozess) [Weller 2012; Sarker et al. 2006; Bhakuni und Rawat 2005].

Erfolgreiche Beispiele der Anwendung des Ansatzes der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung im Bereich der Wirkstoffe gegen Krebs aus Braunalgen sind u.a. die Isolierung des gegenüber verschiedenen Krebszelllinien (T47D, HT29) zytotoxischen Fucosterols aus *Sargassum angustifolium* [Khanavi et al. 2012] oder die Isolierung mehrerer gegenüber verschiedenen Krebszelllinien (A549, BGC-823, MCF-7, Bel7402, HCT-8) zytotoxischen Bromphenolen aus *Laethesia nana* [Xu et al. 2004].

1.4 Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Wirkstoffpotential der auffälligsten Braunalge der Ostsee, dem Blasentang (*F. vesiculosus*), gegenüber Pankreasadenokarzinom (PDAC)-Zellen systematisch untersucht werden. Die grundlegende Motivation für diese Studie war die Hoffnung, im *F. vesiculosus* aus der Kieler Förde neue Wirkstoffe gegen diese Krebsart mit besonders schlechter Prognose zu finden.

Von der Braunalge sollten zunächst verschiedene Rohextrakte produziert und deren Aktivität gegenüber ausgewählten PDAC-Zelllinien getestet werden. Im Zuge der Untersuchungen sollte für die Wirkstoffe des aktivsten Rohextrakts nach dem Prinzip der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung ein Aufreinigungsschema entwickelt werden. Aufgefundene Wirkstoffe sollten ansatzweise charakterisiert werden.

Um die Möglichkeit zu erhöhen, bisher noch unbekannte Wirkstoffe aufzuspüren, sollte das initiale Extraktionsschema nicht nur auf eine bestimmte chemische Stoffgruppe abzielen, sondern mittels Einsatz verschiedener Lösungsmittel die Isolierung möglichst vieler verschiedener Substanzen aus der Alge ermöglichen. Als die Extraktion und Fraktionierung begleitende Methoden wurden der XTT-Viabilitätstest für das Aktivitäts-Monitoring und die ¹H-NMR-Spektroskopie für das Inhaltsstoff-Monitoring ausgewählt. Der Vergleich der aus dem Monitoring erhaltenen Ergebnisse für alle Rohextrakte und Stadien der Fraktionierung sollte in einem iterativen Prozess zu systematischen Erkenntnissen bezüglich des Wirkstoffpotentials der Alge führen.

Die vorliegende Arbeit war Teil des Verbundprojekts „Algae against Cancer (AAC)“, das von 2010 bis 2013 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert worden ist. In dem Projekt ging es um die Untersuchung der Ostseealgen *F. vesiculosus* und *Saccharina latissima* hinsichtlich möglicher vorhandener Wirkstoffe gegen Krebs sowie um deren Aufklärung.

2 Material und Methoden

2.1 *Fucus vesiculosus* L. (Blasentang)

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden ausschließlich mit der in der Kieler Förde gesammelten Braunalge *F. vesiculosus* durchgeführt. Die Algenart ist im Kapitel 1.2.5 ausführlich beschrieben. Die detaillierte Beschreibung des Sammelstandorts ist dem Kapitel 2.8 zu entnehmen.

2.2 Zelllinien

Für die Zellexperimente dieser Arbeit wurden zwei humane, adhärente Zelllinien des duktales Pankreasadenokarzinoms verwendet. Die Zelllinie PancTU1 (= PaTu 8902) wurde freundlicherweise von Dr. M. von Bülow (Mainz) zur Verfügung gestellt. Sie ist ursprünglich aus einem Primärtumor isoliert worden und weist ein hohes metastatisches Potential auf [Elsässer et al. 1993]. Die Zelllinie Panc89 (= T3M4) wurde freundlicherweise von Dr. T. Okabe (Tokyo) überlassen. Sie stammt aus einer Lymphknotenmetastase [Okabe et al. 1983].

2.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 2.1: Eingesetzte Chemikalien und Lösungsmittel (exklusive Chromatographiepuffer).

Chemikalie/Lösungsmittel	Typ	Marke/Hersteller
Accutase	in DPBS mit 0,5 mM EDTA und Phenolrot, Kat.-Nr. L11-007	PAA Laboratories GmbH
Aceton	≥ 99,5 % zur Synthese	Roth®
Acetonitril	HPLC Gradient Grade	J.T. Baker®
Ameisensäure	98 % LC-MS/ROTIPURAN®, ≥ 98 %, p.a.	Fluka/Roth®
Ammoniumformiat	≥ 95 %, reinst	Roth®
Aqua ad iniectabilia	Wasser für Injektionszwecke, steril, pyrogenfrei	B. Braun Melsungen AG
Aqua bidest.	Milli-Q®	Millipore (Merck)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ROTIPURAN®, ≥ 99,8 %, p.a.	Roth®
DMSO D6 (Dimethylsulfoxid deuteriert)	99,8 Atom % D (Deuterierungsgrad)	Roth®
DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	1x, ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂	gibco®, Life Technologies™
Endotoxintest (Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test)	PYROCHROME® LAL-Test	Associates of Cape Cod Incorporated
Essigsäure	ROTIPURAN® 100 %, p.a.	Roth®
Ethanol	96 %, Ph. Eur., reinst	Roth®
FCS (Fötale Kälberserum)	0,2 µm sterilfiltriert	PAN Biotech™
Folin & Ciocalteu's-Phenol-Reagenz	2 N, Katalog-Nr. F9252	Sigma-Aldrich®
Fuoidan (1)	aus <i>F. vesiculosus</i> , crude, Katalog-Nr. F5631	Sigma-Aldrich®
Fuoidan (2)	„Kiel Fuoidan“, aus <i>Fucus evanescence</i>	Bernhard et al. 2012, unveröffentlichte Daten
Gemcitabin	Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung	Gemzar®, Lilly Deutschland GmbH
GlutaMAX™-I Supplement	100x	gibco®, Life Technologies™
Methanol	HPLC Gradient Grade/ ROTISOLV®, ≥ 99,95 %, LC-MS-Grade	J.T. Baker®/ Roth®
Natriumcarbonat	Anhydrous	Riedel-de Haën®
Natrium-Pyruvat	100 mM	gibco®, Life Technologies™
Penicillin/Streptomycin	10000 U Pen/ml, 10 mg Strep/ml, sterilfiltriert	PAN Biotech™
Phloroglucinol	≥ 99,0 % HPLC, Katalog-Nr. 79330	Sigma-Aldrich®
RPMI 1640 Fertigmedium	1x, + L-Glutamin, + 25 mM HEPES	gibco®, Life Technologies™
Standardendotoxin (Control Standard Endotoxin, CSE)	aufgereinigter Extrakt von <i>E. coli</i> O113:H10	Associates of Cape Cod Incorporated
Trypsin-EDTA-Lösung	10x; 0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA in PBS	gibco®, Life Technologies™
VE-Wasser	über Ionenaustauscher SG-700 aufbereitetes Leitungswasser	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) - Reagenz	Cell Proliferation Kit II	Roche Diagnostics

2.4 Chromatographiematerialien und -puffer

Tabelle 2.2: Eingesetzte Chromatographiematerialien, Bindungs- und Elutionspuffer.

Trennprinzip	Sorbens	Hersteller und Spezifizierung	Eingesetzte Sorbensmenge [g] bzw. Kartusche	Bindungs-puffer	Elutions-puffer
Affinitäts-Chromatographie (AC)	Heparin-Sepharose	GE Healthcare HiTrap™ Heparin HP prepacked column PG: 34 µm Art.: 17040601	1 ml-PP-Säule	50 mM Tris, pH 7,0	20 mM PO ₄ , 2 M NaCl, pH 7,0
	Blue-Sepharose	BIO-RAD Affi-Gel® Blue Gel mit kovalent gebundenem Cibacron Blue F3GA-Farbstoff PG: 150-300 µm Art.: 1537301	3,39	10 mM PO ₄ , pH 7,0	10 mM PO ₄ , 2 M NaCl, pH 5,0
	Ni-Talon-Chelat-Sepharose	BD Biosciences Clontech BD TALON™ Metal Affinity Resin PG: 45-165 µm Art.: 635501	0,98	20 mM PO ₄ , 50 mM Imidazol, pH 7,0	20 mM PO ₄ , 2 M Imidazol, pH 7,0
Ionenaustausch-Chromatographie (IEX)	Kationentauscher (SCX) Macro-Prep High S	BIO-RAD Macro-Prep® High S Support PW: 1000 Å PG: 50 µm Art.: 1580030	0,76	5 mM PO ₄ , pH 4,0	30 mM PO ₄ , 1 M NaCl, pH 3,0
	Anionentauscher (QCX) stark Q-Sepharose	GE Healthcare Life Sciences Q Sepharose Fast Flow PG: 45-165 µm Art.: 17-0510-01	5,52	5 mM PO ₄ , pH 8,5	15 mM PO ₄ , 1,5 M NaCl, pH 9,5
	Anionentauscher (QCX) schwach DEAE-Sepharose	SIGMA-ALDRICH DEAE-Sepharose® Fast Flow PG: 45-165 µm Art.: DFF100 SIGMA	4,2	5 mM PO ₄ , pH 8,5	30 mM PO ₄ , 1,5 M NaCl, pH 9,5
Normalphase-Chromatographie (NP)	SiO ₂	Merck PharmPrep® 60 CC Silikagel PG: 63-200 µm Art.: 1093730100	1,31	5 mM PO ₄ , pH 4,0	1. EtOAc 2. MeOH
	Al ₂ O ₃ neutral	Merck Aluminiumoxid 90 aktiv neutral Aktivitätsstufe I PG: 63-200 µm Art.: 101077	1,13	H ₂ O bidest.	
	Al ₂ O ₃ basisch	Merck Aluminiumoxid 60 aktiv basisch	1,3	H ₂ O bidest.	

		Aktivitätsstufe I PG: 63-200 µm Art.: 101067			
Umkehrphase- Chromato- graphie (RP)	C4-RP MultoHigh® Bio	CS-Chromatographie Service MultoHigh®-Bio-300- C4-5µ Refill-Material	0,15	H ₂ O bidest.	1. MeOH 2. ACN
	C8-RP Chroma	MN CHROMABOND® C8 PW: 60 Å, PG: 45 µm Art.: 730021	1 ml-PP-Säule (100 mg)	H ₂ O bidest.	
	C8-RP Polygo	MN POLYGOPREP® 60-50 C8 PG: 40-63 µm Art.: 711490.100	0,25	H ₂ O bidest.	
	C12-RP Polygo	MN POLYGOPREP® 300-50 C12 PG: 40-63 µm Testmaterial	0,2	H ₂ O bidest.	
	C18-RP Polygo	MN POLYGOPREP® 300-50 C18 PG: 40-63 µm Art.: 711730.100	0,2	H ₂ O bidest.	
	Phenyl-RP Chroma	MN CHROMABOND® C ₆ H ₅ PW: 60 Å, PG: 45 µm Art.: 730083	1 ml-PP-Säule (100 mg)	H ₂ O bidest.	
Umkehrphase- ähnliche Chromato- graphie (RP- ähnlich)	XAD1180	Rohm & Haas (Dow) Amberlite® XAD1180 PW: 300 Å PG: 350-600 µm	1,6	H ₂ O bidest.	ACN
	XAD7HP	Rohm & Haas (Dow) Amberlite® XAD7HP PW: 360 Å PG: 560-710 µm	1,3	H ₂ O bidest.	
Vorversuch	XAD16	Rohm & Haas (Dow) Amberlite® XAD16 PW: 100 Å PG: 560-710 µm	4,78	H ₂ O bidest.	1. MeOH 2. ACN
Weitere Aufarbeitung (Bindungsstudie)	C18-RP Sep-Pak	Waters Sep-Pak® C18 1 cc Vac Cartidge PW: 125 Å PG: 55-105 µm Art.: WAT023590	2 ml-Kartusche (100 mg)	H ₂ O bidest.	ACN

2.5 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Tabelle 2.3: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.

Verbrauchsmaterialien/Glaswaren	Typ	Hersteller
Bechergläser	DURAN®, 600, 1000, 2000 ml	Roth®
Büchnertrichter	Glas	Jenaer Glas
Combitips	Combitips advanced®, steril, 2,5, 5 ml	Eppendorf
Einmalküvetten	Halb-Mikro-Küvette, Polystyrol	Sarstedt
Einmalspritzen	IVAC, 50 ml	CareFusion
Einmalspritzen	5, 10 ml	Becton Dickinson
Eppendorf-Gefäße	Safe-Lock Tubes, 1,5, 2 ml	Eppendorf
Erlenmeyerkolben	DURAN®, 250 ml	Roth®
Gewindeflaschen	Rotilabo®, Borosilikatglas, 100, 250, 500, 1000 ml	Roth®
Glasröhrchen	15 ml	WALTER CMP
Glastrichter	Rotilabo®, Ø 50 mm	Roth®
Glaszylinder	Ø 3 cm, bei CRM selbstgefertigt	-
Messzylinder	aus DURAN®, 0,1, 0,5, 1 l	Roth®
Mikrotiterplatten	96 Well, flacher Boden, mit Deckel, steril, Cell*	Sarstedt
Pasteurpipetten	lange Form, 230 mm	Assistent
Petrischalen	Glas, 100 x 20 mm	unbekannt
Pipettenspitzen	0,1-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl	Sarstedt
Rollrandflaschen	Braunglas, 1,5 ml	VWR
Rührspatel	Polystyrol, 11 cm	WALTER CMP
Rundfilter	Glasfaser, MN 85/70	Macherey-Nagel
Rundkolben	DURAN®, 500, 1000 ml	Roth®
Saugflasche	DURAN®, 500 ml	Schott
serologische Pipetten	steril, 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S, steril, 0,2 µm	Sarstedt
Zellkulturflaschen	T-75, 75 cm ² , roter Deckel, belüftet, für adherente Zellkulturen, mit positiv geladener Oberfläche	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	steril, 15, 50 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Rotilabo®, steril, 50 ml	Roth®
Zellzählkammern	SD100	Nexcelom Bioscience

2.6 Geräte

Tabelle 2.4: Eingesetzte Geräte.

Geräte	Typ	Marke/ Hersteller
Analysenwaage	ABJ 80-4M	KERN & SOHN GmbH
Brutschrank	AutoFlow NU-4850 Humidity Control Water Jacket CO ₂ Incubator	NUAIRE™
Dispergiergerät	T25 basic	ULTRA-TURRAX®, IKA®
FTIR-Spektrometer	FT/IR-4100typeA	Jasco
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 2-4 LSC ALPHA	Christ
Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf
HPLC-Anlage (NP-Chromatographie)	VISION™ Workstation	Applied Biosystems™
HPLC-Anlage (RP-Chromatographie)	ÄKTA Protein Purification System	GE Healthcare
HPLC-Säule (präparativ)	VarioPrep, 250 mm*21 mm, Edelstahl, 35 ml Totvolumen, gefüllt mit 1. Pharmprep60CC SiO ₂ und 2. Amberlite® XAD7HP	Macherey-Nagel
ICP-OES-Spektrometer	Vista-Pro, mit Echelle-Polychromator, axialem induktiv gekoppelten Plasma als Anregungsquelle und VistaChip CCD-Simultandetektor	Varian
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA®
manueller Mehrfachdispenser	Multipette® plus	Eppendorf
Mikroplatten-Reader	Sunrise	TECAN
Mikroskop	CK2, invers, mit Phasenkontrast	Olympus
Mikrowaage	MC210	Sartorius
NMR-Spektrometer	600 MHz Avance II+	Bruker
Pipettierhilfe (elektrisch)	verschiedene Modelle	Eppendorf
Präzisionswaage	PLJ 2100-2M	KERN & SOHN GmbH
Rotations-Vakuumkonzentrator (Zentrifugal-Evaporator)	Univapo ECH	UniEquip
Rotationsverdampfer	RE-121, mit Wasserbad 461	Rotavapor®, Büchi
Rundschüttler	Unimax 1010	Heidolph
Schere	handelsüblich	-
Trockenschrank	UM 200	Memmert
Ultraschall-Gerät	Sonorex Digitec	Bandelin
UV/Vis-Spektrometer	U-2001	Hitachi
Zellzählgerät	Auto T4	Cellometer®, Nexcelom Bioscience
Zentrifuge 1	3K18	Sigma
Zentrifuge 2	5810 R	Eppendorf
Zentrifuge 3	Rotina 48	Hettich

2.7 Software

Tabelle 2.5: Verwendete Software.

Software	Anwendung
GraphPad Prism (Version 4.0 und 8.0, GraphPad Software, San Diego, Californien, USA, www.graphpad.com)	Auswertung der XTT-Ergebnisse, statistische Auswertungen
Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH))	Skalierung der Mikroskopieaufnahmen
TopSpin 2.1. (Bruker)	NMR-Daten-Analyse (durch den Projektpartner: numares AG)

2.8 Algensammlung

F. vesiculosus wurde aus der Uferzone der Kieler Außenförde bei Bülk, nördlich vom Ort Strande, 54° 26' 53.3" N, 10° 11' 18.1" E, westliche Ostsee, aus einer Tiefe von 30 - 50 cm gesammelt (Abb. 2.1 und 2.2). Es wurden insgesamt zwei Algensammlungen durchgeführt, beide im späten Frühling: die erste am 3. Juni 2010, die zweite am 30. Mai 2012. Zu beiden Zeitpunkten wurde eine ausreichend große Menge der Braunalge gesammelt, um aus jeweils einer Algencharge mehrere vergleichbare Extrakte anfertigen zu können. Zu beiden Sammelzeitpunkten betrug die Wassertemperatur im Uferbereich 13 - 14 °C.

Es wurden nur junge, frische und tief grün gefärbte Algentriebe gesammelt. Um die Stichprobe möglichst groß zu halten, wurden von vielen verschiedenen Algenpflanzen jeweils nur wenige Triebe gesammelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Algenpflanzen bei der Sammlung nicht abgetötet wurden. Aus diesem Grund wurden die Triebe in einer Höhe von etwa ein Drittel über dem Haftorgan abgeknipst. So erhielten die Algenbüschel die Möglichkeit, wieder auszutreiben.

Das gesammelte Algenmaterial wurde anhand der Thallusmorphologie und auffälliger Charakteristika mit Hilfe des Bestimmungsschlüssels für Makrophyten der Ostseeküsten Schleswig-Holsteins und Mecklenburg-Vorpommerns von Dr. Svenja Heesch [in: Lohmann und Schilling 2001] als *Fucus vesiculosus* L. identifiziert. Die Abbildungen 2.3 - 2.6 zeigen repräsentative Exemplare der gesammelten Algen. Ein Belegexemplar (KIEL-Fuca160501) wurde im Herbarium des Botanischen Gartens der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU Kiel) hinterlegt.

Das Algenmaterial wurde noch am gleichen Tag innerhalb von 5 h verarbeitet und in dieser Zeit in Eimern mit gekühltem Meerwasser aufbewahrt. Um den in geringer Zahl vorhandenen Aufwuchs, wie filamentöse Algen, kleine Muscheln und Köcherwürmer, zu entfernen, wurden die Algentriebe zweimal in filtriertem Meerwasser gespült und mit Küchenpapier vorsichtig abgerieben. Kleine faulige und vertrocknete, braune Stellen wurden abgeschnitten und verworfen.

Die mit Schleim gefüllten, endständigen Rezeptakelblasen (R) wurden vom restlichen Thallus (T) abgeschnitten (Abb. 2.7). Rezeptakelblasen und restlicher Thallus wurden getrennt voneinander auf der Präzisionswaage (PLJ 2100-2M, KERN & SOHN GmbH) abgewogen, portionsweise in handelsübliche Gefrierbeutel gefüllt und für spätere Extraktionen bei -60 °C eingefroren. Für beide Algenchargen wurden die Trockenmassen der Rezeptakelblasen und des restlichen Thallus bestimmt, indem jeweils 3 x 10 g des gereinigten Frischalgenmaterials bei 40 °C im Trockenschrank (UM 200, Memmert) getrocknet, bei Gewichtskonstanz auf der Analysenwaage (ABJ 80-4M, KERN & SOHN GmbH) gewogen und deren Mittelwerte berechnet wurden.

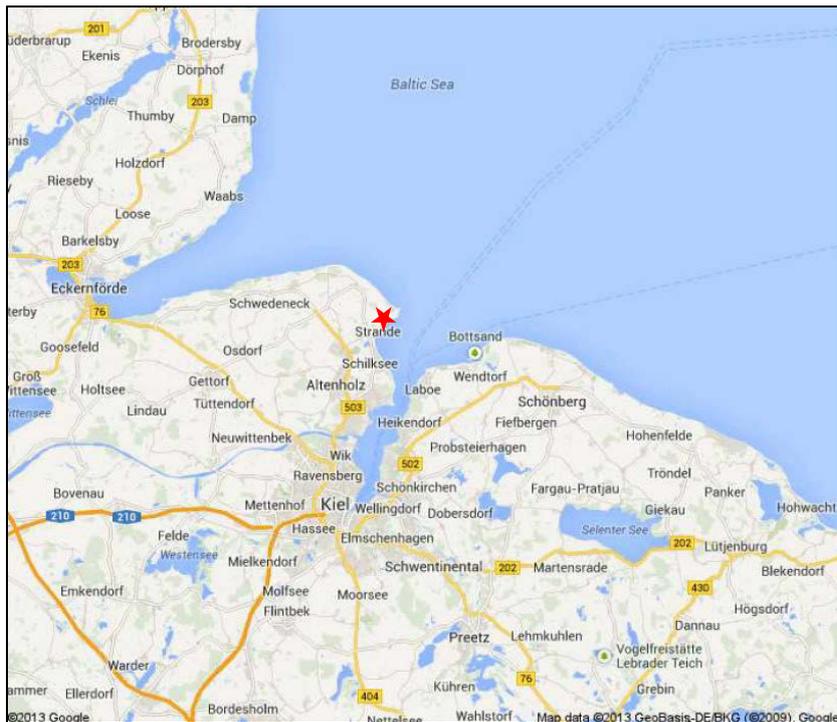


Abbildung 2.1: Ausschnitt der westlichen Ostsee [Google Maps ©2013]. Die Braunalge *F. vesiculosus* wurde am westlichen Ufer der Kieler Außenförde bei Bülk, nördlich vom Ort Strande gesammelt (siehe Markierung).

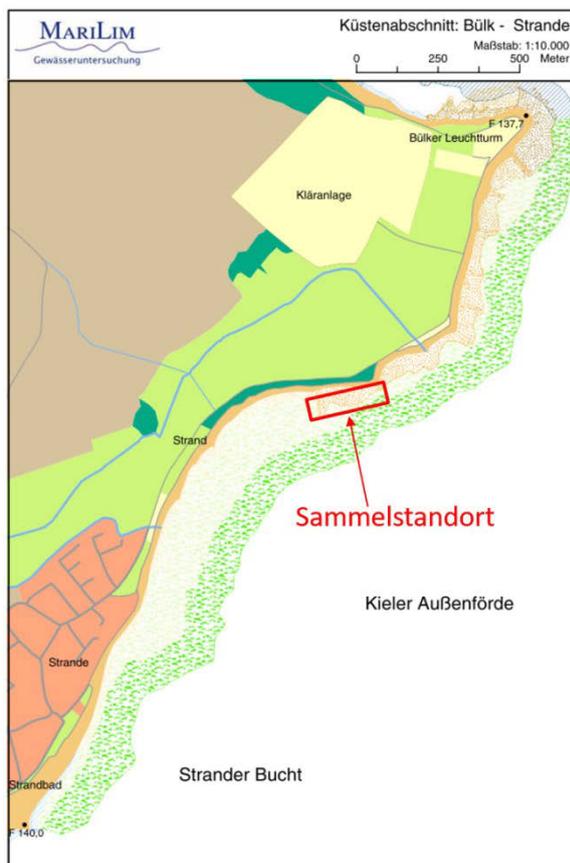


Abbildung 2.2: Detailansicht zum Küstenabschnitt Bülk-Strande in der Kieler Außenförde, aus dem *F. vesiculosus* gesammelt worden ist. Der genaue Sammelstandort nördlich von Strande ist in der Karte zusätzlich gekennzeichnet. Die Verwendung der damit leicht modifizierten Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des LLUR – Schleswig-Holsteins Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (ehemals LANU), Dr. Rolf Karez. Sie wurde aus Fürhaupter et al. [2008], S. 101 entnommen.



Abbildung 2.3: Repräsentatives Büschel von *F. vesiculosus* aus dem Uferbereich von Bülk (Strande, Kieler Förde, westliche Ostsee).



Abbildung 2.4: Ausgebreitetes *F. vesiculosus*-Exemplar aus dem Uferbereich von Bülk. Erkennbar sind die charakteristischen Merkmale des gabelig verzweigten Thallus mit glattem Rand sowie die fertilen Abschnitte an den Thallusenden (Rezeptakeln) [nach S. Heesch in: Lohmann und Schilling 2001].



Abbildung 2.5: Ausschnitt eines gesammelten *F. vesiculosus*-Exemplars. Deutlich sind die charakteristischen paarigen und voneinander getrennten Gasblasen (Vesikel) und die Mittelrippe im Thallus zu erkennen [nach S. Heesch in: Lohmann und Schilling 2001].



Abbildung 2.6: Ausschnitt eines gesammelten *F. vesiculosus*-Exemplars. Deutlich erkennbar sind die charakteristischen Rezeptakeln ohne Flügelsaum und die bis in die Spitzen des Phylloids hineinreichende Mittelrippe [nach S. Heesch in: Lohmann und Schilling 2001].



Abbildung 2.7: Gesammelte junge Thallustriebe von *F. vesiculosus*. Das Algenmaterial wurde vor dem Einfrieren bei -20 °C in filtriertem Meerwasser gespült und mit Küchenpapier vorsichtig abgerieben, um den Aufwuchs zu entfernen. Die endständigen, schleimgefüllten Rezeptakelblasen wurden an der roten Schnittlinie vom restlichen Thallus abgeschnitten, und beide Algenteile wurden getrennt voneinander eingefroren.

2.9 Extraktion

2.9.1 Initiale Rohextrakte aus gefrorenem Algenmaterial (FvR_W, FvR_E, FvR_A, FvT_W, FvT_E, FvT_A)

Für die Untersuchungen wurden zunächst komplexe Rohextrakte angefertigt (Abb. 2.8). Zu ihrer Herstellung wurde das Mazerations-Verfahren, eine Fest-Flüssig-Extraktion ohne Wärmezufuhr [Seidel 2006], angewendet. Pro Extraktionsansatz wurden 30 g gefrorenes Algenmaterial (R oder T) für 2 h bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, mit einer Schere in 1 - 2 cm große Stücke geschnitten und im Verhältnis von 1:2 (w/v (Gewicht/Volumen)) mit einem der drei Extraktionsmittel VE-Wasser, Ethanol (EtOH) (96 %, Ph. Eur., reinst, Roth) oder Aceton ($\geq 99,5\%$, zur Synthese, Roth) versetzt. Für eine optimale Zerkleinerung wurde jeder Extraktionsansatz in Portionen von 7,5 g Algenmaterial und 15 ml Extraktionsmittel aufgeteilt und in einem schmalen Glaszylinder ($\varnothing 3\text{ cm}$) bei RT und bei 11000 rpm für 35 s mit Hilfe des Dispergiergerätes (T25 basic, ULTRA-TURRAX®, IKA®) fein püriert. Nach dem Pürieren wurden die Portionen je Extraktionsansatz in einem Becherglas vereinigt, mit Silberpapier abgedeckt und zur Vervollständigung der Extraktion für 19 h bei 4 °C und 300 rpm mit Hilfe eines Magnetrührers (Combimag RCT, IKA®) gerührt. Danach wurde der Extraktionsansatz in mehrere Zentrifugenröhrchen (Roth) überführt, und die festen Bestandteile wurden durch Zentrifugation in Zentrifuge 1 (3K18, Sigma) für 30 min bei $17000 \times g$ und 10 °C abgetrennt. Der Überstand

(= Extrakt) wurde abdekantiert, vereinigt und über einen Rundfilter aus Glasfaser (MN85/70, Macherey-Nagel), eingelegt in einen Glastrichter, filtriert - bei wässriger Extraktion mit zusätzlich an eine Saugflasche mit Büchnertrichter angelegtem Vakuum - und bis zur Weiterverarbeitung in Gewindeflaschen bei 4 °C aufbewahrt. Das feste Algenmaterial wurde verworfen.

Vom filtrierten Extrakt wurde ein 1 ml-Aliquot für die ¹H-NMR-Qualitätsanalyse abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Aliquot wurde im Rotations-Vakuumkonzentrator (Univapo ECH, UniEquip) bei 50 °C komplett eingetrocknet und direkt vor der NMR-Messung durch die numares AG, Regensburg, in DMSO D6 (Roth) rückgelöst.

Da die Extraktionsmittel EtOH 96 % und Aceton ≥ 99,5 % im Zelltest toxisch wirken, wurden diese, nach ihrem Überführen in Rundkolben mit bekanntem Gewicht (Roth), mittels Vakuumrotation am Rotationsverdampfer (RE-121, Rotavapor®, Büchi) bei 40 °C Wassertemperatur abdestilliert. Der Wasseranteil aller Extrakte wurde mittels Gefriertrocknung in der Anlage ALPHA 2-4 LSC (Christ) komplett entfernt. Nach der Trockenmassebestimmung wurden die Extrakte im kleinstmöglichen Volumen DMSO ≥ 99,8 % (p.a., ROTIPURAN®, Roth) sorgfältig gelöst, und zwar durch portionsweise Zugabe von DMSO, Resuspendieren per Pasteurpipette und zusätzlichem Schütteln sowie durch Stehenlassen (abgedeckt) über einen Zeitraum von mehreren Stunden. Anschließend wurden die Extrakte in verschiedene Volumina (0,1 - 1 ml) aliquotiert und bei -60 °C für die späteren Analysen eingefroren. Die Konzentration der Rohextrakte wurde mit Hilfe der zuvor bestimmten Trockenmasse und der zum Rücklösen eingesetzten Menge an DMSO kalkuliert.

In Vorversuchen wurden die Rohextrakte vor dem Aliquotieren und Einfrieren unter der Sterilbank mittels 0,45 µm-PTFE-Spritzenvorsatzfilter (Roth) sterilfiltriert, was aufgrund der Viskosität der Extrakte äußerst schwierig durchzuführen war. Diese Art der Sterilfiltration führte häufig zum Platzen der Spritzenvorsatzfilter und zu großen Extraktverlusten. Für die vorliegende Arbeit wurde das Verfahren daher dahingehend angepasst, dass die Extrakte erst kurz vor dem Einsatz im Zellassay, und zwar nach dem Verdünnen im Kulturmedium, sterilfiltriert wurden (siehe Kapitel 2.11.2).

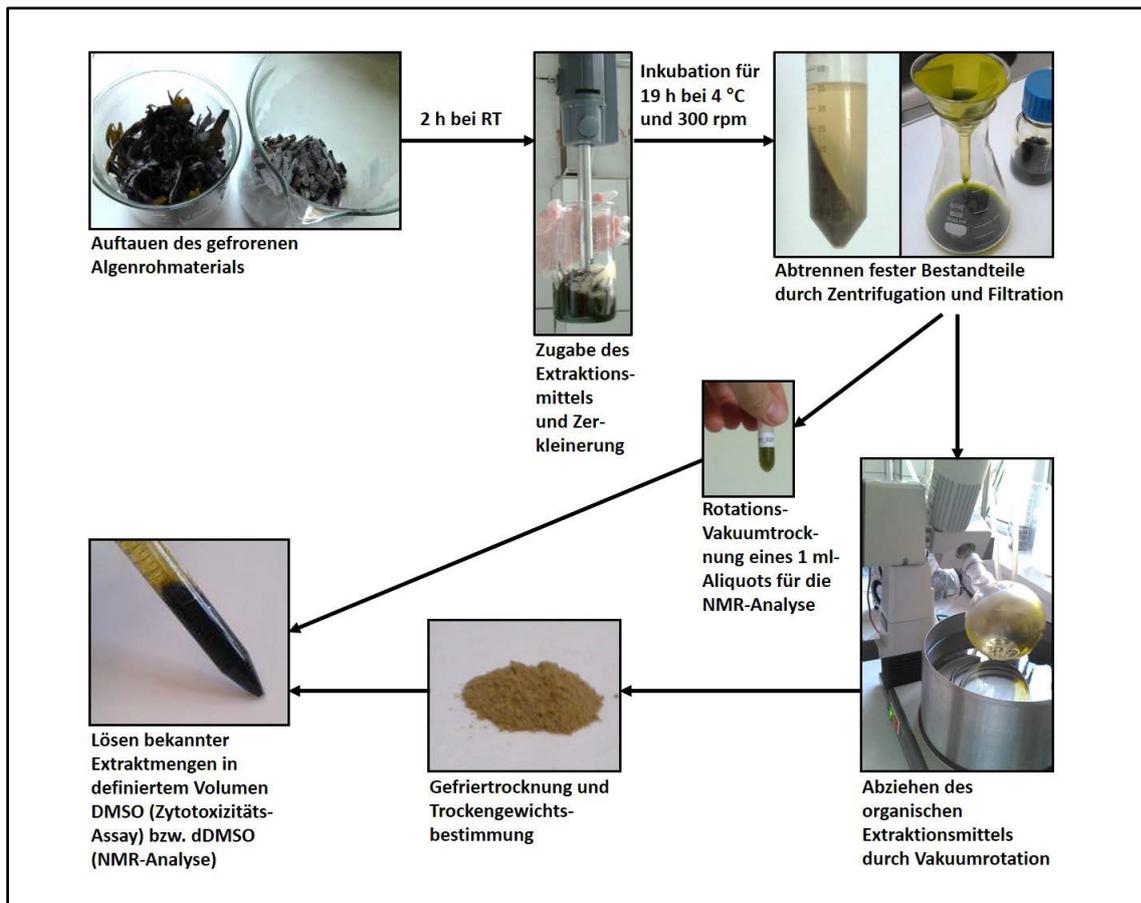


Abbildung 2.8: Arbeitsschritte zur Herstellung der initialen Rohextrakte.

2.9.2 Variante: Acetonischer Rohextrakt aus getrocknetem Thallus-Algenmaterial (FvTt_AW)

Um herauszufinden, ob der Zustand des Rohmaterials, gefroren oder getrocknet, einen Einfluss auf die Aktivität des Rohextraktes hat, wurde ein weiterer acetonischer Extrakt angefertigt, und zwar aus getrocknetem Algenmaterial (restlicher Thallus). Die Extraktion wurde wie in Kapitel 2.9.1. beschrieben durchgeführt, jedoch wurde das Extraktionsmittel Aceton erst nach folgenden vorbereitenden Schritten hinzugefügt: 30 g des gefrorenen Thallus-Algenmaterials wurden bei RT aufgetaut und für mehrere Tage ausgebreitet auf Petrischalen aus Glas bei RT und unter Ausschluss von Sonnenlicht vollständig trocknen gelassen. Nach Bestimmung des Trockengewichts der Algenportion mit Hilfe der Analysenwaage wurden neben dem Extraktionsmittel Aceton (60 ml) zusätzlich 22,1 ml VE-Wasser zum Extraktionsansatz hinzugefügt. Diese Wassermenge entspricht dem rechnerisch bestimmten Wasseranteil, der ursprünglich im Thallus-Algenmaterial vorhanden war. Das Hinzufügen des Wasseranteils zum Extraktionsansatz diente dazu, die Extraktionsprozedur vergleichbar zur ursprünglichen Methode (Kapitel 2.9.1) zu gestalten.

2.9.3 Rohextrakte (FvT_A) im größeren Maßstab

Um genügend Extrakt für die Fraktionierungen und analytischen Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde der Extraktionsmaßstab für Nachproduktionen des acetonischen Thallus-Extraktes (FvT_A) auf 60 bzw. 160 g gefrorene Algen und 120 bzw. 320 ml Aceton vergrößert. Das ursprüngliche Extraktionsprotokoll (Kapitel 2.9.1) wurde ohne weitere Veränderungen angewendet.

2.10 Fraktionierung und Aufreinigung

Für die Wirkstoffe des aktivsten Rohextraktes FvT_A sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Aufreinigungsprotokoll etabliert werden. Aus diesem Grunde wurde FvT_A mit verschiedenen, hauptsächlich chromatographischen Methoden fraktioniert. Alle Chromatographie-Experimente dieser Arbeit wurden freundlicherweise von Herrn Karsten Hofmann-Peiker von der Planton GmbH in Kiel durchgeführt und deren Ergebnisse für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Gemäß des Prinzips der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung wurden alle erhaltenen Fraktionen im Zellassay auf ihre Viabilitäts-inhibitorische Aktivität gegenüber den ausgewählten Krebszelllinien getestet, und die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden zur Entwicklung der Aufreinigungsstrategie genutzt.

2.10.1 Fraktionierung durch Festphasenextraktion an Amberlite® XAD16

In einer groben Vorstudie wurde das Bindungs- und Elutionsverhalten der Wirkstoffe in FvT_A mittels des hydrophoben Polymers Amberlite® XAD16 (Rohm & Haas) im Batch-Verfahren untersucht (Abb. 2.9). Die porösen XAD16-Kügelchen bestehen aus stark quervernetztem Polystyrol, an das aus einer Umgebung polarer Lösungsmittel schwachpolare und unpolare Stoffe mit kleineren bis mittleren Molekulargewichten adsorbieren [Rohm & Haas 2003: XAD16 - Produktbeschreibung]. Zur Trennung wurden 1,49 ml des mit $c = 134 \text{ mg/ml}$ in DMSO gelösten FvT_A (Trockengewicht (TG) = 200 mg) eingesetzt und in ein Zentrifugenröhrchen (Roth) überführt. Um neben einem ausreichenden Flüssigkeitsvolumen eine Umgebung zu schaffen, in der die Moleküle des Rohextraktes an das Adsorbens binden können (DMSO besitzt in dem vorliegenden Umkehrphase (RP)-ähnlichen System selbst eine elutrope Wirkung), wurde der Extrakt mit Aqua bidest. stark verdünnt (1:33). Dies verursachte ein Ausfällen von Substanzen. Da vermutet wurde, dass sich das ausgefällte Material z.B. durch Verkleben der XAD-Oberfläche und Aggregieren der XAD-Kügelchen negativ auf die Chromatographie auswirken würde, wurde das Präzipitat nach einer Verweildauer von 15 min bei RT (zur Vervollständigung der Fällung) durch 15-minütige Zentrifugation in der Zentrifuge 2 (5810 R, Eppendorf) bei $13600 \times g$ vollständig abzentrifugiert und nicht zur Chromatographie eingesetzt. Es wurde für die Testung im Zellassay als erste Fraktion (X16_1) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Der Überstand wurde zusammen mit 4,78 g XAD16 in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Das XAD16-Festphasenmaterial wurde zuvor durch Waschen in Acetonitril (ACN, HPLC gradient grade, J.T. Baker)

+ 0,1 % Essigsäure (AcOH, ROTIPURAN® 100 %, p.a., Roth), anschließend Überführen in Aqua bidest. und Trockenblasen vorbereitet.

Nach 2 h-iger Inkubation der Mischung im Erlenmeyerkolben auf dem Rundschtüttler (Unimax 1010, Heidolph) bei 300 rpm und RT wurde die Flüssigkeit als zweite Fraktion (X16_2) vollständig abgenommen und bei 4 °C in einer Gewindeflasche aufbewahrt. Das Festphasenmaterial wurde zunächst mit 20 ml Aqua bidest. gewaschen und danach zweimal mit 10 ml Methanol (MeOH, ≥ 99,95 %, LC-MS-Grade, Roth) für je 30 min bei RT auf dem Rundschtüttler bei 300 rpm inkubiert (1. Elution). Die MeOH-Eluate wurden nach der Inkubationszeit vorsichtig abgenommen, zur dritten Fraktion (X16_3) vereinigt und bei 4 °C in einer Gewindeflasche aufbewahrt. Abschließend wurde das Festphasenmaterial zweimal mit 10 ml ACN für je 30 min bei RT auf dem Rundschtüttler bei 300 rpm inkubiert (2. Elution). Die ACN-Eluate wurden nach der Inkubationszeit vorsichtig abgenommen, zur vierten Fraktion (X16_4) vereinigt und bei 4 °C in einer Gewindeflasche aufbewahrt. Alle Fraktionen wurden bei 50 °C im Rotations-Vakuumkonzentrator eingetrocknet, nach Trockengewichtsbestimmung mittels Mikrowaage (MC210, Sartorius) in DMSO D6 sorgfältig rückgelöst und auf eine Konzentration von 40 mg/ml eingestellt. Die Proben wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bis zu den weiteren Analysen bei -60 °C eingefroren.

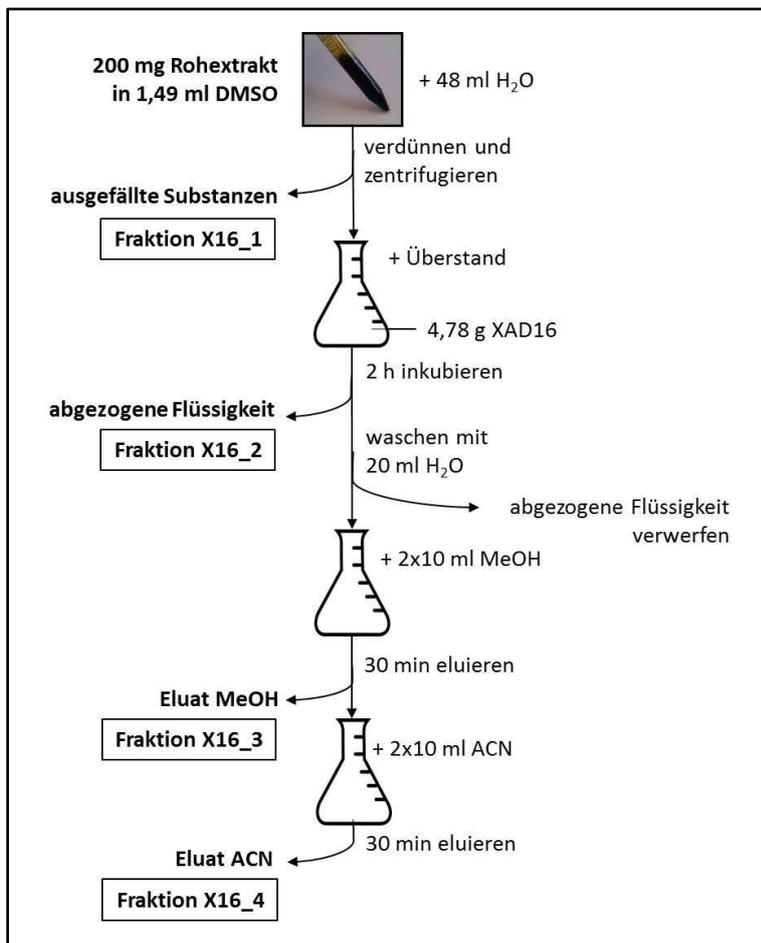


Abbildung 2.9: Arbeitsschritte zur Grobfractionierung an Amberlite® XAD16. Der Erlenmeyerkolben ist ein frei verwendbares Clipart von Pixabay [2017].

2.10.2 Chromatographie-Experimente der Bindungsstudie

Das Trennverhalten der Wirkstoffe in FvT_A wurde außerdem in einer breit angelegten Studie, der sogenannten Bindungsstudie, unter Verwendung vieler verschiedener Chromatographie-Materialien im kleinen Maßstab in Form von Festphasenextraktionen (SPE für *engl.* solid phase extraction) untersucht (Abb. 2.10). In diese Studie floss bereits die Erfahrung aus der XAD16-Vorstudie (Kapitel 3.2.1) mit ein, dass durch das Verdünnen des Rohextrakts in großer Menge H₂O inaktive Substanzen ausgefällt werden können. Mit der Bindungsstudie sollte ein umfassender und systematischer Überblick zum Trennverhalten der Wirkstoffe generiert werden.

Die durchgeführten Experimente lassen sich folgenden Trennprinzipien zuordnen:

- Affinitätschromatographie (AC für *engl.* affinity chromatography)
- Ionenaustausch-Chromatographie (IEX für *engl.* ion exchange chromatography)
- Adsorptionschromatographie:
 - Normalphase-Chromatographie (NP für *engl.* normal-phase chromatography)
 - Umkehrphase-Chromatographie (RP für *engl.* reversed-phase chromatography)
 - Umkehrphase-ähnliche Chromatographie (RP-ähnlich: Dipol-Dipol-SPE)

Der Großteil der Experimente wurde als Batch in Zentrifugenröhrchen (50 ml, Sarstedt) durchgeführt, zum Teil lagen die Sorbentien auch in Kartuschen vor. In allen Experimenten wurde isokratisch, d.h. mit konstanter Lösungsmittelzusammensetzung, eluiert. Detaillierte Angaben zu den eingesetzten Sorbentien, Pufferbedingungen und Eluenten sind in der Tabelle 2.2 (Kapitel 2.4) angegeben.

Für die Trennungen wurden insgesamt 8,5 ml des mit $c = 100 \text{ mg/ml}$ in DMSO gelösten FvT_A eingesetzt (TG = 850 mg). Um die elutrope Wirkung des DMSO zu inhibieren und eine Bindung an die verschiedenen Sorbentien zu ermöglichen, wurde die gesamte Menge an FvT_A in einer Gewindeflasche zunächst 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Hierbei trat die erwartete Fällungsreaktion auf. Nach einer Verweildauer von 15 min bei RT zur Vervollständigung der Fällung wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in Zentrifugenröhrchen überführt und zur Feinabtrennung des Präzipitats 15 min in Zentrifuge 2 bei $13600 \times g$ zentrifugiert. Das Präzipitat wurde verworfen. Es umfasste ca. 10 % des eingesetzten Rohextrakt-TG. Der Überstand wurde auf die verschiedenen, mit dem jeweiligen Bindungspuffer (mit etwa 15 ml) vorbereiteten Sorbentien gegeben. Je Trennexperiment wurden 5 ml (TG $\approx 45 \text{ mg}$) des vorbereiteten Extrakts eingesetzt. Die Ansätze im Zentrifugenröhrchen wurden 2 h bei RT auf dem Rundschüttler bei 300 rpm inkubiert.

Die Flüssigphasen der Zentrifugenröhrchen sowie die Kartuschendurchläufe wurden jeweils als Fraktion 1 (Durchlauf-Fractionen) gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt. Nach dem Waschen der Sorbentien mit 3 x 40 ml des jeweiligen Bindungspuffers wurde mit 5 ml der jeweiligen Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden als Fraktion 2 und einige auch als Fraktion 3 (beides Eluates-Fractionen) gesammelt und bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt.

Alle Durchlauf-Fractionen sowie die Eluats-Fractionen der AC- und IEX-Experimente wurden einheitlich auf einer Sep-Pak® C18-Kartusche (Waters) weiter aufgearbeitet. Auf diese Weise sollten die Wirkstoffe noch weiter aufkonzentriert werden, um sie sicherer nachweisen zu können. Diese Vorgehensweise wurde von einem in dieser Arbeit nicht dargestellten Vorversuch abgeleitet, bei dem die Wirkstoffe eines vergleichbaren Extrakts nach einer RP-HPLC (für *engl.* high performance liquid chromatography) an C18-Material und einer Elution mit ACN wieder aufgefunden worden waren. Von der Sep-Pak® C18-Kartusche wurde jeweils mit 5 ml ACN eluiert. Die aufgearbeiteten Fractionen wurden bei 50 °C im Rotations-Vakuumkonzentrator eingetrocknet, auf der Mikrowaage ausgewogen und in 100 µl DMSO D6 bei 30-minütiger Inkubation auf dem Rundschtüttler und 3-minütiger Ultraschall-Behandlung (Sonorex Digitec, Bandelin) gelöst.

Die Eluats-Fractionen der NP-, RP- und RP-ähnlichen Chromatographie-Experimente wurden aufgrund der methodischen Ähnlichkeit nicht mittels C18-Kartusche aufgearbeitet, sondern sofort bei 50 °C im Rotations-Vakuumkonzentrator eingetrocknet und nach Trockengewichtsbestimmung in 100 µl DMSO D6 bei 30-minütiger Inkubation auf dem Rundschtüttler und 3-minütiger Ultraschall-Behandlung gelöst.

Die gelösten Fractionen wurden in Braunglas-Rollrandflaschen überführt und bis zu den weiteren Analysen bei -60 °C eingefroren.

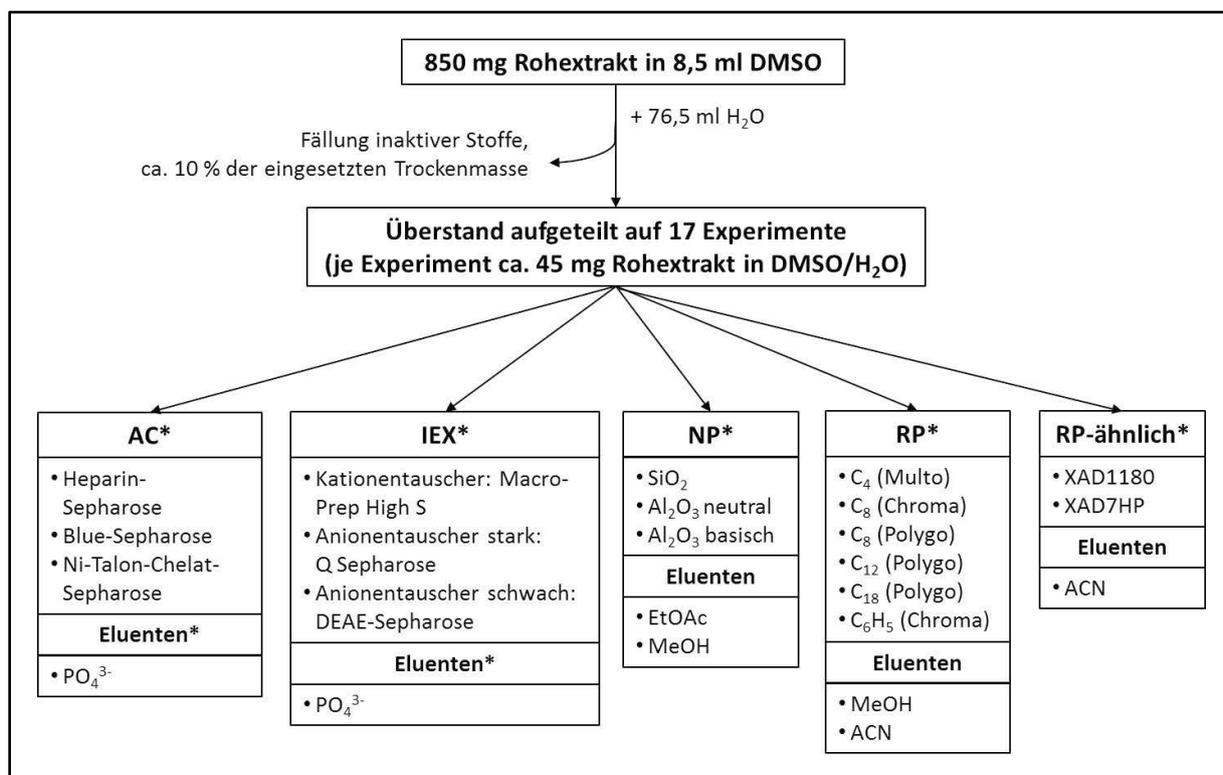


Abbildung 2.10: Übersicht zur Bindungsstudie: Probenvorbereitung sowie eingesetzte Trennverfahren, Chromatographie-Materialien und Eluenten. AC: Affinitätschromatographie, IEX: Ionenaustausch-Chromatographie, NP: Normalphase-Chromatographie, RP: Umkehrphase-Chromatographie, RP-ähnlich: Umkehrphase-ähnliche Chromatographie, Details in Tabelle 2.2. *Alle Durchlauf-Fractionen und die Eluats-Fractionen der AC- und IEX-Experimente wurden zusätzlich auf einer Sep-Pak® C18-Kartusche aufgearbeitet und mit 5 ml ACN von der C18-Kartusche eluiert.

2.10.3 Mehrstufiges Aufreinigungsprotokoll: Fällung, Normalphase-HPLC an Pharmprep60CC SiO₂ und Umkehrphase-HPLC an Amberlite® XAD7HP

Das im Anschluss an die Rohextraktion aus drei hintereinandergeschalteten Schritten bestehende Aufreinigungsschema (Abb. 3.14 in Kapitel 3.2.3) wurde für den Rohextrakt FvT_A anhand der Ergebnisse der Grobfractionierung (Kapitel 3.2.1) und der Bindungsstudie (Kapitel 3.2.2) etabliert. Pro Trennlauf wurden 20 ml des mit $c = 100 \text{ mg/ml}$ in DMSO gelösten Rohextraktes eingesetzt (TG = 2 g).

1. Fällung:

20 ml FvT_A wurden in eine Gewindeflasche überführt, mit Aqua bidest. + 0,01 % AcOH auf ein finales Volumen von 200 ml verdünnt und für 12 h bei 4 °C zur Vervollständigung der Fällungsreaktion stehengelassen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, zur Feinabtrennung des Präzipitats auf 2 ml-Eppendorffgefäße aufgeteilt und anschließend bei 16000 x g für 15 min in Zentrifuge 2 zentrifugiert. Die Überstände wurden in einer Gewindeflasche gepoolt und dienten im Gesamten als Auftragsmaterial für die nachfolgende NP-Chromatographie. Das Präzipitat wurde verworfen.

2. NP-Chromatographie an Pharmprep60CC SiO₂:

Durch NP-HPLC an einer mit Pharmprep60CC SiO₂ gefüllten Trennsäule (MN, VarioPrep, 250 mm*21 mm, 35 ml Totvolumen, äquilibriert mit Aqua bidest. + 0,1 % AcOH) unter Einsatz der VISION™ Workstation (Applied Biosystems) wurden bei einer Flussrate von 5 ml/min und 20 °C weitere inaktive Substanzen abgetrennt. Der Durchlauf, der erfahrungsgemäß die aktiven Substanzen enthielt (sowie ein Teil des Spülvolumens), wurde ab 7 min (35 ml) bis 64 min (320 ml) in einer Gewindeflasche gesammelt und diente im Gesamten als Auftragsmaterial für die nachfolgende RP-Chromatographie.

3. RP-ähnliche Chromatographie an Amberlite® XAD7HP und Gradientenelution mittels H₂O/ACN:

Der Durchlauf wurde durch RP-HPLC und Gradientenelution an einer mit Amberlite® XAD7HP gefüllten Trennsäule (MN, VarioPrep, 250 mm*21 mm, äquilibriert mit Aqua bidest. + 0,1 % AcOH) unter Einsatz eines ÄKTA Protein Purification Systems (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 5 ml/min und 20 °C in 67 Fraktionen à 9 ml aufgetrennt. Für die Elution wurden die Laufmittel (A) Aqua bidest. + 0,1 % AcOH und (B) ACN + 0,1 % AcOH und folgender Gradient verwendet:

I: 0 % B bis 50 % B in 60 min,

II: 50 % B bis 100 % B in 30 min,

isokrat für 12 min,

III: 100 % B bis 0 % B in 4 min,

isokrat für 50 min

Ab 6 min bis 126,6 min wurden die Fraktionen alle 108 s über einen Fraktionssammler in Glasröhrchen gesammelt. Die Fraktionen wiesen damit ein einheitliches Volumen von 9 ml auf. Alle 67 Fraktionen wurden im Rotations-Vakuumkonzentrator bei 50 °C komplett eingetrocknet. Nach der Bestimmung der Trockengewichte mittels Mikrowaage wurden die Fraktionen zu jeweils gleichen Volumina in 400 µl DMSO D6 (in späteren Chargen nur noch in 250 µl DMSO D6) unter Anwendung von 30-minütiger Inkubation auf dem Rundschtüttler und 3-minütiger Ultraschall-Behandlung sorgfältig rückgelöst. Die gelösten Fraktionen wurden in Braunglas-Rollrandflaschen überführt und bei -60 °C aufbewahrt.

2.11 Zellkultur und *in vitro*-Experimente

2.11.1 Aufrechterhaltung der Zellkultur

Die PDAC-Zelllinien PancTU1 und Panc89 wurden in RPMI 1640 Fertigmedium (gibco®, Life Technologies, Darmstadt) kultiviert, das mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (PAN Biotech, Aidenbach), 1 % GlutaMAX™-I Supplement und 1 % Natrium-Pyruvat (beide gibco®, Life Technologies, Darmstadt) nach deren Sterilfiltration über 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter angereichert wurde. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit positiv geladener Oberfläche, die mit 15 ml Medium befüllt waren. Die Zellen wurden in 5 % feuchter Umgebung, bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank (AutoFlow NU-4850 Humidity Control Water Jacket CO₂ Incubator, NUAIRE™) gehalten. Bei ca. 90 %-iger Konfluenz wurden sie unter Verwendung serologischer Pipetten und einer elektrischen Pipettierhilfe (Eppendorf) 1:3 bis 1:6 geteilt und in neue Kulturflaschen mit frischem Medium umgesetzt. Für die Passagierung wurden die Zellen mit 10 ml DPBS (gibco®, Life Technologies, Darmstadt) gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (GE Healthcare) und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C von der Kulturflasche abgelöst. Die Trypsin-Zellsuspension wurde in 5 ml Medium aufgenommen und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt. Das Trypsin wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 1420 rpm in Zentrifuge 3 (Rotina 48, Hettich) entfernt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert, geteilt und eine neue Kulturflasche mit frischem Medium gegeben. Auf diese Weise wurden die Kulturen bis zur 13. Passage aufrechterhalten und danach durch die Inkulturnahme neuer Zellklone ersetzt.

2.11.2 Zellviabilitäts-Assay (XTT-Assay)

Um die zytotoxische Aktivität der Algenextrakte und Fraktionen gegenüber den Krebszelllinien zu bestimmen, wurden standardmäßig 72-stündige Behandlungen der Krebszelllinien im 96 Well-Format und einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Auto T4, Cellometer®, Nexcelom Bioscience) wurden jeweils 5000 Zellen pro

Well unter Verwendung eines manuellen Mehrfachdispensers (Multipette® plus, Eppendorf) ausgesät.

Der Assay wurde im Vorfeld mit Gemcitabin (Gemzar®, Lilly) etabliert. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlungszeit von 72 h und die Zellzahl von 5000 Zellen/Well optimale Größen zur Effektkarakterisierung sind.

Zur Aussaat wurden nur gut proliferierende Zellen bei einer Konfluenz von 80 - 95 % in den Passagen 3 bis 13 verwendet. Diese wurden anstatt mit Trypsin-EDTA-Lösung mit 5 ml der laut Produktbeschreibung [PAA Laboratories GmbH 2006] weniger aggressiven Accutase (PAA Laboratories GmbH) aus der Kulturflasche abgelöst, um den Stress auf die Zellen im Vorfeld der Behandlungen auf ein Minimum zu reduzieren. Die Zahl von 5000 Zellen/Well wurde mit Hilfe von Vorversuchen so ausgewählt, dass die Zellen in den Kontroll-Well während der Gesamtzeit des Assays von 96 h nicht die stationäre Phase erreichen.

Die äußere Reihe der 96 Well-Mikrotiterplatte (Sarstedt) wurde nicht für die Tests verwendet, da in Vorversuchen Kondensationseffekte in dieser Reihe zu fehlerhaften Ergebnissen führten. Die äußere Reihe wurde daher nur mit 100 µl Medium und nicht mit Zellen befüllt. Nach der Aussaat erhielten die Zellen während 24 h-iger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank die Gelegenheit, sich an den Plattenboden anzuheften und an die Umgebungsbedingungen anzupassen. Erst danach wurden die Behandlungen gestartet.

Die Rohextrakte und Fraktionen wurden direkt vor dem Einsatz aufgetaut und, wie im Folgenden angegeben, in verschiedenen Stufen verdünnt. Sie wurden entsprechend der im Assay benötigten Gesamtmengen zunächst mit DMSO und danach mit Medium so verdünnt, dass in jeder Verdünnungsstufe eine finale DMSO-Konzentration von 0,7 % vorlag. Die Fraktionen der Bindungsstudie wurden aus technischen Gründen jeweils mit einer finalen DMSO-Konzentration von 1 % im Assay getestet.

In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass DMSO in der Konzentration von 0,7 % im Kulturmedium keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Viabilität der untersuchten Zelllinien hat, für höhere DMSO-Konzentrationen wurde jedoch ein negativer Einfluss festgestellt. Eine möglichst hohe DMSO-Konzentration im Assay war jedoch notwendig, um die Extrakte und Fraktionen in homogen gelöster Form testen zu können.

In den verschiedenen Testserien wurden folgende Konzentrationen bzw. Verdünnungen der Rohextrakte und Fraktionen eingesetzt:

a) Analyse der Aktivitäten der Rohextrakte: 100 µg/ml

b) Anfertigung von Dosis-Wirkungskurven:

Rohextrakte: 0,8; 4; 20; 100; 200; 300; 500 µg/ml

Fraktionen: 0,16; 0,8; 4; 20; 100; 200 µg/ml

c) Analyse der Aktivitäten der Fraktionen der Bindungsstudie: 100 µg/ml

d) Analyse der Aktivitäten der HPLC-Fraktionen: unverdünntes maximal einsetzbares Fraktionsvolumen (0,7 % im Assay) sowie 1:3- und 1:9-Verdünnungen davon, mit DMSO aufgefüllt auf finale DMSO-Konzentration von 0,7 % im Assay

Als Kontrollen wurden 0,7 % DMSO (Negativ-Kontrolle) und Gemcitabin (Positiv-Kontrolle) eingesetzt. Gemcitabin wurde, wenn nicht anders angegeben, in der in Vorversuchen für die Zelllinien ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) eingesetzt.

Um Kontaminationen vorzubeugen, wurden die Verdünnungen aus a) und b) vor der Aufgabe auf die Zellen über 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter (Filtropur S, Sarstedt) sterilfiltriert. Für c) wurde das Medium 1 %-ig mit Penicillin/Streptomycin aus der Stocklösung 10000 U Pen/ml, 10 mg Strep/ml (PAN Biotech, Aidenbach) versetzt. Pro Verdünnung oder Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle wurde mit jeweils fünf technischen Replikaten gearbeitet. Die Behandlungen wurden gestartet, indem das alte Medium vorsichtig von den Zellen mittels Pasteurpipette und angeschlossenem Vakuum abgesaugt wurde und die Wells mit jeweils 100 µl der Extrakt- bzw. Fraktionsverdünnung oder Kontrolle unter Verwendung des manuellen Mehrfachdispensers wieder befüllt wurden.

In jedem Testlauf wurden neben den Wells mit Behandlungen (Extraktbehandlungen) auch Wells ohne Zellen mitlaufen gelassen, die mit jeweils 100 µl der Extrakt- bzw. Fraktionsverdünnung (Farb-Kontrollen) oder Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle (Negativ-/Positiv-Farb-Kontrolle) befüllt wurden, um die Testergebnisse von den Eigenfärbungen der Extraktverdünnungen bereinigen zu können und um einen theoretischen Wert für 100 %-ige Inhibition ermitteln zu können. Hier wurde, sofern nicht anders angegeben, mit jeweils vier technischen Replikaten gearbeitet. Die Mikrotiterplatten mit den verschiedenen Behandlungen und Farb-Kontrollen wurden 72 h lang bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden Wachstum und Morphologie der behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zunächst per Phasenkontrastmikroskopie mit dem CK2-Mikroskop (Olympus) begutachtet und die Konfluenz der Zellen prozentual abgeschätzt. Exemplarisch wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht, deren Bildbearbeitung mit der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health) erfolgte. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen unter Einsatz des Tetrazoliumsals XTT (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entsprechend des Protokolls [Roche Diagnostics GmbH 2011, Version 17] bestimmt. Das gelbe Tetrazoliumsals XTT (für *engl.* (sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium) inner salt) wird von den mitochondrialen Dehydrogenasen metabolisch aktiver (= vitaler) Zellen in Anwesenheit eines Elektron koppelnden Reagenz zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz reduziert, was mit einem Farbumschlag von gelb nach orange einhergeht.

Der Farbumschlag ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen [Roche Diagnostics GmbH 2011, Protokoll].

Pro Well wurden 50 µl des XTT-Reagenz mit manuellen Mehrfachdispensers aufgegeben, und die Mikrotiterplatten wurden für weitere 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde im Mikroplatten-Reader (Sunrise, TECAN) nach 5-sekündigem Schütteln für jedes Well die Absorption bei einer Wellenlänge von 475 nm zur Referenz von 650 nm bestimmt.

Die Messdaten der Extraktbehandlungen wurden relativ zu den Messdaten der DMSO-Kontrolle ausgewertet. Die Bereinigung der Extraktbehandlungen von den Farb-Kontrollen erfolgte nach Mittelwertbildung der Messdaten je eingesetzter Konzentration. Für die Auswertung der Daten wurde die Software GraphPad Prism, Version 4.0 und 8.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, Californien, USA, www.graphpad.com) verwendet. Auf Basis der erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven wurden, wie in Kapitel 2.13 beschrieben, die IC₅₀-Werte der Rohextrakte und Fraktionen ermittelt.

2.12 Analytik

2.12.1 Untersuchung der Hitzestabilität der Wirkstoffe

Um zu untersuchen, inwieweit die Wirkstoffe gegenüber Hitzeeinwirkung stabil sind, wurden Aliquots (11 µl, in DMSO D6) der zu gleichen Volumenanteilen gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) in Eppendorf-Gefäßen für 10 min bei 40, 50, 60, 70 und 80 °C im Heizblock (Thermomixer Compact, Eppendorf) erhitzt. Anschließend wurden die behandelten Aliquots, nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm in der Zentrifuge 2, im XTT-Assay im Vergleich mit der unbehandelten Fraktion in der Konzentration von 50 µg/ml auf ihre Wirksamkeit hin überprüft.

2.12.2 NMR-Spektroskopie

Alle in dieser Arbeit beschriebenen NMR-Messungen und deren Auswertungen wurden freundlicherweise von Dr. Markus Fuhrmann und Dr. Roland Geyer von der numares AG in Regensburg durchgeführt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Alle Rohextrakte und Fraktionen wurden einer ¹H-NMR-Qualitätsanalyse unterzogen, um die Gesamtheit der Inhaltsstoffe der Extrakte zu erfassen, die Aufreinigungserfolge der verschiedenen Fraktionierungstechniken zu ermitteln, die Reproduzierbarkeit des Extraktions- und Aufreinigungsprotokolls für FvT_A zu dokumentieren und Korrelationen zwischen Inhaltsstoffen und Aktivitäten abzuleiten. Zur Identifizierung der Grobstruktur der Wirksubstanzen in F15/F16 wurden weiterführende ein- (1D) und zweidimensionale (2D) NMR-Experimente durchgeführt: ¹³C-NMR, DOSY (für *engl.* Diffusion Ordered Spectroscopy), COSY (für *engl.* COReLation SpectroscopY), NOESY (für *engl.* Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange SpectroscopY),

HSQC (für *engl.* Heteronuclear Single Quantum Correlation) und HMBC (für *engl.* Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

Die Spektren wurden in DMSO D6 (Roth) bei 600 MHz (^1H) bzw. bei 150 MHz (^{13}C) mit Hilfe eines 600 MHz Avance II+ Spektrometers (Bruker) aufgenommen. DMSO D6 zeigte Verschiebungen bei 2,50 ppm (δ_{H}) bzw. bei 39,52 ppm (δ_{C}). Tetramethylsilan (TMS) wurde als Referenz verwendet. Die Datenauswertung erfolgte mittels der Software Bruker TopSpin 2.1.

2.12.3 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit Hilfe des U-2001 Spektrometers (Hitachi) im Bereich von 200 bis 840 nm aufgenommen. Die Fraktionen wurden im ursprünglichen HPLC-Eluenten vermessen (F15: 74 % H_2O /26 % ACN, F16: 72,5 % H_2O /27,5 % ACN). Für die Messungen im UV-Bereich wurden die Proben zusätzlich 1:200 mit VE-Wasser verdünnt. Als Referenzsubstanzen wurden Phloroglucinol $\geq 99,0\%$ HPLC (Aldrich, Katalog-Nr. 79330) und zwei Fucoidan-Präparationen ((1) Sigma, Katalog-Nr. F5631, aus *F. vesiculosus*, (2) „Kiel Fucoidan“, aus *Fucus evanescence* [Bernhard et al. 2012, unveröffentlichte Daten]), die alle in VE-Wasser gelöst wurden, vermessen.

2.12.4 HPLC-MS

Die Flüssigchromatographie (HPLC) mit gekoppelter Massenspektrometrie (MS) wurde freundlicherweise im Kieler Wirkstoff-Zentrum (heute: GEOMAR-Biotech) durchgeführt und deren Ergebnisse wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Für die Analyse wurde die in DMSO D6 gelöste Fraktion F15 ($c = 32,14 \text{ mg/ml}$) mit Methanol (Baker) auf 1 mg/ml verdünnt, davon wurden $60 \mu\text{l}$ injiziert.

Die HPLC erfolgte mit dem LaChrom Elite[®]-System von VWR-Hitachi bestehend aus einem L-2200 Autosampler, einer L-2130-Pumpe, einem L-2450-Photodiodenarray-UV-Detektor, einem L-2300-Säulenofen und einem Organizer. Zur Trennung wurde eine Phenomenex monolithische C18-Säule (Onyx monolithic C18, $100 \text{ mm} \times 3,0 \text{ mm}$) eingesetzt und der in Tabelle 2.6 angegebene Gradient bei angegebenen Flussraten angewendet. Als Lösungsmittel kamen A) H_2O (Aqua bidest.) + 0,1 % Ameisensäure (HCOOH , Fluka) und B) ACN + 0,1 % HCOOH zum Einsatz.

Die MS erfolgte mit der esquire4000[™]-Ionenfalle von Bruker Daltonics nach Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven und negativen Modus bei 4000 V, $320 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem N_2 -Fluss von 9 l/min .

Tabelle 2.6: Gradient der analytischen HPLC.

Zeit [min]	Lösungsmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	5	2
4	60	
6	100	
6,1		2,5
6,8	100	
7	5	
8,2	5	

2.12.5 IR-Spektroskopie

Das IR-Spektrum wurde von einer kleinen Menge der Rotationsvakuum-getrockneten Fraktion F16 (Reproduktion) erstellt. Die Messung wurde freundlicherweise von der BioViotica Naturstoffe GmbH in Göttingen durchgeführt und erfolgte auf einem FTIR-Spektrometer (FT/IR-4100typeA, Jasco).

2.12.6 Folin-Ciocalteu-Assay zur Bestimmung des Gesamt-Polyphenolgehalts

Der Gesamtpolyphenol-Gehalt des Rohextrakts FvT_A (in DMSO) sowie der Fraktion F16 (in DMSO D6) wurde mit Hilfe des modifizierten Folin-Ciocalteu-Assays nach Singleton und Rossy [1965] bestimmt. Die Methode beruht auf der Oxidation von Hydroxyl-Gruppen der Probeninhaltsstoffe im alkalischen Milieu, während das eingesetzte Folin & Ciocalteu's Phenol-Reagenz (FC-Reagenz) zu einem Phosphowolframat-Phosphomolybdat-Komplex reduziert wird. Dabei entsteht proportional zur Anzahl der reduzierenden OH-Gruppen in der Probe ein messbarer, blauer Farbstoff. So kann anhand des Einsatzes eines Standards der Gesamtpolyphenolgehalt einer Probe abgeschätzt werden. Da mit dieser Methode alle reduzierenden OH-Gruppen in einer Probe, d.h. auch jene von reduzierenden Zuckern, Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan oder von Ascorbinsäure gemessen werden, weist der FC-Assay Polyphenole nur unspezifisch nach und macht gegebenenfalls weitere Methoden erforderlich [Singleton 1985]. Übertragen auf die zu analysierenden Proben dieser Arbeit bedeutet dies, dass der Assay für den komplexen Rohextrakt FvT_A nur als zusätzliches Verfahren zur Bestätigung der mittels der spektroskopischen Methoden gewonnenen Ergebnisse eingesetzt werden konnte. Für die aufgereinigte Fraktion F16 wurde seine Aussagekraft als höher eingeschätzt.

Um Reagenzien und Lösungen zu sparen, wurde der FC-Assay mit Hilfe des Protokolls vom Waterhouse Lab [Waterhouse 2013 - *Internetquelle*] und nach Zhang et al. [2006] weiter modifiziert. Er wurde in Einmalküvetten (Sarstedt) in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml unter Einsatz des gebrauchsfertigen FC-Reagenz von Sigma-Aldrich (2 N, Katalog-Nr. F9252) durchgeführt. Zur Herstellung der für das Einstellen des alkalischen Milieus benötigten 7,5 %-igen Natriumcarbonatlösung wurde Natriumcarbonat anhydrous (Riedel de Haen) verwendet.

Rohextrakt und Fraktion wurden für den Assay mit DMSO und VE-Wasser auf eine finale Konzentration von 100 µg/ml in 0,7 % DMSO eingestellt. Entsprechend Zhang et al. [2006] wurde

Phloroglucinol $\geq 99,0$ % HPLC (Aldrich, Katalog-Nr. 79330), das Monomer der braunalgentypischen Phlorotannine [Ragan und Glombitza 1986], als Standard verwendet. Phloroglucinol wurde in VE-Wasser gelöst, und es wurde eine Verdünnungsreihe in VE-Wasser mit den Konzentrationen 250, 125, 62,5, 31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ angefertigt. VE-Wasser wurde als 0-Wert eingesetzt. Die Verdünnungsreihe wurde in jedem Testdurchlauf zur Erstellung einer Kalibriergeraden mitgeführt.

Der Assay wurde in drei unabhängigen Läufen, jeweils in Duplikaten und mit frisch angesetzter Extrakt- und Fraktionsverdünnung, durchgeführt. Hierfür wurden 20 μl der Extrakt-, Fraktions-Verdünnung oder der Phloroglucinolverdünnungsreihe mit je 1,08 ml VE-Wasser und 100 μl FC-Reagenz in die Küvetten gegeben. Die Ansätze wurden mit dem Rührspatel gut durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 μl der 7,5 %-igen Natrium-Carbonatlösung dazugegeben, es wurde mit einem Rührspatel gut durchmischt und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorption der Proben entsprechend Zhang et al. [2006] bei 750 nm im UV/Vis-Spektrometer bestimmt. Als Blank diente der 0-Wert der Phloroglucinol-Verdünnungsreihe. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass weder das eingesetzte DMSO 0,7 % noch die Extrakteigenfärbungen in der verwendeten Verdünnung mit dem Assay interferierten, sodass keine Korrektur der Messwerte vorgenommen werden musste. Der Gesamtpolyphenolgehalt in Rohextrakt und Fraktion wurde mit Hilfe der erstellten Phloroglucinol-Kalibriergeraden ermittelt und relativ zur eingesetzten Extrakt-/Fraktions-Konzentration (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Phloroglucinoläquivalenten (PGE) in % ausgedrückt.

2.12.7 Quantitative Bestimmung bakterieller Endotoxine

Bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) sind hitzestabile Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien und Blaualgen, die beim Absterben der Organismen frei werden [Freudig 2006]. Sie können auf Zellkulturen und auf den Menschen (bei Kontakt mit dessen Schleimhäuten und beim Übertritt ins Blut) stark schädigende Wirkungen ausüben. Diese umfassen bei Zellkulturen u.a. Interaktionen mit Zellmembranen (morphologische Veränderungen), Stimulation der Zytokinproduktion und Beeinflussung der Synthese vieler Zellprodukte [Dawson 1998], beim Menschen Fieberreaktionen, Blutdruckabfall und septischer Schock [Burrell 1994].

Der Gehalt an Endotoxinen in der zu gleichen Volumenanteilen gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) wurde freundlicherweise von der BMA-Labor GbR, Bochum, mittels des chromogen-kinetischen Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL-Test) bestimmt. Hierfür wurde der PYROCHROME® LAL-Test (Associates of Cape Cod Incorporated, USA) verwendet, welcher nach Methode D in Kapitel 2.6.14 „Bacterial endotoxins“ des Europäischen Arzneibuchs (Ausgabe 9.3) [European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 3, Council of Europe 2017] zugelassen ist. Der Test beruht auf der Beobachtung, dass eine Infektion des Pfeilschwanzkrebsses (*Limulus polyphemus*) mit gramnegativen Bakterien zu einer Blutgerinnung führt. Für den Test wird Limulus-Amöbocyten-Lysat,

ein wässriger Extrakt der roten Blutzellen des Krebses, verwendet, dem ein farbloses synthetisches Substrat (Peptid), das mit p-Nitroanilin (pNA) gekoppelt ist, zugesetzt ist. Die Anwesenheit von Endotoxinen (Nachweisgrenze 0,005 EU/ml) in einer Probe führt zur Aktivierung eines im LAL vorhandenen Proenzym, welches das künstliche Substrat spaltet. Dadurch kommt es zur Freisetzung des gelb gefärbten und bei 405 nm messbaren pNAs, dessen Freisetzungsgeschwindigkeit proportional zur Endotoxinkonzentration in der analysierten Probe ist [Associates of Cape Cod Incorporated 2011: PYROCHROME®-Produktbeschreibung].

Der Test wurde im Mikrotiterformat bei konstanter Temperatur von 37 °C im Mikroplatten-Reader durchgeführt. Der Endotoxingehalt wurde für zwei Verdünnungen der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) ($c_{\text{final}} = 200 \mu\text{g/ml}$ und $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{g/ml}$, DMSO D6-Fractionen verdünnt mit Aqua ad iniectabilia) mittels einer Eichgeraden des Standardendotoxins (CSE, Control Standard Endotoxin, Associates of Cape Cod Incorporated, USA) bestimmt. Um Interferenzen der Verdünnungen von F15/F16 mit dem Assay auszuschließen, wurden die Proben zusätzlich mit 5 EU/ml CSE vermessen. Eine CSE-Wiederfindungsrate (*engl.* Spike-Recovery) von 50 - 200 % bestätigt die Gültigkeit der Messergebnisse.

2.12.8 Qualitative und quantitative Bestimmung von Schwermetallen

Schwermetalle wie Quecksilber, Blei, Cadmium, Kupfer, Chrom und andere wirken sich stark negativ auf grundlegende Zellfunktionen aus. Diese potentiell toxischen Metalle führen durch Bildung von freien Radikalen, reaktiven Stickstoffverbindungen und Peroxinitrit, Blockade von Calciumkanälen in der Zellmembran und Störung der intrazellulären Calciumhomöostase zur Schädigung der Mitochondrien. So kommt es zum Potentialabfall an der Mitochondrienmembran, zur Hemmung der Atmungskette, Auslösung des mitochondrialen Permeabilitätsübergangs (Ruptur der Außenmembran durch das Öffnen von Proteinporen) bis hin zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose [Jennrich 2010].

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Schwermetallen im Rohextrakt FvT_A und in der zu gleichen Volumenanteilen gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion), beide mit $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{g/ml}$ (DMSO-Rohextrakt bzw. DMSO D6-Fractionen verdünnt mit Aqua ad iniectabilia), wurde freundlicherweise von der Umwelt Control Labor GmbH, Kiel, durchgeführt. Hierfür wurde das ICP-OES-Screening-Verfahren (für *engl.* inductively coupled plasma optical emission spectrometry) angewendet, unter Einsatz des Vista-Pro ICP-OES-Spektrometers mit Echelle-Polychromator, axialem induktiv gekoppelten Plasma als Anregungsquelle und VistaChip CCD-Simultandetektor (alles von Varian). Bei der optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma wird heißes Argonplasma verwendet, um Atome einer ursprünglich flüssigen Probe anzuregen, die hierfür zerstäubt wurde. Das Licht (Photon), das beim Zurückfallen der Elektronen in den Ausgangszustand

ausgestrahlt wird, wird detektiert und besitzt je Element eine charakteristische Wellenlänge. Die quantitative Auswertung der vorhandenen Elemente erfolgt anhand der Intensität des ausgesandten Lichts je Wellenlänge [Thomas 2004].

Die ICP-OES - oder stattdessen auch die ICP-MS (für *engl.* inductively coupled plasma mass spectrometry) - wurde im April 2013 in die Europäische Pharmakopöe [2013], 7. Ausgabe, Supplement 7.7, mit den Kapiteln 5.20 ("Metal catalyst or metal reagent residues") und 2.4.20 (Monographie: "Determination of metal catalyst or metal reagent residues") als Analyseverfahren für anorganische Verunreinigungen und toxische Metalle in pflanzlichen Drogen aufgenommen und ist seit dem 1. Januar 2017 vorgeschrieben [Heberlein und Jencio 2016 - *Internetquelle*; Keitel 2013].

2.13 Statistische Auswertung

Die Daten zur Inhibition der Zellviabilität wurden, falls nicht anders angegeben, in drei unabhängigen Experimenten erhoben. Sie sind jeweils als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD für *engl.* standard deviation) angegeben. Für die statistischen Analysen wurde die Software GraphPad Prism, Version 4.0 und 8.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, Californien, USA, www.graphpad.com) verwendet. Signifikanzen der Viabilitäts-inhibitorischen Aktivitäten der Extrakte gegenüber der DMSO-Kontrolle wurden mit Hilfe des paarweisen *t*-Tests ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen den Aktivitäten verschiedener Algenextrakte wurden mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA für *engl.* one-way analysis of variance) für wiederholte Messungen und nachfolgendem Tukey's Post-hoc-Test bestimmt. Unterschiede mit *p*-Werten $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet und wie folgt mit Sternchen gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**). Anhand der für die Rohextrakte und Fraktionen ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die entsprechenden IC_{50} -Werte nach folgenden Schritten bestimmt: Die Einzelmesswerte der Extraktbehandlungen und Farb-Kontrollen eines jeden Testdurchlaufs wurden zunächst normalisiert, mit 0 % Inhibition = der arithmetische Mittelwert der Negativ-Kontrollen (0,7 % DMSO auf Zellen) und mit 100 % Inhibition = der arithmetische Mittelwert der Negativ-Farb-Kontrollen (0,7 % DMSO ohne Zellen). Von den normalisierten Werten wurden je eingesetzter Konzentration die arithmetischen Mittelwerte gebildet. Anschließend wurden die Mittelwerte der Extraktbehandlungen je eingesetzter Konzentration von den entsprechenden Mittelwerten der Farb-Kontrollen bereinigt. Außerdem wurden die *x*-Werte (= die eingesetzten Konzentrationen) logarithmisch transformiert ($x = \log x$). Anschließend wurde eine nichtlineare Regression anhand des Kurvenmodells „sigmoidal dose-response mit variablem slope“ (*engl.* für s-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung mit variablem Gefälle) durchgeführt. Schließlich lieferte der *x*-Wert auf Höhe des Wendepunkts der erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurve den IC_{50} -Wert.

3 Ergebnisse

3.1 Inhibition der Viabilität von Pankreas-Krebszelllinien durch Rohextrakte aus *F. vesiculosus*

Um das Wirkstoff-Potential der Ostseealge *F. vesiculosus* gegenüber ausgewählten Pankreas-Krebszelllinien zu bestimmen, wurde die im späten Frühjahr aus der Kieler Förde gesammelte Braunalge zunächst mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte auf ihre Viabilitäts-inhibierenden Aktivitäten gegenüber den Zelllinien Panc89 und PancTU1 nach 72-stündigen Behandlungen im XTT-Assay (im Folgenden Standard-Viabilitäts-Assay genannt) hin untersucht. Zusätzlich wurden per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie „Fingerabdrücke“ von den Extrakten angefertigt, mittels derer wertvolle Informationen zu den Inhalts- und Wirkstoffen der Extrakte gewonnen wurden. Von den initialen Rohextrakten wurde der aktivste Rohextrakt für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

3.1.1 Herstellung initialer Rohextrakte

Mittels Mazerations-Verfahren und Einsatz verschiedener Extraktionsmittel wurden aus jeweils 30 g gefrorenem Algenmaterial, aufgeteilt in Rezeptakelblasen (R) und restlichem Thallus (T), nach dem Standardprotokoll (Kapitel 2.9.1) sechs komplexe Rohextrakte angefertigt (Tabelle 3.1, Abb. 3.1). Die erhaltenen Extrakte unterschieden sich in Färbung, beobachteter Viskosität, Extraktvolumen und -ausbeute. Alle T-Extrakte waren intensiver gefärbt als die R-Extrakte bei gleichzeitig höherem Extrakt-Trockengewicht und TG des eingesetzten gefrorenen Algenmaterials (siehe hierzu Tabelle 3.2). Die Farbpalette der Rohextrakte reichte von Gelb/Ocker (wässrige Extrakte) über Braun (ethanolischer R-Extrakt) bis hin zu Grün/Schwarz-Grün (acetonische Extrakte und ethanolischer T-Extrakt). Die größten Extraktausbeuten wurden durch ethanolische Extraktion erzielt.

Tabelle 3.1: Bezeichnungen und Spezifikationen der sechs verschiedenen initialen Rohextrakte, die aus der Braunalge *F. vesiculosus* (Fv) aus der Kieler Förde hergestellt worden sind. Die Rohextrakte wurden durch 19 h-ige Extraktion bei 4 °C aus je 30 g gefrorenem Algenmaterial und 60 ml Extraktionsmittel erhalten. pH-Wert 1: nach Zerkleinerung der Algen, pH-Wert 2: nach 19 h-iger Inkubation im Extraktionsmittel; beobachtete Viskosität: sehr groß, stark schleimig: +++, groß, schleimig: ++, mittel: +, gering: -, sehr gering: -; DEV: Droge(Frischpflanze)-Extrakt-Verhältnis; TG: Trockengewicht.

Extrakt-Bezeichnung	Organ	Extraktionsmittel	Extraktionsverhältnis ($W_{\text{gefrorene Alge}}/V$)	pH-Wert		beobachtete Viskosität	erhaltenes Extraktvolumen [ml]/DEV	Extrakt-TG [g]	TG von 30 g gefrorenem Algenmaterial [g]	Extraktausbeute [%]
				pH-Wert 1	pH-Wert 2					
FvR_W	Rezeptakelblasen (R)	VE-Wasser (W)	1:2	5,67	5,61	++++	48/ 1:1,6	0,63	3,6	17,50
FvR_E		EtOH (E) 96 %		5,54	5,58	+++	75/ 1:2,5			21,39
FvR_A		Aceton (A) ≥ 99,5 %		5,41	5,39	-	68/ 1:2,27			15,83
FvT_W	restlicher Thallus (T)	VE-Wasser	1:2	5,60	5,50	+++	40,5/ 1:1,35	1,14	7,9	14,43
FvT_E		EtOH 96 %		5,46	5,36	-	52,5/ 1:1,75			18,61
FvT_A		Aceton ≥ 99,5 %		5,43	5,44	-	47/ 1:1,57			17,85

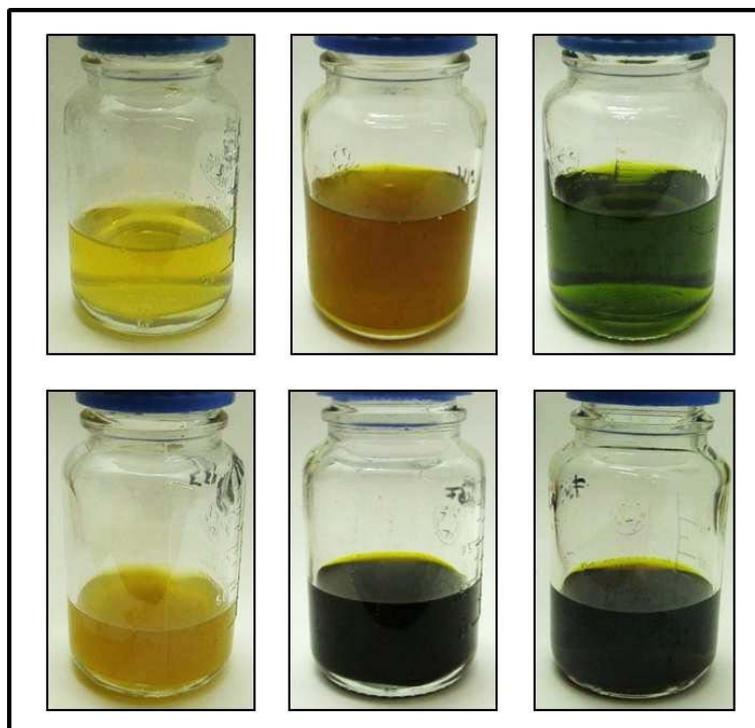


Abbildung 3.1: Färbung und Volumina der verschiedenen Rohextrakte, hier direkt nach der Filtration mittels Glasfaserfilter (MN); obere Reihe v.l.: FvR_W, FvR_E, FvR_A; untere Reihe v.l.: FvT_W, FvT_E, FvT_A; Extrakt-Bezeichnungen und Spezifikationen in Tabelle 3.1.

Tabelle 3.2: Trockengewichte der für die Rohextraktion verwendeten Algen-Charge. Die TG wurden in Triplikaten von je 10 g Frischalgenmaterial, die bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet wurden, ermittelt. MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Organ	TG Probe 1 [g]	TG Probe 2 [g]	TG Probe 3 [g]	MW TG [g] ± SD	MW Trockengehalt [%]	MW Wassergehalt [%]
Rezeptakel	1,06	1,28	1,25	1,20 ± 0,12	11,97	88,03
Thallus	2,54	2,56	2,80	2,63 ± 0,14	26,33	73,67

3.1.2 Untersuchung der Aktivitäten der Rohextrakte im XTT-Viabilitäts-Assay

Die in DMSO gelösten Rohextrakte wurden auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber den PDAC-Zelllinien Panc89 und PancTU1 untersucht. Dafür wurden die Zelllinien über einen Zeitraum von 72 h mit einheitlich 100 µg/ml Rohextrakt und 0,7 % DMSO inkubiert. Anschließend wurde mittels XTT die Zellviabilität bestimmt.

Vier der sechs Rohextrakte zeigten deutliche (> 20 %) und statistisch signifikante zytotoxische Aktivitäten gegenüber Panc89-Zellen. Gegenüber PancTU1-Zellen zeigten drei der sechs Rohextrakte deutliche Aktivitäten, wobei nur eine Extrakt-Aktivität auch statistisch signifikant war. Der acetonische Thallus-Extrakt (FvT_A) zeigte von allen Extrakten die stärkste Aktivität, mit einer Inhibitionsrate von 80,3 % ± 9,4 ($p = 0,0045$) gegenüber den Panc89- und von 82,6 % ± 10,0 ($p = 0,0049$) gegenüber den PancTU1-Zellen (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Aktivitäten der Rohextrakte, gelöst in DMSO, gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Zellen wurden für 72 h mit jeweils 100 µg/ml Extrakt in einem finalen DMSO-Volumen von 0,7 % behandelt. Anschließend wurde mittels XTT die Zellviabilität bestimmt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Experimente ($n = 3$). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sind folgendermaßen mit Sternchen gekennzeichnet: p -Werte < 0,05 (*) oder < 0,01 (**).

Extrakt [c = 100 µg/ml]	Inhibition der Viabilität [%] ± SD ($n = 3$)	
	Panc89	PancTU1
FvR_W	1,8 ± 6,6	7,6 ± 12,8
FvR_E	8,3 ± 1,0 **	-5,8 ± 13,2
FvR_A	21,0 ± 8,3 *	27,9 ± 28,0
FvT_W	50,7 ± 15,9 *	59,7 ± 26,1
FvT_E	38,1 ± 12,2 *	51,4 ± 20,7
FvT_A	80,3 ± 9,4 **	82,6 ± 10,0 **

Die Rohextrakt-Aktivitäten gegenüber den Panc89-Zellen lassen sich folgendermaßen ordnen: FvT_A >* FvT_W ≥ FvT_E ≥ FvR_A (≥ FvR_E ≥ FvR_W), (*) für $p < 0,05$ bei $c = 100$ µg/ml. Gegenüber den PancTU1-Zellen ist die Reihenfolge der Aktivitäten etwa vergleichbar.

Die T-Extrakte waren gegenüber beiden Zelllinien aktiver als die R-Extrakte. Keine Aktivität wurde für den wässrigen R-Extrakt (FvR_W) festgestellt. Der ethanolische R-Extrakt (FvR_E) zeigte geringe Aktivität gegenüber den Panc89-Zellen, jedoch keine gegenüber den PancTU1-Zellen. Wie bei den T-Extrakten, war auch der acetonische R-Extrakt unter den verschiedenen R-Extrakten der aktivste, allerdings deutlich nur gegenüber den Panc89-Zellen.

3.1.2.1 Aktivität von FvT_A im Detail

Da er von allen getesteten Rohextrakten die größte Viabilitäts-inhibierende Aktivität gegenüber den Zelllinien Panc89 und PancTU1 aufwies, wurde der acetonische Thallus-Extrakt (FvT_A) für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt.

Um diesen Extrakt weiter zu charakterisieren, wurden durch Einsatz serieller Extraktverdünnungen im Standard-Viabilitäts-Assay mit Panc89 und PancTU1-Zellen Dosis-Wirkungskurven erstellt (Abb. 3.2). Während bis zu einer Extraktkonzentration von 20 µg/ml kein Effekt zu erkennen war, wurden beide Zelllinien ab einer Konzentration von 200 µg/ml fast komplett abgetötet. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurde, wie in Kapitel 2.13. beschrieben, die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) gegenüber den Zelllinien kalkuliert. Die IC_{50} -Werte von FvT_A betragen 71,47 µg/ml ($n = 3$) gegenüber den Panc89- und 76,96 µg/ml ($n = 3$) gegenüber den PancTU1-Zellen.

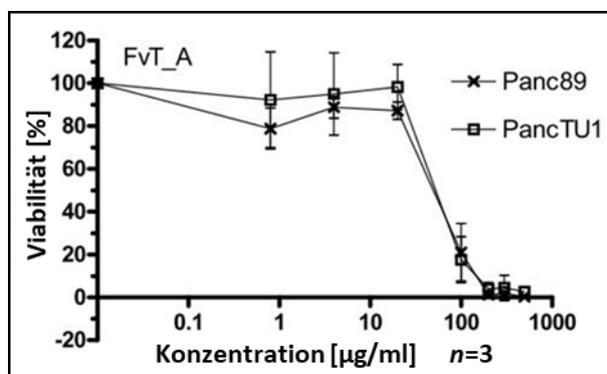


Abbildung 3.2: Dosis-Wirkungskurven des Rohextrakts FvT_A gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen, ermittelt nach 72 h-iger Behandlung der Zellen mit seriellen Extraktverdünnungen im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente ($n = 3$). Die für FvT_A anhand dieser Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelten IC_{50} -Werte betragen 71,47 µg/ml gegenüber Panc89- und 76,96 µg/ml gegenüber PancTU1-Zellen.

Nach der 72-stündigen Extraktbehandlung wurden die PDAC-Zellen auch optisch, mittels Phasenkontrastmikroskopie, auf Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO 0,7 %) hin untersucht. Für die mit FvT_A mit $c = 100$ µg/ml behandelten Zellen wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ein deutlich verändertes morphologisches Bild beobachtet (Abb. 3.3). Beide mit FvT_A behandelten Zelllinien wiesen mit geschätzten 2,5 % im Vergleich zu 100 % bei DMSO 0,7 % eine deutlich geringere Konfluenz auf. Der Großteil der noch vorhandenen Zellen war abgerundet und

abgelöst. Die Zellmembranen nahezu aller noch vorhandenen Zellen waren deformiert, wenige Zellen waren aufgebläht. In vielen Zellen wurden Blasen beobachtet. Die PancTU1-Zellen neigten stärker zur Blasenbildung als die Panc89-Zellen.

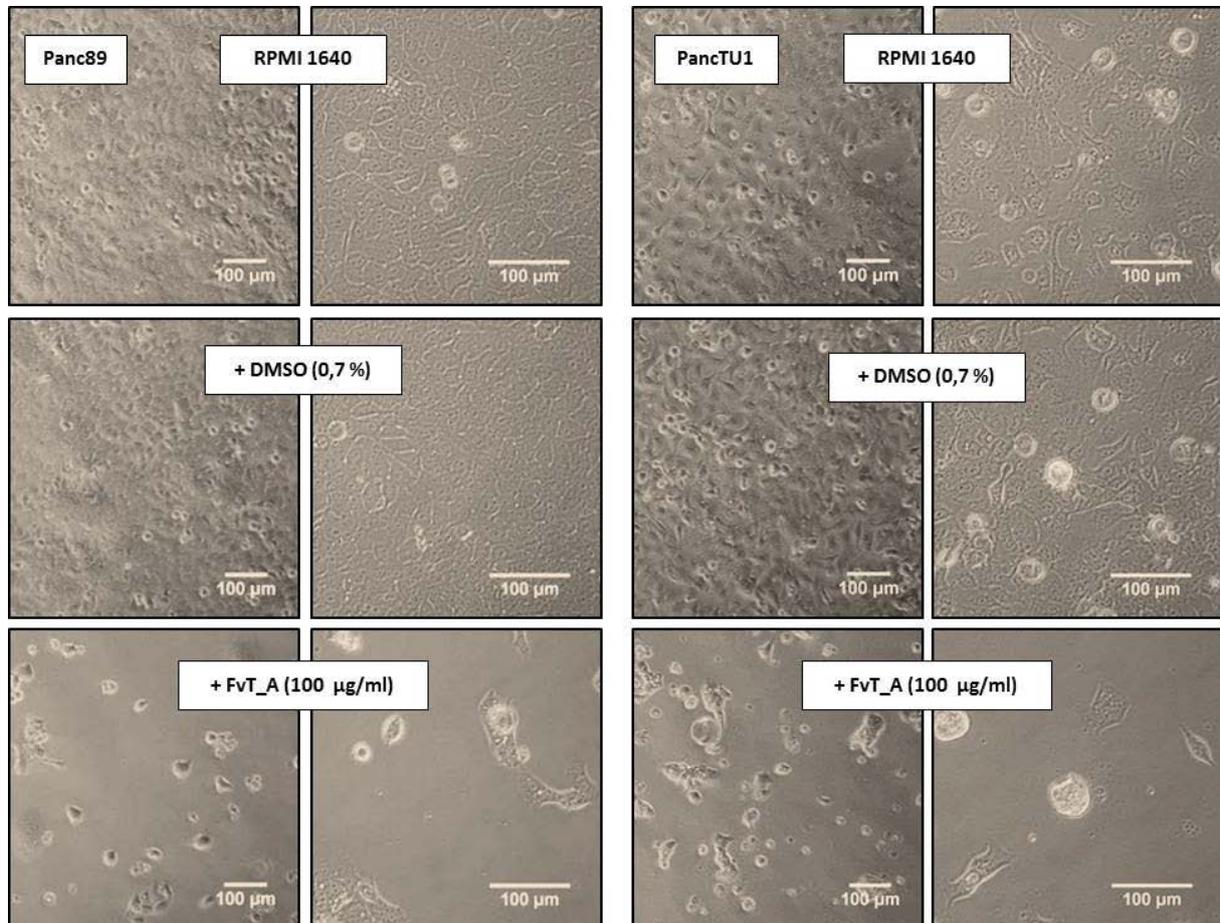


Abbildung 3.3: Panc89- und PancTU1-Zellen nach 72 h-iger Behandlung mit 100 µg/ml des Rohextraktes FvT_A im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO 0,7 %) und im Vergleich zur Medium-Kontrolle. Während die Zellen der Negativkontrolle und der Mediumkontrolle bei 100 % Konfluenz intakt waren, war die Zellzahl nach Behandlung mit FvT_A deutlich vermindert, die Zellen abgerundet, deformiert und teilweise gebläht. Phasenkontrastmikroskopie, gezeigt sind zwei verschiedene Vergrößerungen.

In einer weiteren Testreihe im Standard-Viabilitäts-Assay wurde untersucht, ob ein acetonischer Rohextrakt aus getrocknetem Thallus-Algenmaterial (FvTt_AW) die gleiche Wirksamkeit aufweist wie FvT_A aus gefrorenem Thallus-Algenmaterial, beide mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$. Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, ob sich anstatt des gefrorenen auch das preiswertere lagerbare luftgetrocknete Algenmaterial zur Extraktion der Wirkstoffe eignen würde. FvTt_AW wurde nach demselben Verfahren angefertigt wie FvT_A, jedoch aus luftgetrocknetem Algenmaterial und zusätzlich hinzugefügtem Wasseranteil, der einen vergleichbaren Wassergehalt in beiden Extraktionsansätzen gewährleistete.

FvTt_AW zeigte keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber den Zelllinien Panc89 und PancTU1, während der gleichzeitig mitgetestete FvT_A, wie erwartet, deutlich aktiv war. Auffällig waren die

deutlich geringere Extrakt-Ausbeute sowie der veränderte pH-Wert im Extraktionsansatz bei FvTt_AW im Vergleich zu FvT_A (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Gegenüberstellung der Rohextrakt-Spezifikationen sowie der Aktivitäten von FvTt_AW aus getrocknetem versus FvT_A aus gefrorenem Thallus-Material im 72-stündigen Standard-Viabilitäts-Assay. Die Werte der Inhibition sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente ($n = 3$). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sind mit Sternchen markiert: p -Werte $< 0,05$ (*). ^aFür FvTt_AW wurde derselbe Wassergehalt zum Extraktionsansatz hinzugegeben, der ursprünglich durch das gefrorene Algenmaterial in den Ansatz von FvT_A eingetragen worden ist.

Extrakt-Bezeichnung	Organ	Extraktionsmittel	Extraktionsverhältnis ($w_{\text{gefrorene Alge}}/v$)	pH-Wert 1	pH-Wert 2	Extrakt-TG [g]	TG von 30 g gefrorenem Algenmaterial [g]	Extraktausbeute [%]	Inhibition der Viabilität [%] \pm SD bei $c = 100$ $\mu\text{g/ml}$ ($n = 3$)	
									Panc89	PancTU1
FvTt_AW	Thallus	Aceton 99,5 % / H ₂ O (AW)	1:2 ^a	5,43	5,44	0,58	7,9	7,33	1,42 \pm 5,0	11,41 \pm 14,7
FvT_A		Aceton (A) 99,5 %	1:2	6,54	6,58	1,41		17,85	73,66 \pm 14,9 *	67,08 \pm 23,7 *

3.1.3 ¹H-NMR-Monitoring

Um die Gesamtheit der Inhaltsstoffe der Rohextrakte zu erfassen, wurden sie einer ¹H-NMR-Qualitätsanalyse unterzogen. Die NMR-Spektren (Abb. 3.4) zeigten, dass durch den Einsatz der Extraktionsmittel VE-Wasser, Ethanol und Aceton, welche insgesamt ein breites Löslichkeitsspektrum abdecken, Stoffe verschiedener chemischer Gruppen aus dem Algenmaterial extrahiert worden sind, u.a. Kohlenhydrate (bei 3 - 4,5 ppm), Aminosäuren (Aminogruppe bei 1 - 4 ppm) sowie aromatische und heterozyklische Verbindungen (ab ≥ 6 ppm) [persönliche Kommunikation mit Dr. Markus Fuhrmann und Dr. Roland Geyer, numares AG]. Der Vergleich der Spektren der in jeweils gleicher Konzentration eingesetzten Rohextrakte (mit $c = 10$ mg/ml in DMSO D₆ + Tetramethylsilan (TMS 0,03 %)) ergab deutliche Unterschiede in Konzentration und z.T. auch Zusammensetzung der Inhaltstoffe. Unterschiede waren u. a. im Bereich aromatischer Verschiebungen (um 6 und 9 ppm) zu verzeichnen. Der aktivste Extrakt FvT_A zeigte in diesem Bereich die am prägnantesten ausgeprägten Peaks, während der inaktive Extrakt FvR_W dort keine Peaks aufwies. Eine entsprechende Beobachtung wurde beim Vergleich der Spektren von FvT_A mit dem inaktiven Rohextrakt FvTt_AW aus luftgetrocknetem Algenmaterial gemacht (Abb. 3.5). Auch bei FvTt_AW fehlten die Peaks im aromatischen Bereich (um 6 und 9 ppm).

Neben diesen Unterschieden wurden auch Substanzmuster beobachtet, die in allen Extrakten vorhanden waren, wie z.B. jene im Kohlenhydratbereich (bei 3 - 4,5 ppm).

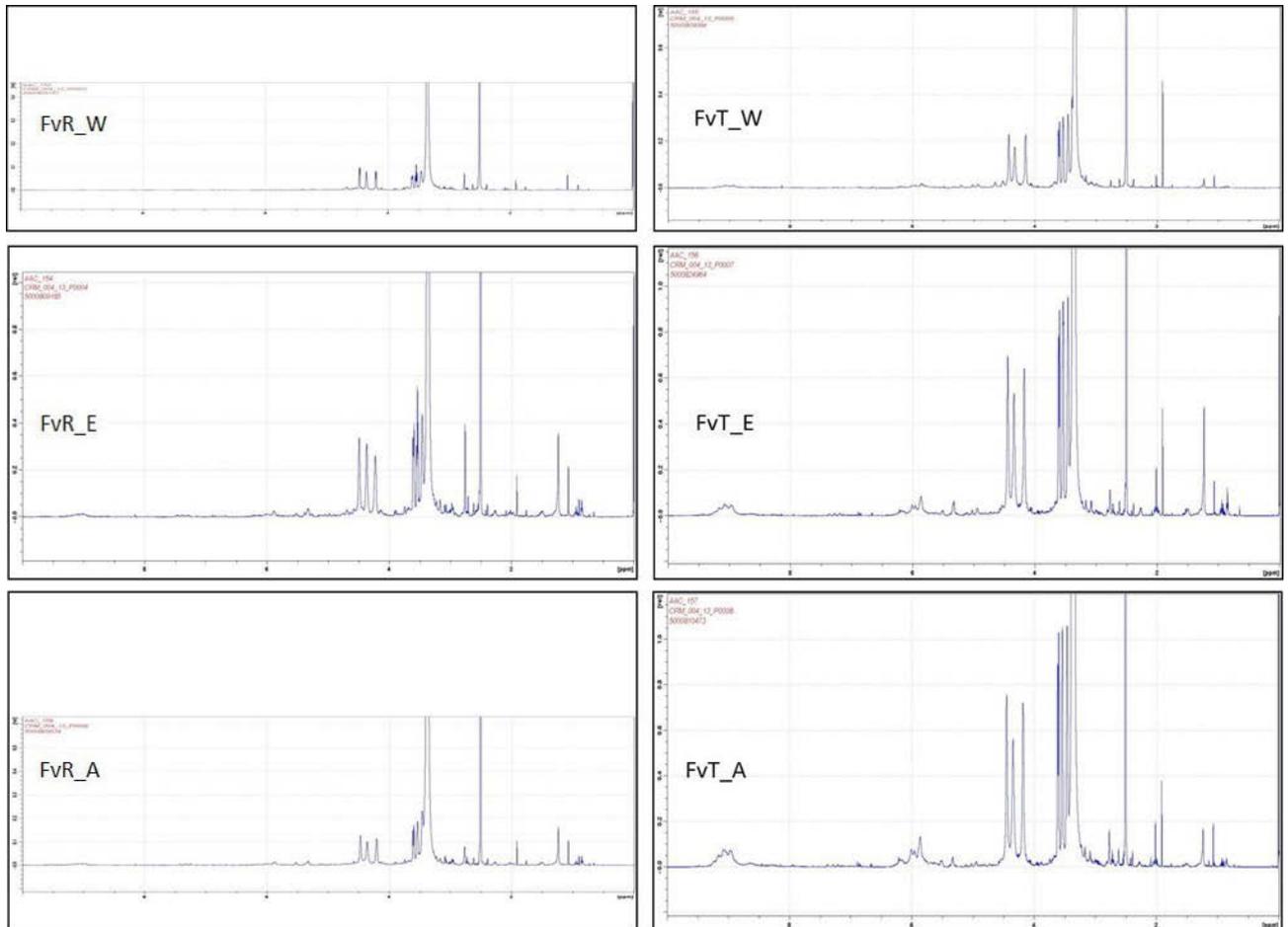


Abbildung 3.4: ^1H -NMR-Spektren der initialen Rohextrakte. Die Extrakte wurden in jeweils gleicher Konzentration ($c = 10 \text{ mg/ml}$) in $\text{DMSO D}_6 + \text{TMS (0,03 \%)}$ gemessen. Unterschiede waren u.a. im hohen ppm-Bereich, d.h. im Bereich aromatischer Verschiebungen zu verzeichnen. Der im XTT-Assay aktivste Extrakt FvT_A zeigte in diesem Bereich die am prägnantesten ausgeprägten Peaks, während der inaktive Extrakt FvR_W dort keine Peaks aufwies.

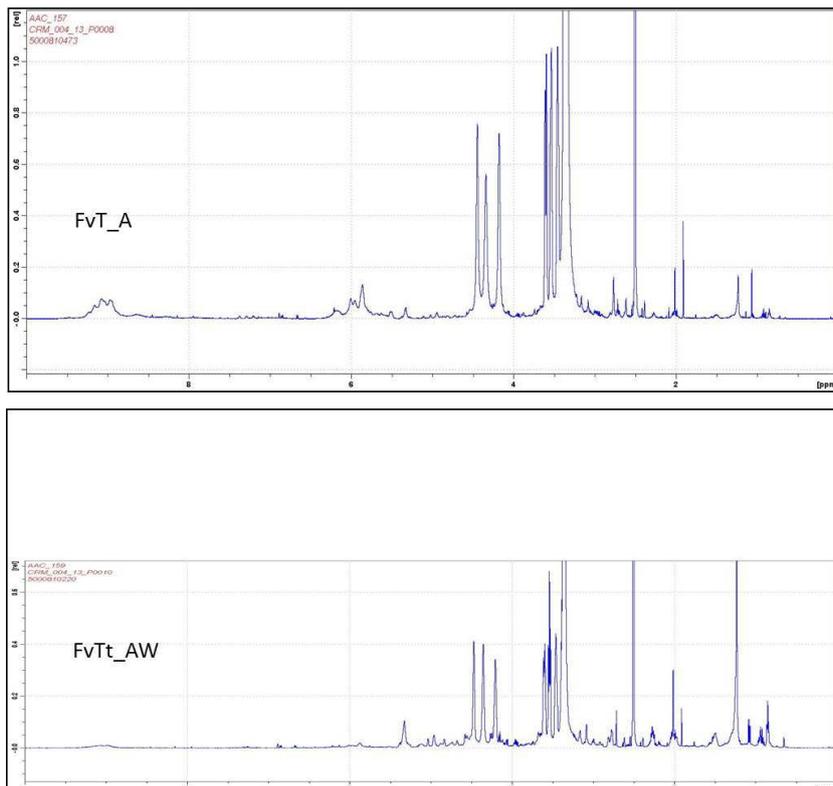


Abbildung 3.5: ^1H -NMR-Spektren der acetonischen Thallus-Extrakte aus gefrorenem (FvT_A) versus luftgetrocknetem (FvTt_AW) Algenmaterial. Die Extrakte wurden in jeweils gleicher Konzentration ($c = 10 \text{ mg/ml}$) in DMSO D6 + TMS (0,03 %) gemessen. Der im XTT-Assay inaktive Extrakt FvTt_AW zeigte im Gegensatz zum aktiven Extrakt FvT_A keine Peaks im hohen ppm-Bereich, d.h. im Bereich aromatischer Verschiebungen.

3.2 Entwicklung eines Aufreinigungsschemas für die Wirkstoffe des acetonischen Thallus-Extraktes (FvT_A)

Für die Viabilitäts-inhibierenden Wirkstoffe des aktivsten Rohextraktes (FvT_A) wurde mittels Aktivitäts-geleiteter Fraktionierung ein mehrstufiges Aufreinigungsschema etabliert. Dieses wurde anhand der Erkenntnisse aus einer einfachen Grobfraktionierung und einer breit angelegten Bindungsstudie, welche das Verhalten der Wirkstoffe gegenüber verschiedenen Chromatographie-Materialien aufzeigte, aufgebaut. Die in den jeweiligen Trennungen gewonnenen Fraktionen wurden im Standard-Viabilitäts-Assay auf ihre Aktivität hin überprüft. Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie der Fraktionen wurden Informationen zum Charakter der Wirkstoffe sowie zum Aufreinigungserfolg gesammelt.

3.2.1 Grobfraktionierung durch Festphasenextraktion an Amberlite® XAD16

Um einen ersten Eindruck vom Bindungsverhalten und von der Art der Wirkstoffe zu gewinnen, wurde eine Grobfraktionierung von FvT_A mittels des unpolaren Polymers Amberlite® XAD16 im Batch-Verfahren durchgeführt. Zur Trennung wurden 200 mg FvT_A, gelöst in 1,49 ml DMSO, eingesetzt. Die vorbereitende starke Verdünnung (1:33) des Extrakts mit Aqua bidest. verursachte ein Ausfällen von Substanzen. Das ausgefällte Probenmaterial wurde abzentrifugiert und als Fraktion

X16_1 aufbewahrt. Nach Inkubation der Extraktverdünnung mit dem XAD16-Material und nachfolgender Elution mit MeOH und ACN wurden drei weitere Fraktionen erhalten: X16_2 (Überstands-Fraktion), X16_3 (MeOH-Eluats-Fraktion, 1. Eluat) und X16_4 (ACN-Eluats-Fraktion, 2. Eluat) (Tabelle 3.5).

Alle Fraktionen wurden einheitlich mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im Standard-Viabilitäts-Assay auf ihre Aktivität hin überprüft. Die Aktivität des Rohextraktes wurde in der MeOH-Eluats-Fraktion (X16_3) wieder aufgefunden (Abb. 3.6). Die Substanzen, die bei der Probenvorbereitung ausgefällt wurden (X16_1), zeigten keine Aktivität. Von der Tatsache, dass die Wirkstoffe aus stark polarer Umgebung (Aqua bidest.) an das unpolare XAD16-Material gebunden haben, sich mit dem polaren MeOH aber wieder sehr gut vom XAD16 eluieren ließen, lässt sich schließen, dass die Wirkstoffe polaren bzw. partiell polaren Charakter haben.

Tabelle 3.5: Übersicht und Charakterisierung der Fraktionen, die durch Grobfractionierung an Amberlite® XAD16 aus 200 mg des Rohextraktes FvT_A erhalten wurden.

Bezeichnung der Fraktion	Beschreibung	Rückschlüsse auf die Polarität der enthaltenen Substanzen	TG [mg]
X16_1	durch Verdünnen mit Aqua bidest. ausgefällte Substanzen	eher unpolar	20,0
X16_2	Überstand, d.h. Substanzen, die nicht an XAD16 gebunden haben	sehr polar	134,4
X16_3	1. Eluat MeOH	polar bis partiell polar	23,6
X16_4	2. Eluat ACN	wenig polar bis unpolar	13,0

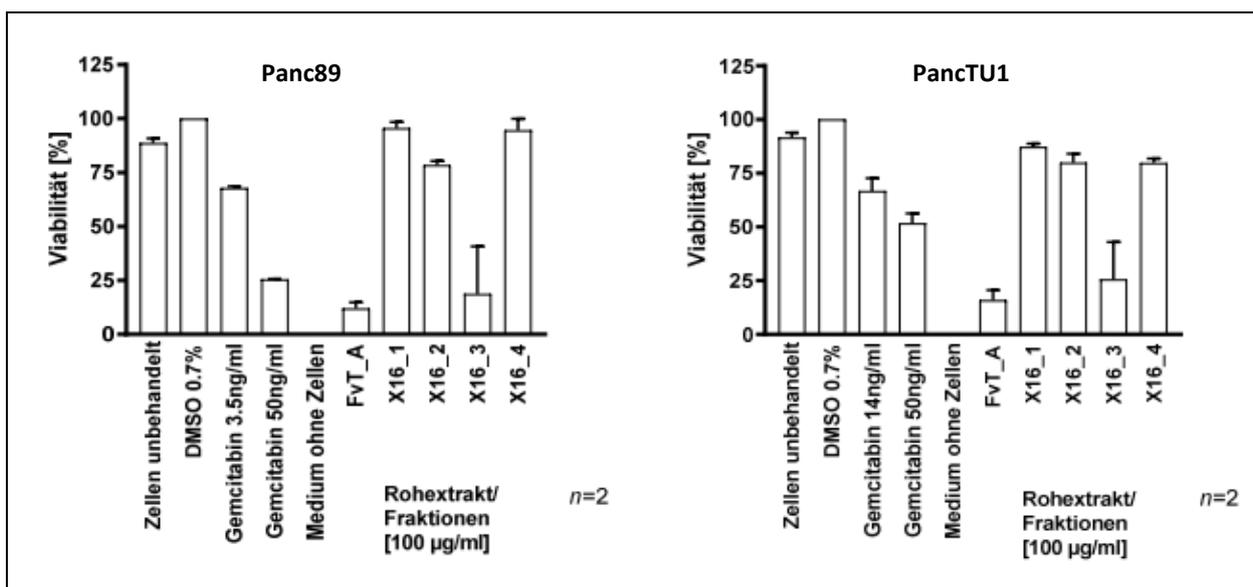


Abbildung 3.6: Aktivitäten der durch Grobfractionierung an Amberlite® XAD16 erhaltenen Fraktionen im Vergleich zum Rohextrakt FvT_A. Die Fraktionen und der Rohextrakt wurden einheitlich mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im XTT-Viabilitäts-Assay auf Panc89 und PancTU1-Zellen getestet. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD zweier unabhängiger Experimente ($n = 2$).

Die ^1H -NMR-Spektren der Fraktionen zeigten Auffälligkeiten in den Bereichen um 6 ppm und um 9 ppm (Abb. 3.7). Die im XTT-Assay aktive Fraktion X16_3 zeigte in diesen Bereichen prägnant ausgeprägte Peaks, während die inaktiven Fraktionen X16_1, 2 und 4 dort nur gering ausgeprägte bzw. keine Peaks aufwiesen. Die in X16_3 vorhandenen Peaks bei 6 und 9 ppm sind vergleichbar mit denen des Rohextraktes FvT_A (Abb. 3.4). Im Bereich von 0 - 4,5 ppm zeigten die ^1H -NMR-Spektren zunächst keine auswertbaren Auffälligkeiten (Anhang 2, Abb. A.1).

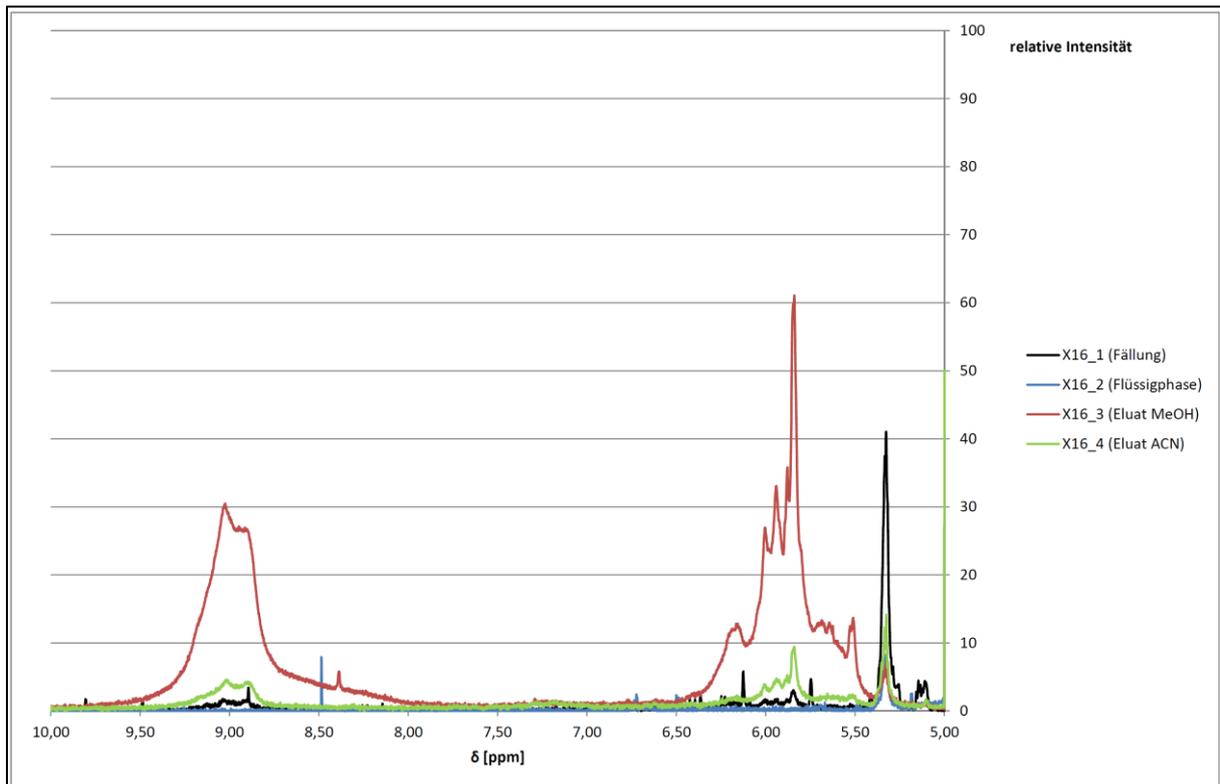


Abbildung 3.7: Ausschnitt 1 der ^1H -NMR-Spektren der Fraktionen der XAD16-Festphasenextraktion. Die Fraktionen wurden in jeweils gleicher Konzentration mit $c = 10 \text{ mg/ml}$ in $\text{DMSO D}_6 + \text{TMS}$ gemessen. Die im XTT-Assay aktive Fraktion X16_3 zeigte prägnant ausgeprägte Peaks in den Bereichen um 6 ppm und um 9 ppm, die in den inaktiven Fraktionen X16_1, 2 und 4 in der Form nicht vorhanden waren. Diese in X16_3 vorhandenen Peaks sind vergleichbar mit denen des Rohextraktes FvT_A (Abb. 3.4).

3.2.2 Bindungsstudie: Fraktionierung an verschiedenen Chromatographie-Materialien

Aufgrund der Komplexität des Rohextraktes FvT_A und der groben Fraktion X16_3, erkennbar an den zahlreichen und teilweise breiten Peaks im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 3.4 und Abb. 3.7), wurde vermutet, dass mehrere hintereinandergeschaltete und prinzipiell unterschiedliche Trennverfahren notwendig sind, um zu einem genügend reinen Wirkstoff zu gelangen (Abb. 3.8).

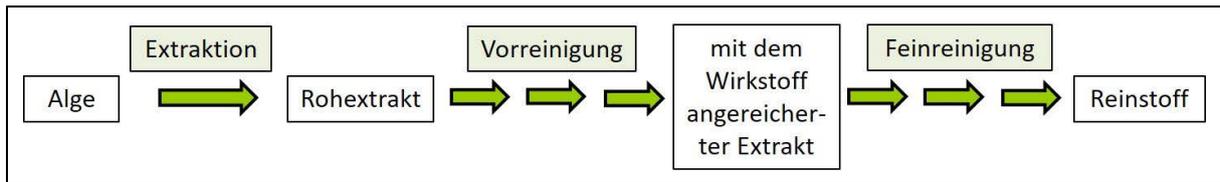


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung eines Aufreinigungsschemas bestehend aus mehreren Prozessschritten.

Daher wurde eine breit angelegte Bindungsstudie unter Einsatz vieler verschiedener Chromatographie-Materialien und Trennprinzipien (Tabelle 2.2, Abb. 2.10 und Kapitel 2.10.2) durchgeführt, mit deren Hilfe Informationen zu geeigneten Trennverfahren und der Reihenfolge ihrer Anwendung gewonnen werden sollten. Insgesamt wurden 17 Experimente mit jeweils 45 mg des Rohextraktes FvT_A durchgeführt, alle im kleinen Maßstab als Festphasenextraktionen (SPE). Jeweils der Durchlauf bzw. der Überstand und ein bis zwei Eluate wurden als Fraktionen für die spätere Testung gesammelt.

Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht der erhaltenen Fraktionen und deren Trockengewichte. Die mit * gekennzeichneten Fraktionen sind zusätzlich, mit dem Ziel der Aufkonzentration der polaren bzw. partiell polaren Wirkstoffe, auf einer Sep-Pak® C18-Kartusche unter Elution mit ACN nachbearbeitet worden. (Dieser Schritt wurde anhand der Ergebnisse der Grobfractionierung (Kap. 3.2.1) und eines hier nicht dargestellten Vorversuchs an C18-Material abgeleitet). Bei allen Fraktionierungsexperimenten war ein erheblicher Masseverlust zu verzeichnen, der bis zu 65 % bis 95 % der jeweils eingesetzten Trockenmasse umfasste. Folglich muss bei den getesteten Bedingungen ein Großteil des Extraktmaterials an den verschiedenen Chromatographiematerialien (Sorbentien) oder der Sep-Pak® C18-Kartusche adsorbiert haben und ist unter den eingesetzten Bedingungen nicht eluiert worden. Da alle Fraktionen, die mit der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden waren, vergleichbar geringe Trockengewichte aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass ein erheblicher Teil des Extraktmaterials an dieser Kartusche hängen geblieben ist.

Tabelle 3.6: Übersicht der Fraktionen, die im Rahmen der Bindungsstudie erhalten wurden. Je Experiment (= je Sorbens) wurden 45 mg des Rohextraktes FvT_A, gelöst in einer wässrigen DMSO-Verdünnung (1:10), eingesetzt. Die mit * gekennzeichneten Fraktionen sind zusätzlich auf einer Sep-Pak® C18-Kartusche unter Elution mit ACN nachbearbeitet worden.

Trennprinzip	Sorbens	Bindungspuffer	Elutionspuffer	Beschreibung der Fraktion	Bezeichnung der Fraktion	TG [mg] (ggf. nach *)	
AC	Heparin-Sepharose	50 mM Tris, pH 7,0	-	Durchlauf*	HS_1	1,04	
			20 mM PO ₄ , 2 M NaCl, pH 7,0	1. Eluat*	HS_2	1,35	
			-	Überstand*	BS_1	1,54	
	Blue-Sepharose	10 mM PO ₄ , pH 7,0	10 mM PO ₄ , 2 M NaCl, pH 5,0	Eluat*	BS_2	1,64	
			-	Überstand*	NT_1	1,21	
	Ni-Talon-Chelat-Sepharose	20 mM PO ₄ , 50 mM Imidazol, pH 7,0	20 mM PO ₄ , 2 M Imidazol, pH 7,0	Eluat*	NT_2	1,5	
			-	Überstand*	KA_1	1,36	
	IEX	Kationentauscher (SCX) Macro-Prep High S	5 mM PO ₄ , pH 4,0	30 mM PO ₄ , 1 M NaCl, pH 3,0	Eluat*	KA_2	0,91
				-	Überstand*	AAst_1	1,44
Anionentauscher (QCX) stark Q-Sepharose		5 mM PO ₄ , pH 8,5	15 mM PO ₄ , 1,5 M NaCl, pH 9,5	Eluat*	AAst_2	1,01	
			-	Überstand*	AAsw_1	1,28	
Anionentauscher (QCX) schwach DEAE-Sepharose		5 mM PO ₄ , pH 8,5	30 mM PO ₄ , 1,5 M NaCl, pH 9,5	Eluat*	AAsw_2	1,1	
			-	Überstand*	Si_1	1,4	
NP	SiO ₂	5mM PO ₄ , pH 4,0	EtOAc	1. Eluat	Si_2	1,2	
			MeOH	2. Eluat	Si_3	7,55	
			-	Überstand*	Aln_1	1,42	
	Al ₂ O ₃ neutral	H ₂ O bidest.	EtOAc	1. Eluat	Aln_2	2,24	
			MeOH	2. Eluat	Aln_3	0,85	
			-	Überstand*	Alb_1	1,27	
	Al ₂ O ₃ basisch	H ₂ O bidest.	EtOAc	1. Eluat	Alb_2	3,77	
			MeOH	2. Eluat	Alb_3	1,18	
			-	Überstand*	C4_1	1,31	
RP	C4-RP MultoHigh® Bio	H ₂ O bidest.	MeOH	1. Eluat	C4_2	9,97	
			ACN	2. Eluat	C4_3	1,75	
			-	Durchlauf*	C8CB_1	1,09	
	C8-RP Chroma	H ₂ O bidest.	MeOH	1. Eluat	C8CB_2	1,85	
			ACN	2. Eluat	C8CB_3	1,52	
			-	Überstand*	C8P_1	1,48	
	C8-RP Polygo	H ₂ O bidest.	MeOH	1. Eluat	C8P_2	5,08	
			ACN	2. Eluat	C8P_3	1,51	
			-	Überstand*	C12P_1	1,23	
	C12-RP Polygo	H ₂ O bidest.	MeOH	1. Eluat	C12P_2	10,61	
			ACN	2. Eluat	C12P_3	2,12	
			-	Überstand*	C18P_1	1,41	
	C18-RP Polygo	H ₂ O bidest.	MeOH	1. Eluat	C18P_2	5,38	

			ACN	2. Eluat	C18P_3	1,18
	Phenyl-RP Chroma	H ₂ O bidest.	-	Durchlauf*	Ph_1	1,3
			MeOH	1. Eluat	Ph_2	7,4
			ACN	2. Eluat	Ph_3	2,01
RP-ähnlich	XAD1180	H ₂ O bidest.	-	Überstand*	X1180_1	1,64
			ACN	Eluat	X1180_2	9,8
	XAD7HP	H ₂ O bidest.	-	Überstand*	X7HP_1	1,33
			ACN	Eluat	X7HP_2	14,55

Trotz der Beobachtung des Masseverlusts wurde die anschließende Testung der Fraktionen im Viabilitäts-Assay standardmäßig durchgeführt. Alle Fraktionen wurden für die Testung mit DMSO auf eine einheitliche Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$, entsprechend der Konzentration, bei der der Rohextrakt deutliche Aktivität zeigte, eingestellt. Da die Fraktionen jedoch vor der Testung im Standard-Assay vom Projektpartner Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp für die Durchführung anderer Testreihen mit DMSO auf jeweils 10 mg/ml eingestellt worden sind, konnte der bisher im Standard-Assay verwendete finale DMSO-Gehalt von $0,7 \%$ nicht eingehalten werden. Stattdessen musste mit einem finalen DMSO-Gehalt von 1% gearbeitet werden. Die Mitführung einer Kontrolle mit normalem Kulturmedium („Zellen unbehandelt“) zeigte, dass sich 1% DMSO im Medium zu einem spürbaren Anteil Viabilitäts-inhibierend auf die Zellen auswirkte (Abb. 3.9 und 3.10). Da es sich bei der Testung aber nur um eine grobe Untersuchung hinsichtlich des Vorhanden- oder Nichtvorhandenseins von Aktivitäten handelte, und nicht um eine genaue Quantifizierung der Aktivitäten, wurde die teilweise Zellschädigung durch das 1% -ige DMSO in Kauf genommen.

Die Viabilitäts-inhibierende Aktivität des Rohextraktes wurde in mehreren Fraktionen wieder aufgefunden, und die Ergebnisse waren bei beiden Zelllinien ähnlich (Abb 3.9 und 3.10 und folgende Beschreibungen). Anhand des Vergleichs der ermittelten Aktivitäten und Inaktivitäten mit den eluierten Massen der Fraktionen (Tabelle 3.7 und Anhang 3, Tabelle A.2) wurde abgeleitet, welche Trennverfahren sich zur Anreicherung der Wirkstoffe und welche sich zur Abreicherung von inaktivem Material eignen würden:

Starke Aktivitäten wurden in den ACN-Eluats-Fraktionen der RP-ähnlichen Chromatographien an XAD7HP und XAD1180 sowie in den MeOH-Eluats-Fraktionen der Phenyl-RP und der C18-RP (Polygo) aufgefunden. Von XAD7HP und XAD1180 wurden gleichzeitig gut Massen eluiert, bei Phenyl-RP und C18-RP Polygo fiel die Masseelution geringer aus. (Alle diese Fraktionen sind nicht mit der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden.) Insgesamt zeigte XAD7HP unter den getesteten RP-ähnlichen Bedingungen unter Einsatz von ACN als Elutionsmittel die besten Eigenschaften zur Bindung und Eluierbarkeit der Wirkstoffe. Daher wurde dieses Trennverfahren als erster Feinreinigungsschritt für das zu etablierende Aufreinigungsschema ausgewählt.

In den Eluats-Fractionen der NP-Chromatographien an SiO_2 und Al_2O_3 wurden nur geringe bzw. keine zytotoxischen Aktivitäten aufgefunden. (Diese Fractionen sind nicht mit der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden.) Von SiO_2 wurde mittels MeOH (Fraction Si_3) aber eine beträchtliche Masse eluiert, die unter sauren Bedingungen (pH 4,0) an das Material gebunden hatte. Durch NP-Chromatographie an SiO_2 ließ sich der Extrakt demnach von inaktivem Material abreichern. Die NP-Chromatographie an SiO_2 wurde daher als Vorreinigungsschritt für das Aufreinigungsschema ausgewählt.

Mittlere Aktivitäten wurden in den MeOH- und ACN-Eluats-Fractionen der RP-Chromatographien an C4, C8 (Polygo) und C12 (Polygo) aufgefunden. Von C4 und C12 (Polygo) wurden mittels MeOH auch gleichzeitig gut Massen eluiert. Von C8 (Polygo) fiel die Masseelution mittels MeOH geringer aus (vergleichbar mit der Masseelution von C18 (Polygo)). (Alle diese Fractionen sind nicht mit der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden.) Da die Wirkstoffe an die getesteten C-Materialien banden und von diesen auch wieder eluiert werden konnten, würde sich eine RP-Chromatographie als abschließender Feinreinigungsschritt im Aufreinigungsschema anbieten. Irritierend waren jedoch, wie erwähnt, die geringe Masseelution und der fehlende Nachweis von Aktivitäten bei allen Fractionen, die mittels Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden waren. Daher empfehlen sich vor der Aufnahme eines RP-Verfahrens als abschließender Feinreinigungsschritt weitere Experimente zur Aufklärung und Optimierung des Bindungs- und Elutionsverhaltens der Wirkstoffe unter RP-Bedingungen.

Da bei den Ionenaustausch- und Affinitäts-Chromatographien sowohl die Überstands- als auch die Eluatsfractionen mittels der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden waren, konnten für diese Verfahren keine Aussagen über das Trennverhalten der Wirkstoffe getroffen werden. Diese Verfahren wurden für die Formulierung des Aufreinigungsschemas daher nicht weiter berücksichtigt.

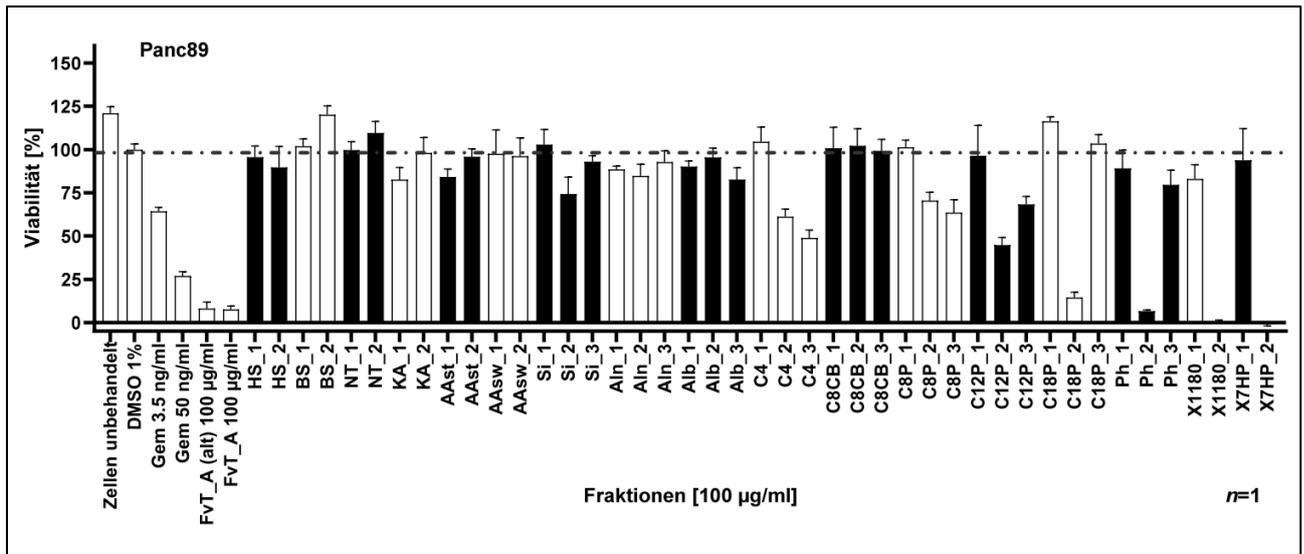


Abbildung 3.9: Aktivitäten der in der Bindungsstudie erhaltenen Fraktionen gegenüber Panc89-Zellen. Die Fraktionen wurden einheitlich mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im XTT-Viabilitäts-Assay getestet. Der Rohextrakt FvT_A mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ und Gemcitabin wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Der Effekt des Lösungsmittels (1% DMSO) wurde durch eine Kontrolle mit Medium (unbehandelte Zellen) überprüft. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (1% DMSO) und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$).

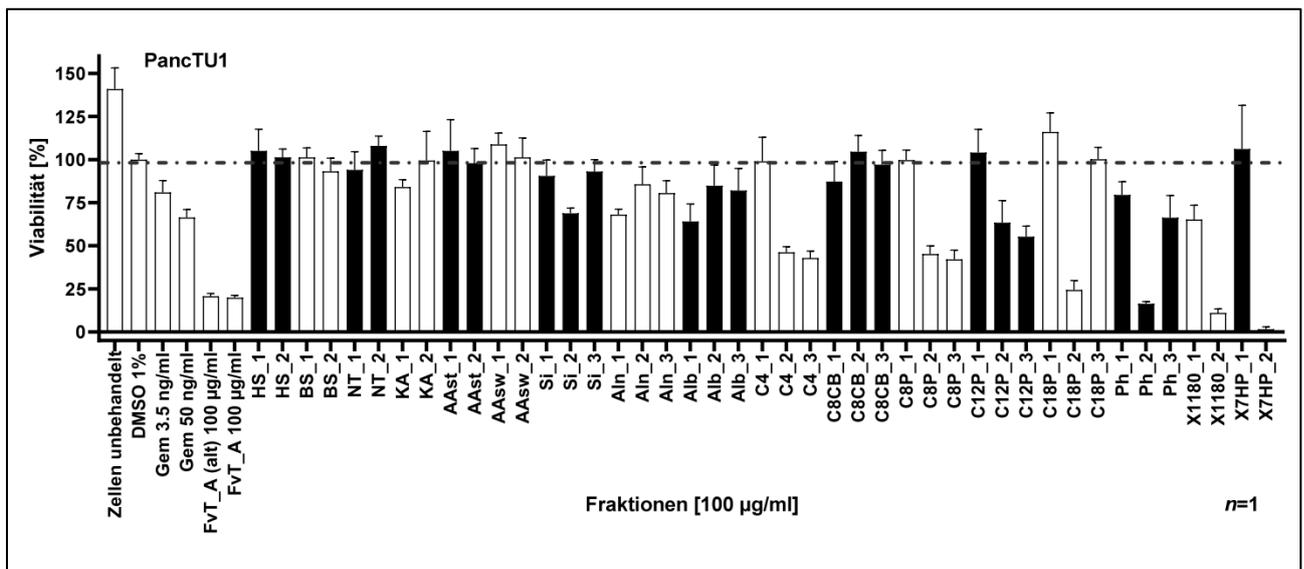


Abbildung 3.10: Aktivitäten der in der Bindungsstudie erhaltenen Fraktionen gegenüber PancTU1-Zellen. Die Fraktionen wurden einheitlich mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im XTT-Viabilitäts-Assay getestet. Der Rohextrakt FvT_A mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ und Gemcitabin wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Der Effekt des Lösungsmittels (1% DMSO) wurde durch eine Kontrolle mit Medium (unbehandelte Zellen) überprüft. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (1% DMSO) und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$).

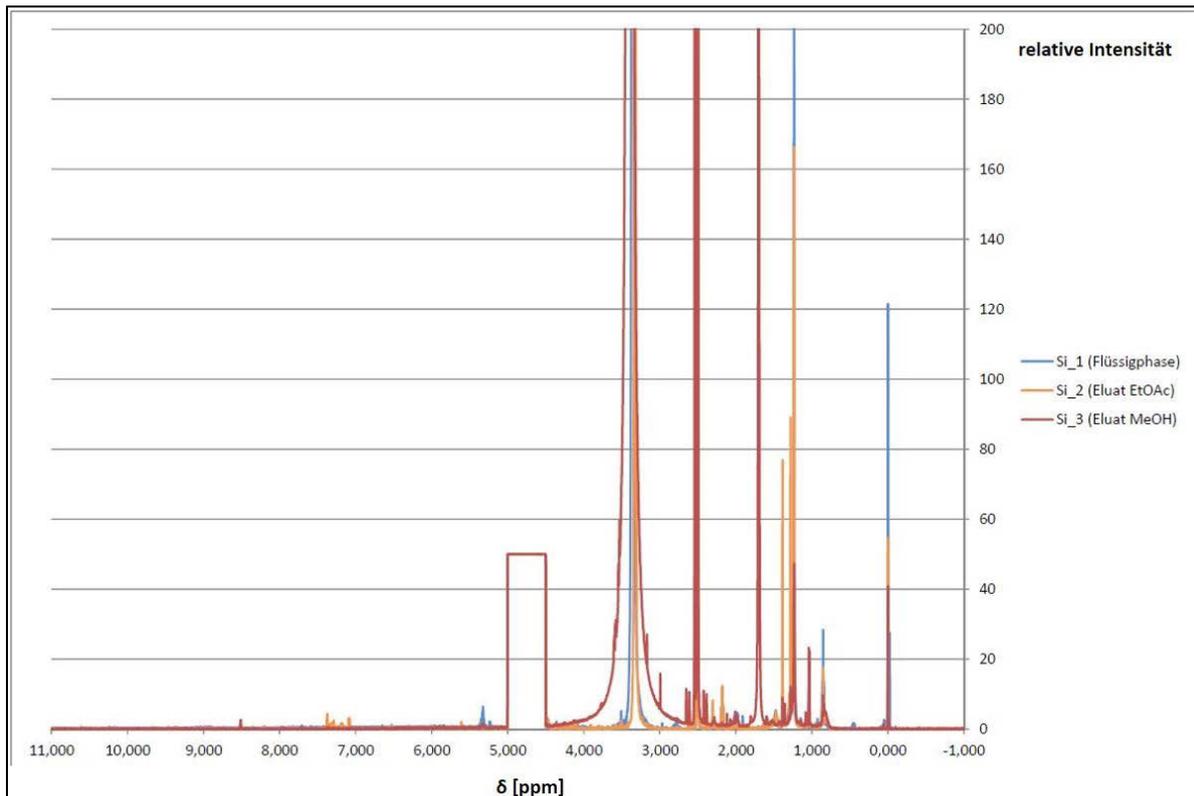


Abbildung 3.11: ^1H -NMR-Spektren der SiO_2 -Fraktionen der Bindungsstudie. Diese Fraktionen zeigten im XTT-Assay nur sehr geringe bzw. keine Aktivität. Die hier sichtbaren Peaks im Bereich < 4 ppm bilden folglich inaktive Extraktinhaltsstoffe ab.

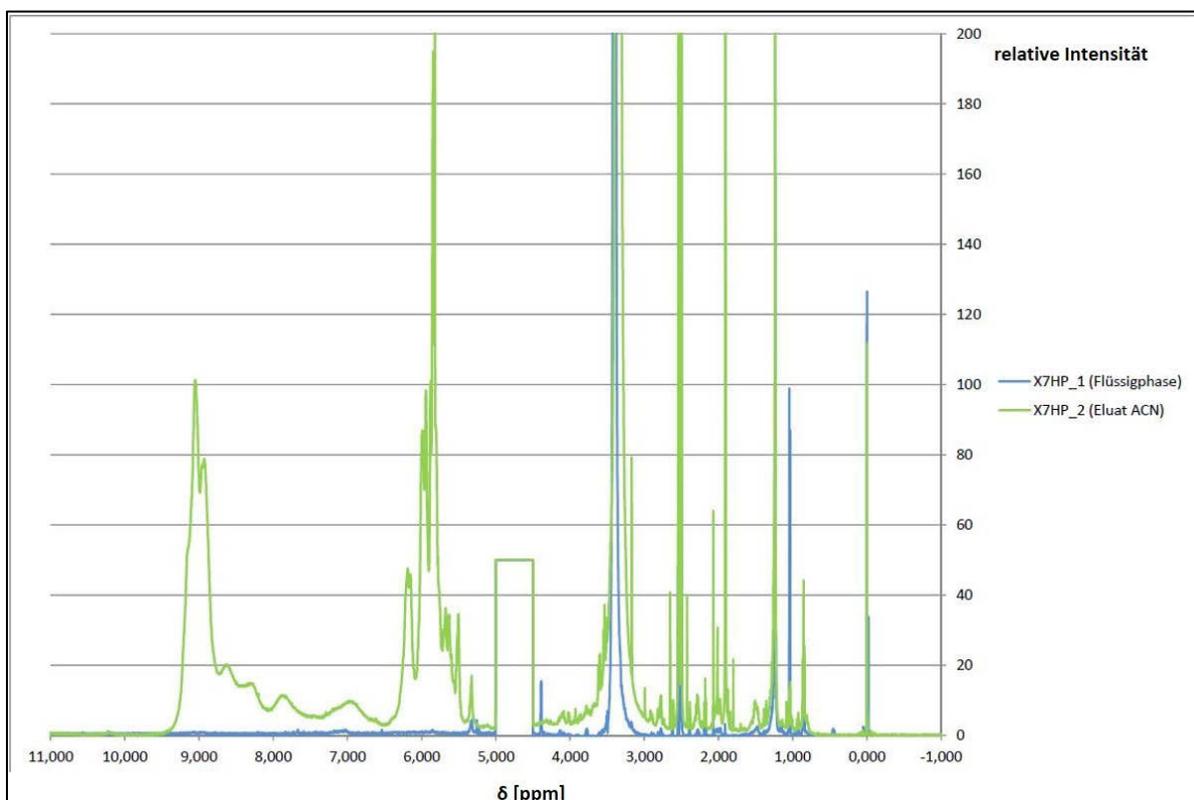


Abbildung 3.12: ^1H -NMR-Spektren der XAD7HP-Fraktionen der Bindungsstudie. Die Fraktion X7HP_2 (acetonisches Eluat) zeigte im XTT-Assay eine deutliche Aktivität, die Fraktion X7HP_1 (Überstandsfraction) zeigte dagegen keine Aktivität. Auffällige Unterschiede im ^1H -NMR-Spektrum sind die ausgeprägten Peaks bei 6 und 9 ppm in der aktiven Fraktion, welche in der inaktiven Fraktion fehlen.

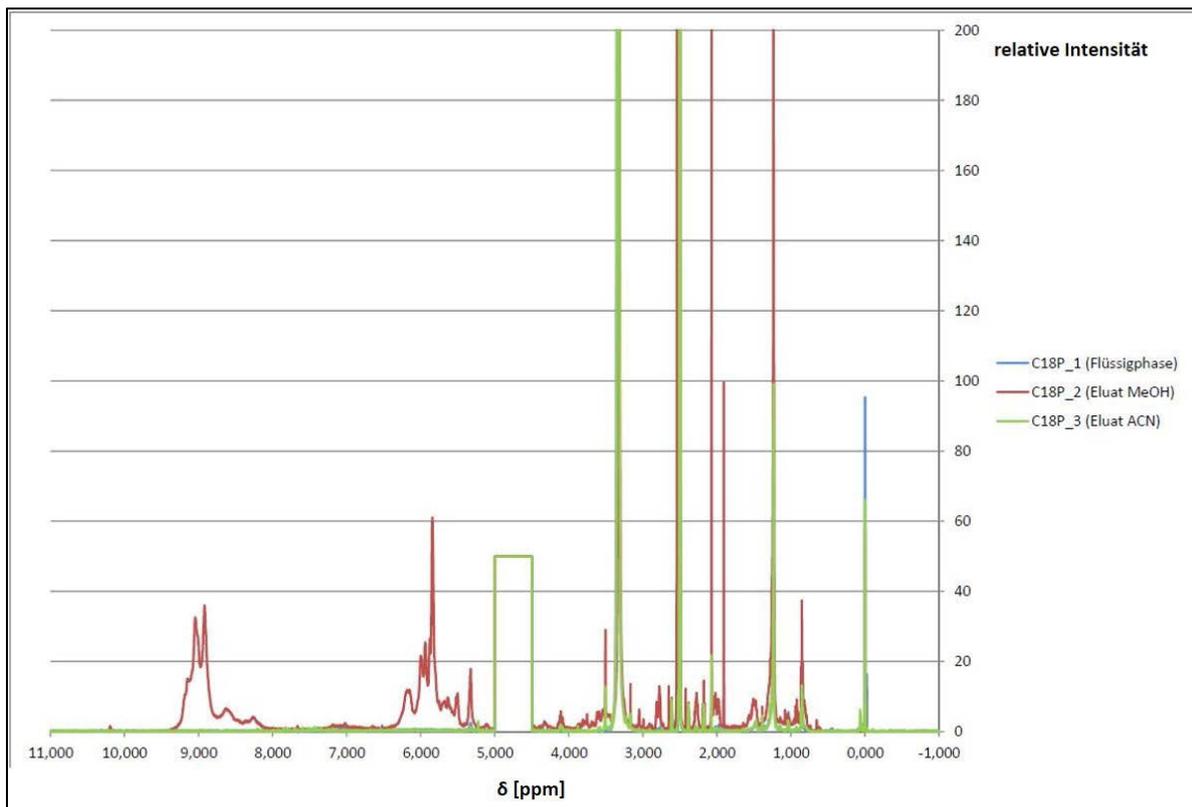


Abbildung 3.13: ^1H -NMR-Spektren der C18 (Polygo)-Fraktionen der Bindungsstudie. Die Fraktion C18P_2 (methanolisches Eluat) zeigte im XTT-Assay eine deutliche Aktivität, die Fraktion C18P_1 (Überstandsfraction) dagegen keine. Auffällige Unterschiede im ^1H -NMR-Spektrum sind die Peaks bei 6 und 9 ppm in der aktiven Fraktion, welche in der inaktiven Fraktion fehlen. Diese mit der Aktivität korrelierenden Peaks sind vergleichbar mit den Peaks bei 6 und 9 ppm der Fraktion X7HP_2, sie sind jedoch in der Fraktion C18P_2 entsprechend der festgestellten geringeren Masseelution weniger stark ausgeprägt.

3.2.3 Formulierung und Etablierung des Aufreinigungsschemas

Mittels der Erkenntnisse, die bei der Grobfractionierung (Kapitel 3.2.1) und der Bindungsstudie (Kapitel 3.2.2) gewonnen wurden, wurde das folgende Aufreinigungsschema für die Viabilitäts-inhibierenden Wirkstoffe aus FvT_A formuliert und etabliert (siehe hierzu auch Abb. 3.14 (Gesamtschema) und Kapitel 2.10.3 (detaillierte Methodenbeschreibung)):

- Vorreinigung 1 zur Abreicherung inaktiven Materials: Fällung von lipophilen Substanzen durch Verdünnen des Rohextraktes 1:10 mit H_2O + 0,1 % AcOH, 12 h Verweildauer bei 4 °C, Zentrifugation, der Überstand ist Auftragsmaterial für Schritt 2.
- Vorreinigung 2 zur weiteren Abreicherung inaktiven Materials: Normalphase-HPLC an einer Pharmprep60CC SiO_2 -Säule (250 mm * 21 mm, Flussrate 5 ml/min), Sammeln des Durchlaufs von 7 - 64 min (gesamt 285 ml), der die aktiven Substanzen enthält und das Auftragsmaterial für Schritt 3 ist.
- Feinreinigung 1 zur Isolierung der aktiven Substanzen: Umkehrphase-ähnliche HPLC an einer Amberlite® XAD7HP-Säule (250 mm * 21 mm, Flussrate 5 ml/min) und Gradientenelution

mittels A: H₂O + 0,1 % AcOH, B: ACN + 0,1 % AcOH und I: 0 % B bis 50 % B in 60 min, II: 50 % B bis 100 % B in 30 min, isokrat für 12 min, III: 100 % B bis 0 % B in 4 min, isokrat für 50 min, Sammeln der Fraktionen alle 208 s (je 9 ml) von 6 - 126 min.

Pro Trennlauf wurden 2 g Rohextrakt, gelöst in 20 ml DMSO, eingesetzt. Dies war, als Ergebnis eines hier nichtgezeigten Vorversuches zur Beladungskapazität, das maximale Fassungsvermögen der SiO₂-Säule. Am Ende der Trennung wurden 67 Fraktionen mit einem einheitlichen Volumen von 9 ml erhalten, die die verbliebenen Extraktinhaltsstoffe aufgetrennt von hydrophil nach hydrophob enthielten. Die Fraktionen wiesen entsprechend der unterschiedlichen Löslichkeiten der isolierten Algenpigmente ein charakteristisches Farbmuster auf (Abb. 3.15).

Das Elutionsprofil der abschließenden RP-ähnlichen Chromatographie zeigte bei einer Wellenlänge von 280 nm zwei ausgeprägte UV-Absorptions-Peaks, die sich jeweils über mehrere Fraktionen erstreckten und nicht Basislinien-getrennt waren (Abb. 3.16): Peak 1 lag im hydrophilen Bereich um Fraktion 16, welche bei 72,5 % H₂O/ 27,5 % ACN eluierte (Beginn bei Fraktion 9, Ende bei Fraktion 23), Peak 2 im eher hydrophoben Bereich um Fraktion 36, welche bei 35 % H₂O/ 65 % ACN eluierte (Beginn bei Fraktion 25, Ende bei Fraktion 48).

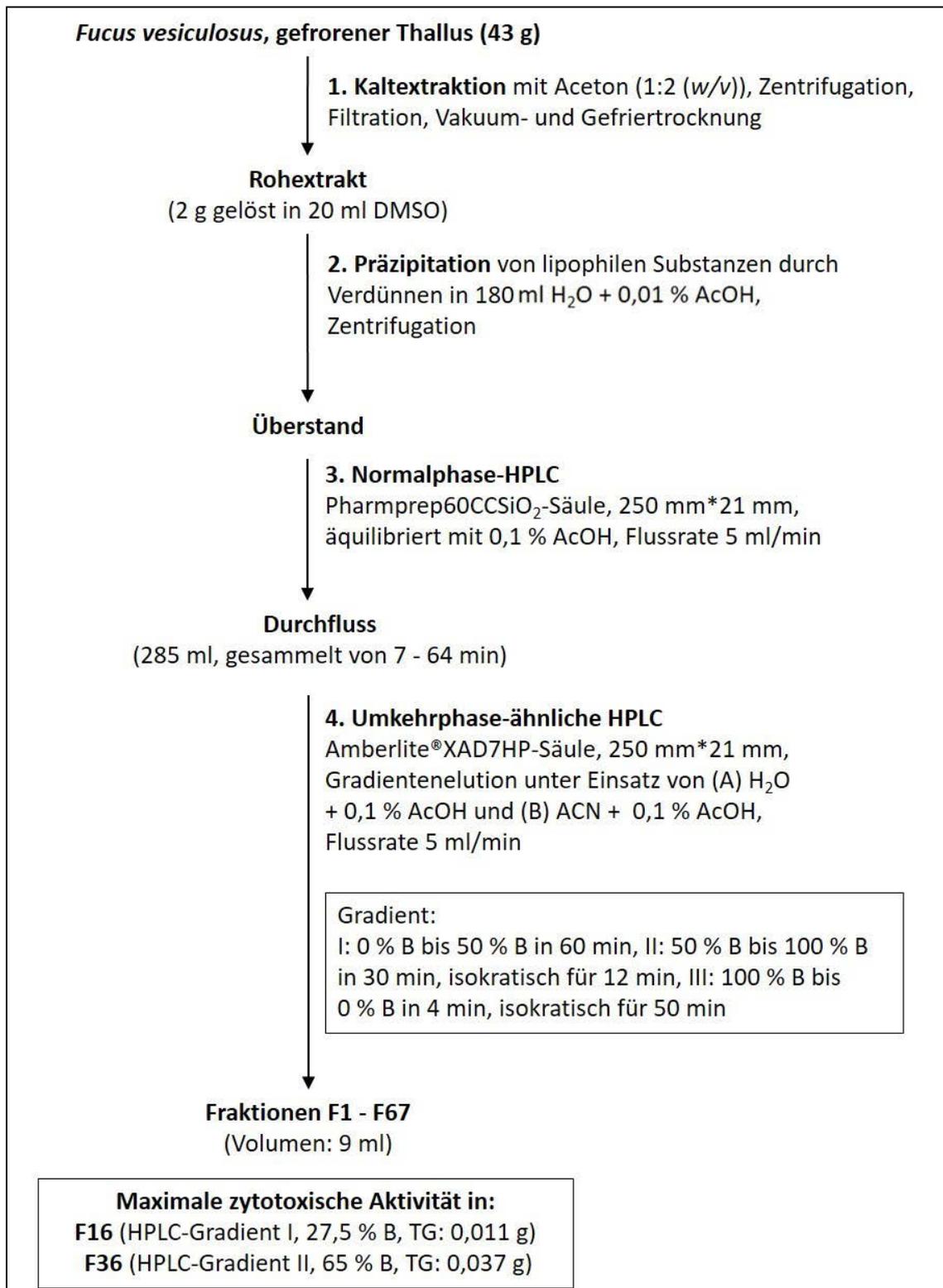


Abbildung 3.14: Etabliertes mehrstufiges Aufreinigungsschema für die Viabilitäts-inhibierenden Wirkstoffe gegenüber den Pankreas-Krebszelllinien Panc89 und PancTU1 aus der Ostseealge *F. vesiculosus*.



Abbildung 3.15: Charakteristisches Farbmuster der XAD7HP-Elutionsfraktionen im Original-Eluenten am Ende der Fraktionierung von FvT_A. Fraktion 1: oben links, nachfolgende Fraktionen sind aufgereiht in senkrechten Zickzacklinien. Foto: Karsten Hofmann-Peiker, Planton GmbH.

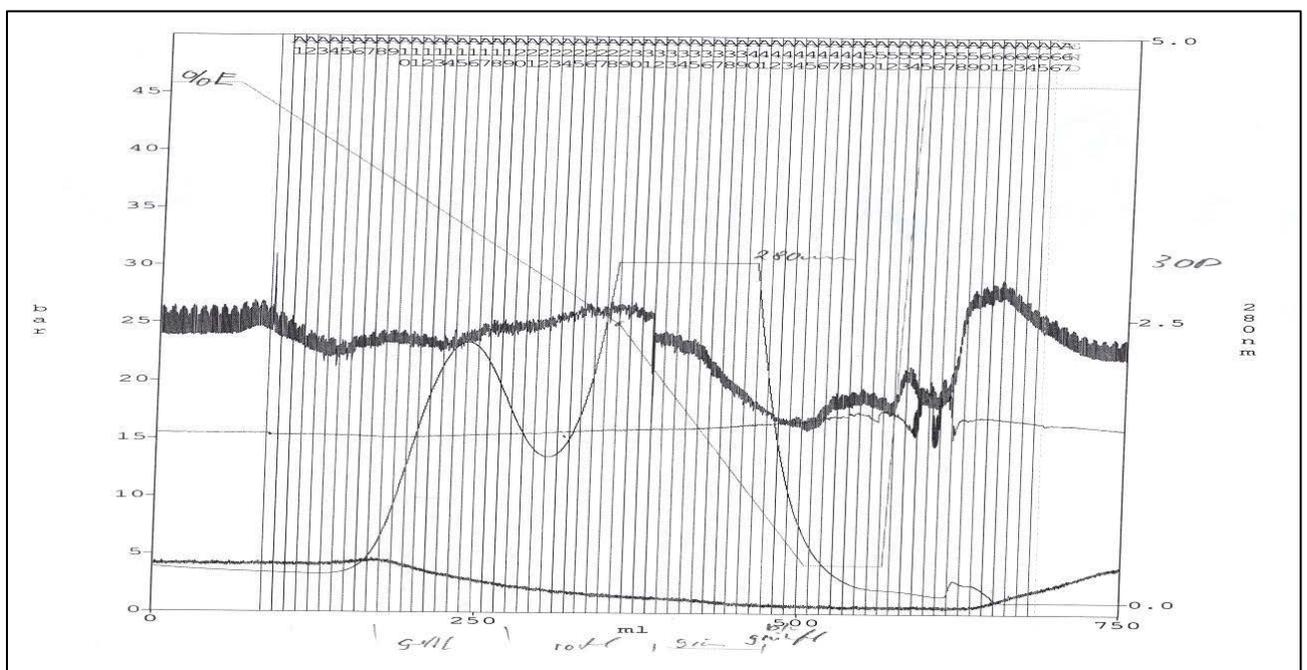


Abbildung 3.16: Elutionsprofil der RP-ähnlicher Chromatographie an Amberlite® XAD7HP zur Feinreinigung von FvT_A. Im Profil sind jeder Fraktion Elutionsvolumen, Gradient, UV-Absorption bei 280 nm und Säulendruck zugeordnet. Das UV-Profil zeigt zwei ausgeprägte Peaks, die sich jeweils über mehrere Fraktionen erstrecken: der erste liegt um Fraktion 16, der zweite um Fraktion 36. Peak 2 ist deutlich größer als der erste und eluiert im eher hydrophoben Bereich. Die beiden Peaks sind nicht Basislinien-getrennt.

Nach Trocknung, Trockengewichtsbestimmung und Rücklösung der Fraktionen im jeweils gleichen Volumen DMSO D6 (400 µl), wurde jede zweite bzw. jede fünfte Fraktion im Standard-Viabilitäts-Assay auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber Panc89 und PancTU1-Zellen getestet. Um die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen miteinander vergleichen und um ermitteln zu können, wann die aktiven Stoffe von der XAD7HP-Säule eluieren, wurden die Fraktionen in einheitlichen Verdünnungs-

stufen getestet: Zunächst wurde das von den Zellen gut verträgliche Fraktionsvolumen von 0,7 % im Medium im Assay getestet. Außerdem wurden von dieser Maximalmenge eine 1:3 und eine 1:9-Verdünnung in DMSO, demzufolge ein Fraktionsvolumen von 0,233 % bzw. 0,078 % im Medium getestet. Da die Fraktionen bei der XAD7HP-Trennung in enger zeitlicher Abfolge gesammelt worden sind, reichte es aus, nur jede zweite Fraktion zu testen, um einen Überblick über die Verteilung der Bioaktivität auf die Fraktionen zu bekommen.

Als Ergebnis wurden zwei Aktivitäts-Peaks gefunden (Abb. 3.17 und 3.18): Peak 1 lag um Fraktion F16, Peak 2 um Fraktion F36. Peak 1 war etwas schwächer und schmaler als Peak 2. Die Aktivitäts-Peaks waren bei beiden Zelllinien vergleichbar und korrelierten mit den oben beschriebenen UV-Peaks (280 nm).

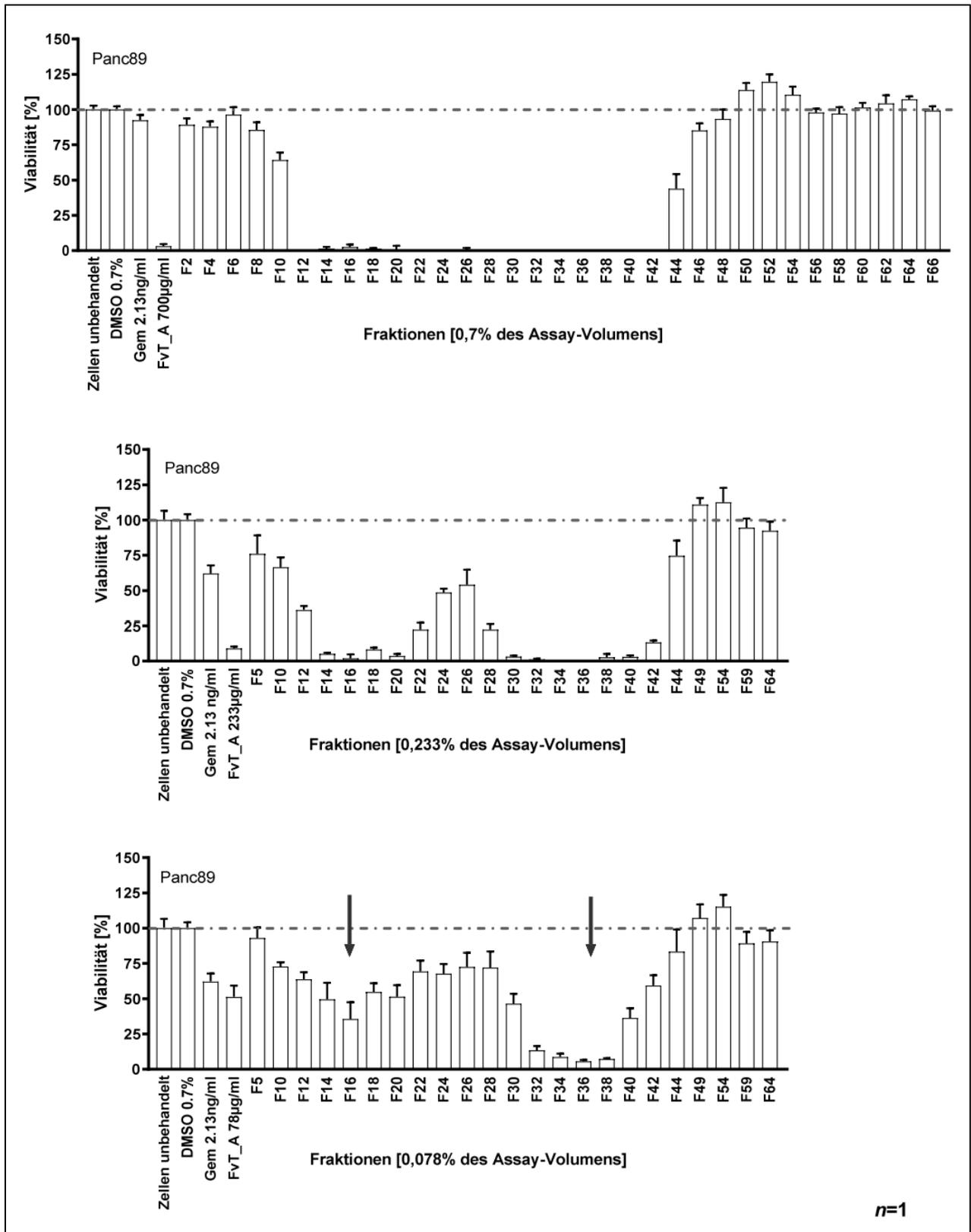


Abbildung 3.17: Aktivitäten der durch das mehrstufige Aufreinigungsschema erhaltenen Fraktionen gegenüber Panc89-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Es wurden zwei Aktivitäts-Peaks aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F16, Peak 2 um Fraktion F36 (Pfeile). Jede zweite bzw. jede fünfte Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in drei unterschiedlichen Verdünnungen und in jeder Verdünnungsstufe mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin (Gem 2,13 ng/ml, ungefährender IC_{50} -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$).

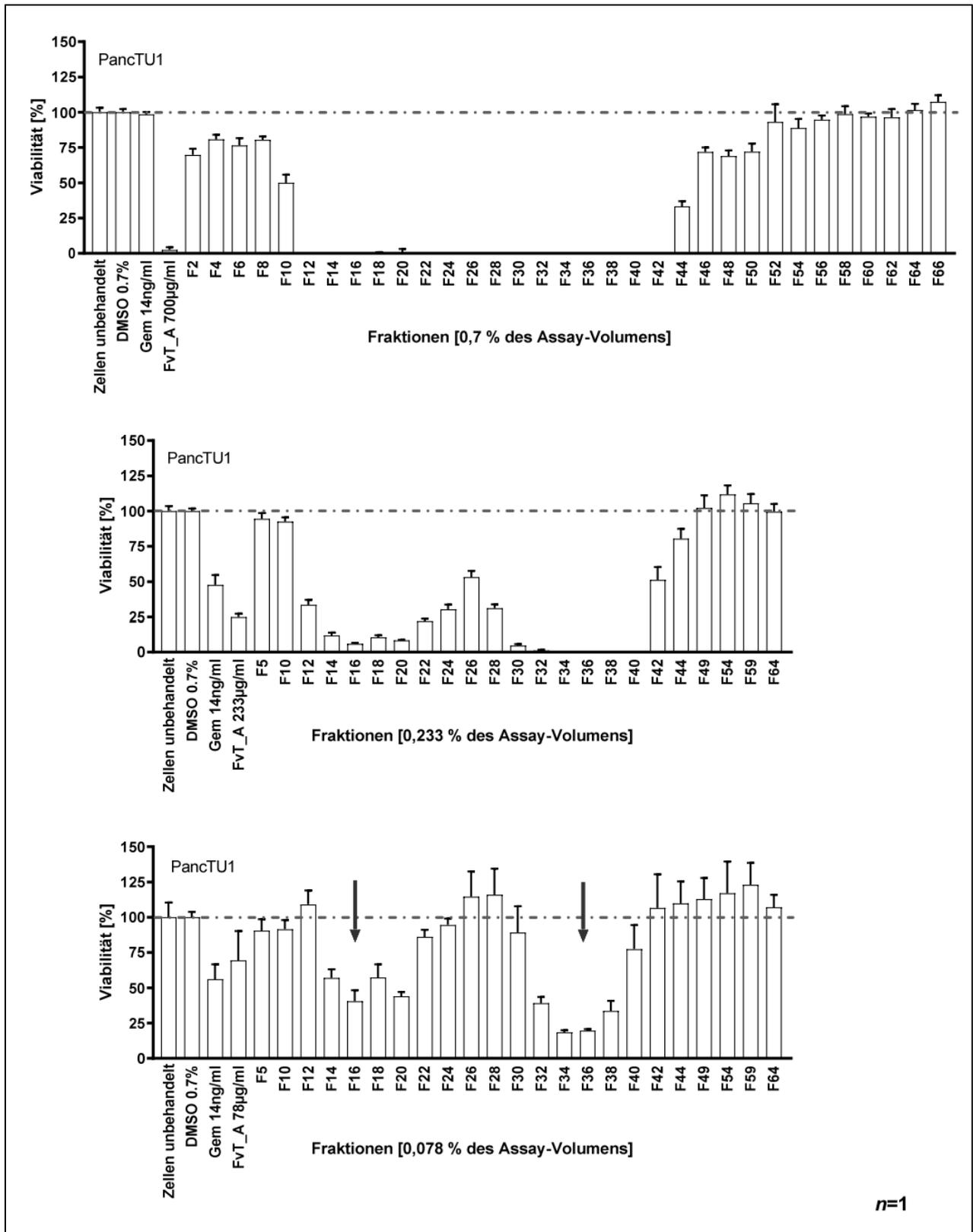


Abbildung 3.18 Aktivitäten der durch das mehrstufige Aufreinigungsschema erhaltenen Fraktionen gegenüber PancTU1-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Es wurden zwei Aktivitäts-Peaks aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F16, Peak 2 um Fraktion F36 (Pfeile). Jede zweite bzw. jede fünfte Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in drei unterschiedlichen Verdünnungen und in jeder Verdünnungsstufe mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin (Gem 14 ng/ml, ungefährender IC_{50} -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$).

3.2.4 Charakterisierung des Aufreinigungserfolgs

Von den Fraktionen der beiden Aktivitäts-Peaks, F16 und F36, sowie von den Nachbarfraktionen F15 und F37 wurden serielle Verdünnungen angefertigt, die im Standard-Viabilitäts-Assay für die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven getestet wurden (Abb. 3.19). Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt (Tabelle 3.8). Der Vergleich der IC_{50} -Werte der Fraktionen mit dem IC_{50} -Wert des Rohextraktes FvT_A offenbarte für die Fraktionen des ersten Aktivitäts-Peaks, F16 und F15, eine Steigerung der Viabilitäts-inhibierenden Aktivität aufgrund des etablierten Aufreinigungsschemas. So war der IC_{50} -Wert von FvT_A zu F16 und F15 gegenüber Panc89 und PancTU1 um mehr als das Vierfache gesunken. Dieser deutliche Effekt wurde für die Fraktionen des zweiten Aktivitäts-Peaks, F36 und F37, nicht beobachtet. Es wurde nur gegenüber der Zelllinie Panc89 eine Reduktion des IC_{50} -Wertes beobachtet, die jedoch weniger stark ausfiel.

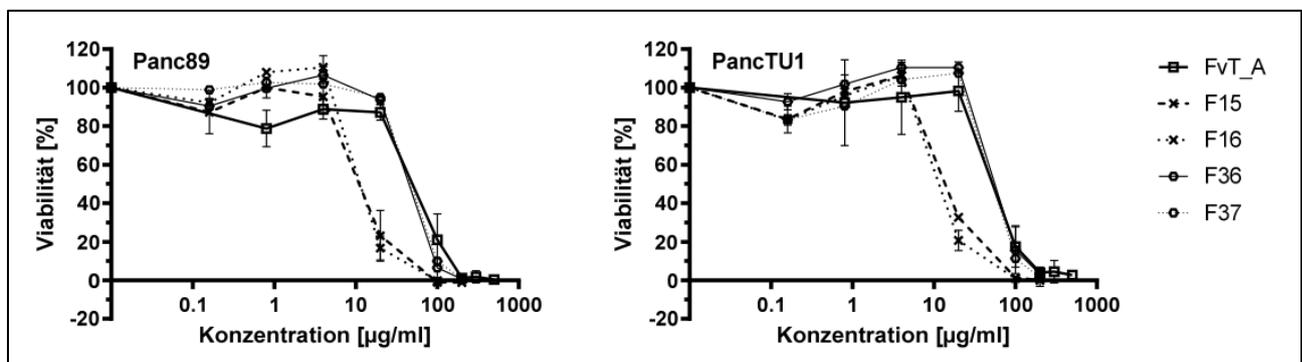


Abbildung 3.19: Dosis-Wirkungs-Kurven der Fraktionen F15 ($n = 3$), F16 ($n = 2$) und F36 ($n = 2$), F37 ($n = 1$) im Vergleich zum Rohextrakt FvT_A ($n = 3$) gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen. Die Kurven wurden durch Testung serieller Verdünnungen der Fraktionen und des Rohextraktes im Standard-Viabilitäts-Assay ermittelt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD der drei bzw. zwei unabhängigen Experimente bzw. der fünf technischen Replikate bei $n = 1$.

Tabelle 3.8: Gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen im Standard-Viabilitäts-Assay ermittelte IC_{50} -Werte der Fraktionen F15, F16 (Aktivitäts-Peak 1) sowie F36, F37 (Aktivitäts-Peak 2) im Vergleich zum Rohextrakt FvT_A. Die IC_{50} -Werte wurden auf Basis der erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 3.19) ermittelt.

Rohextrakt/ Fraktionen	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	
	Panc89	PancTU1
FvT_A	71,47 ($n = 3$)	76,96 ($n = 3$)
F15	15,23 ($n = 3$)	18,29 ($n = 3$)
F16	16,35 ($n = 2$)	16,92 ($n = 2$)
F36	45,72 ($n = 2$)	78,95 ($n = 2$)
F37	49,40 ($n = 1$)	81,10 ($n = 1$)

Der Aufreinigungserfolg wurde außerdem per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie überprüft, und es wurde nach einem charakteristischen Signalmuster gesucht, das mit der Aktivität korreliert. Durch Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aller Fraktionen und des Rohextraktes FvT_A vor dem Hintergrund der nach-

gewiesenen Aktivitätsverteilung im Viabilitäts-Assay wurden vier scharfe Signale (δ_H) ermittelt, die signifikant mit der Aktivität korrelierten und sowohl im Spektrum von F16 als auch von F15 (Aktivitäts-Peak 1) vorlagen (Abb. 3.20): 1) 8,99 ppm (s), 2) 7,89 ppm (s), 3) 6,64 ppm (s), 4) 5,83 ppm (s) ($p < 0,05$). Diese Signale, auch „charakteristischer Fingerabdruck“ genannt, waren im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Rohextrakt FvT_A noch verdeckt und traten zum Teil erst nach der Aufreinigung auf. Die hochaufgelösten Signale sind charakteristisch für den Aufreinigungserfolg und weisen auf eine gute Reinheit der Fraktionen F16 und F15 hin. Die Signale traten in einem Bereich auf, der typisch für die Verschiebung aromatisch gebundener Protonen ist.

Aufgrund ihrer deckungsgleichen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, ihrer ähnlichen IC_{50} -Werte gegenüber den Panc89- und PancTU1-Zellen und der bei der Fraktionierung erhaltenen ähnlichen Trockengewichte (Tabelle 3.9) wurden die Fraktionen F15 und F16 als äquivalent definiert und in nachfolgenden Versuchen zeitweise gepoolt eingesetzt. Die Poolfraktion F15/F16 wurde durch Vermischen jeweils gleicher Volumina von F15 und F16 gebildet. Die Konzentration der Poolfraktion wurde über den Mittelwert aus den Konzentrationen der Einzelfraktionen bestimmt:

$$c_{\text{F15/F16}} = \frac{c_{\text{F15}} + c_{\text{F16}}}{2} = \frac{32,14 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} + 28,14 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}{2} = 30,14 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

Auch die Fraktionen des Aktivitäts-Peaks 2, F36 und F37, zeigten Signale im oben genannten aromatischen Bereich, die mit der Aktivität korrelierten. Jedoch waren diese Signale nicht hochaufgelöst, sondern ähnelten noch stark den Signalen des Rohextraktes FvT_A. Demnach waren die aktiven Substanzen in F36 und F37 noch nicht gut aufgereinigt.

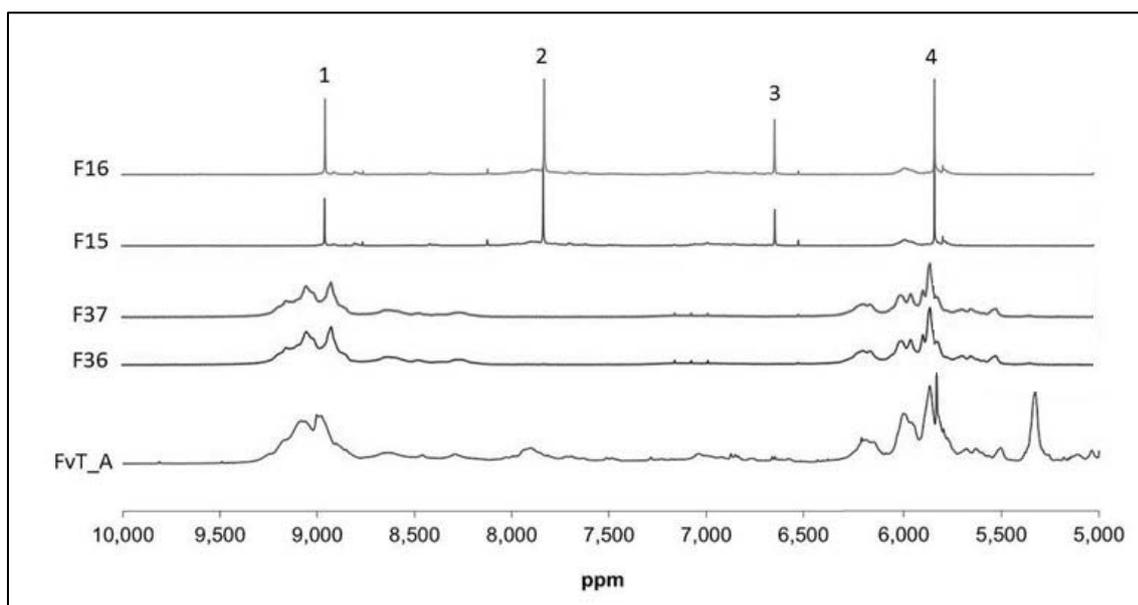


Abbildung 3.20: Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (gemessen in DMSO D6) des Rohextrakts FvT_A, der gut aufgereinigten Fraktionen F16, F15 und der weniger gut aufgereinigten Fraktionen F36, F37. Für F16 und F15 zeigt der Ausschnitt vier scharfe Signale (δ_H), die signifikant mit der Viabilitäts-inhibierenden Aktivität der Fraktionen korrelierten: 1) 8,99 ppm (s), 2) 7,89 ppm (s), 3) 6,64 ppm (s), 4) 5,83 ppm (s).

3.2.5 Bestimmung der Ausbeute der Fraktionen F15 und F16

Für die Fraktionen F15 und F16 wurde insgesamt eine Ausbeute von 0,205 % bezogen auf das TG (Ausbeute_{TG} F15/F16) und von 0,054 % bezogen auf das Frischgewicht (Ausbeute_{FG} F15/F16) des eingesetzten T-Algenmaterials (restlicher Thallus ohne Rezeptakelblasen) ermittelt (Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10 sowie Rechenwege a-f). Über die Ausbeute_{FG} F15/F16 lässt sich herleiten, dass zur Herstellung von 1 g der gepoolten Fraktion F15/F16 etwa 1,852 kg T-Frischalgenmaterial (ohne Rezeptakelblasen) benötigt werden (Rechenweg g).

Tabelle 3.9: Trockengewichte und Ausbeuten der Fraktionen F15 und F16 sowie der gepoolten Fraktion F15/F16 (F15+F16) im Verhältnis der zur Fraktionierung eingesetzten Rohextraktmenge und der zur Herstellung von 2 g Rohextrakt notwendigen Algenmenge.

Zur Fraktionierung eingesetzte Rohextraktmenge [g]	Für 2 g Rohextraktmenge notwendige Algentrockenmenge [g]	Für 2 g Rohextraktmenge notwendige Algenfrischmenge [g]	Fraktion	TG Fraktion [mg]	Fraktionsausbeute [%] bezogen auf die eingesetzte Rohextraktmenge	Fraktionsausbeute [%] bezogen auf die eingesetzte Algentrockenmenge	Fraktionsausbeute [%] bezogen auf die eingesetzte Algenfrischmenge
2	11,82	44,64	F15	12,9	0,645	0,109	0,029
			F16	11,3	0,565	0,096	0,025
			F15 + F16	24,2	1,210	0,205	0,054

Tabelle 3.10: Trockengewicht und Ausbeute des zur Aufreinigung eingesetzten Rohextraktes FvT_A (1) sowie Spezifikationen des zur Rohextraktion eingesetzten Algenmaterials (siehe hierzu auch Tabelle 3.13).

Extrakt	TG Rohextrakt [g]	Einsatz Algenmaterial (FG) [g]	Wassergehalt des Algenmaterials [%]	Trockengehalt des Algenmaterials [%]	TG des eingesetzten Algenmaterials [g]	Rohextraktausbeute [%] bezogen auf die eingesetzte Algentrockenmenge	Rohextraktausbeute [%] bezogen auf die eingesetzte Algenfrischmenge
FvT_A (1)	2,69	60	73,50	26,50	15,9	16,92	4,48

Rechenwege:

a) Rohextraktausbeute bezogen auf das TG des eingesetzten Algenmaterials:

$$\frac{p}{100} = \frac{2,69 \text{ g}}{15,9 \text{ g}}$$

$$x = \frac{2,69 * 100}{15,9}$$

$$p = 16,92 \%$$

b) Rohextraktausbeute bezogen auf das FG des eingesetzten Algenmaterials:

$$\frac{p}{100} = \frac{2,69 \text{ g}}{60 \text{ g}}$$

$$x = \frac{2,69 * 100}{60}$$

$$p = 4,48 \%$$

Zur Fraktionierung wurde eine Rohextraktmenge von 2 g eingesetzt.

c) Für 2 g Rohextrakt notwendige Algentrockenmenge:

$$\frac{16,92}{100} = \frac{2 \text{ g}}{x}$$

$$x = \frac{2 * 100}{16,92}$$

$$x = 11,82 \text{ g}$$

d) Für 2 g Rohextrakt notwendige Algenfrischmenge:

$$\frac{4,48}{100} = \frac{2 \text{ g}}{x}$$

$$x = \frac{2 * 100}{4,48}$$

$$x = 44,64 \text{ g}$$

e) Ausbeute_{TG} F15/F16:

Prozentsatz = $TG_{F15/F16}$ / für 2 g Rohextrakt notwendige Algentrockenmenge

$$\frac{p}{100} = \frac{24,2 \text{ mg}}{11,82 \text{ g}}$$

$$p = \frac{24,2 * 100}{11,82 * 1000}$$

$$p = 0,205 \%$$

f) Ausbeute_{FG} F15/F16:

Prozentsatz = $TG_{F15/F16}$ / für 2 g Rohextrakt notwendige Algenfrischmenge

$$\frac{p}{100} = \frac{24,2 \text{ mg}}{44,64 \text{ g}}$$

$$p = \frac{24,2 * 100}{44,64 * 1000}$$

$$p = 0,054 \%$$

g) Für 1 g F15/F16 notwendige Menge Frischalgenmaterial (restlicher Thallus ohne Rezeptakelblasen):

$$\frac{0,054}{100} = \frac{1 \text{ g}}{x}$$

$$x = \frac{1 * 100}{0,054}$$

$$x = 1851,852 \text{ g} \approx 1,852 \text{ kg}$$

3.2.6 Reproduzierbarkeit

Die Aufreinigung nach 3.2.3 wurde mehrfach wiederholt, um einerseits genügend Fraktionstrockenmasse für anschließende Analysen* zu generieren und andererseits die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung zu beurteilen. Die Fraktionen der fünf Wiederholungsläufe wurden in einheitlichen Verdünnungen hinsichtlich ihrer Aktivität im Standard-Viabilitäts-Assay getestet. Die Ergebnisse inklusive der in den Wiederholungsläufen identifizierten Aktivitäts-Peak-Fraktionen sind im Anhang A.4 dargestellt.

Das etablierte Aufreinigungsschema war auf allen Ebenen, von der Algenernte über die Rohextraktion bis hin zur Fraktionierung, sehr gut reproduzierbar. Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden die ¹H-NMR-Fingerabdrücke der Aktivitäts-Peak-1-Fraktionen aller Fraktionierungsläufe, die IC₅₀-Werte der Aktivitäts-Peak-1-Fraktionen des ursprünglichen und des zweiten Fraktionierungslaufes, die IC₅₀-Werte und Ausbeuten verschiedener Rohextraktchargen sowie die Trockengewichte der beiden verwendeten Algenchargen herangezogen:

- Die biologischen Fraktions-Replikate F15², F16² wurden aus einem Rohextrakt der zweiten Algencharge gefertigt, welche zwei Jahre nach der ersten zur gleichen Jahreszeit (Juni 2012 vs. Mai 2010) und vom selben Standort gesammelt worden ist. Die ¹H-NMR-Fingerabdrücke (Abb. 3.21) und IC₅₀-Werte (Tabelle 3.11, Abb 3.22) dieser Fraktions-Replikate waren vergleichbar mit denen von F15, F16.
- Das aus der zweiten Algencharge gefertigte biologische Rohextrakt-Replikat FvT_A (3) wies IC₅₀-Werte und eine Rohextraktausbeute auf, die vergleichbar waren mit den Werten des Rohextrakts FvT_A (1) aus der ersten Algencharge. Ebenso verhielt es sich mit den jeweiligen technischen Replikaten FvT_A (2) und FvT_A (4) (Tabelle 3.12).

- Die zweite Algencharge war bezüglich ihres Trockengehalts vergleichbar mit der ersten Algencharge (Tabelle 3.13).
- Auch bestätigten die ^1H -NMR-Spektren mehrerer technischer Fraktionsreplikate (F15³, F16³ bis F15⁶, F16⁶), welche aus den wiederholten Fraktionierungsläufen von Rohextrakten aus der zweiten Algencharge stammen, die Reproduzierbarkeit des etablierten Aufreinigungsschemas (Abb. 3.23-3.26).

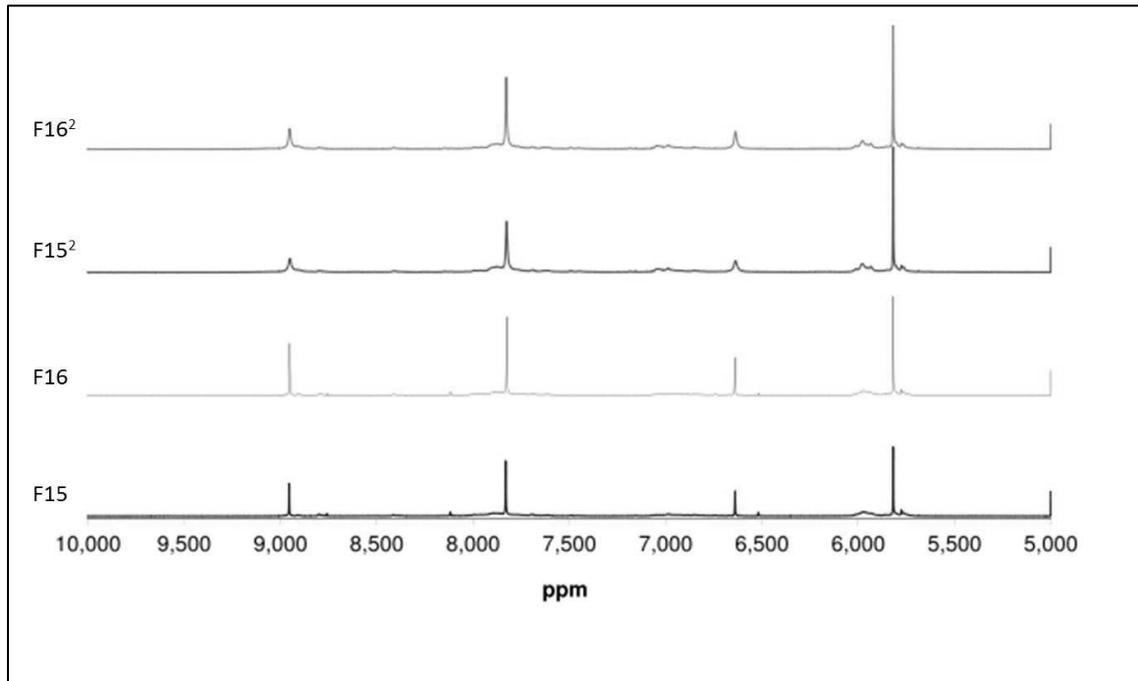


Abbildung 3.21: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F15, F16 und ihrer biologischen Replikate F15², F16². Die Replikate wurden aus einer neuen Algencharge gefertigt, die zwei Jahre nach der ersten gesammelt worden ist. Die vier charakteristischen Signale von F15 und F16 wurden eindeutig und hochaufgelöst in den Replikaten wiederaufgefunden. Dies ist ein Zeichen für die hervorragende Reproduzierbarkeit der etablierten Aufreinigungsmethode.

Tabelle 3.11: Gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen im Standard-Viabilitäts-Assay ermittelte IC₅₀-Werte der Fraktionen F15, F16 und deren biologischer Replikate F15², F16². Die IC₅₀-Werte wurden auf Basis der erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 3.19 und 3.22) ermittelt.

Fraktionen	IC ₅₀ [µg/ml]	
	Panc89	PancTU1
F15	15,23 (n = 3)	18,29 (n = 3)
F16	16,35 (n = 2)	16,92 (n = 2)
F15 ²	22,81 (n = 1)	20,38 (n = 1)
F16 ²	19,93 (n = 1)	18,34 (n = 1)

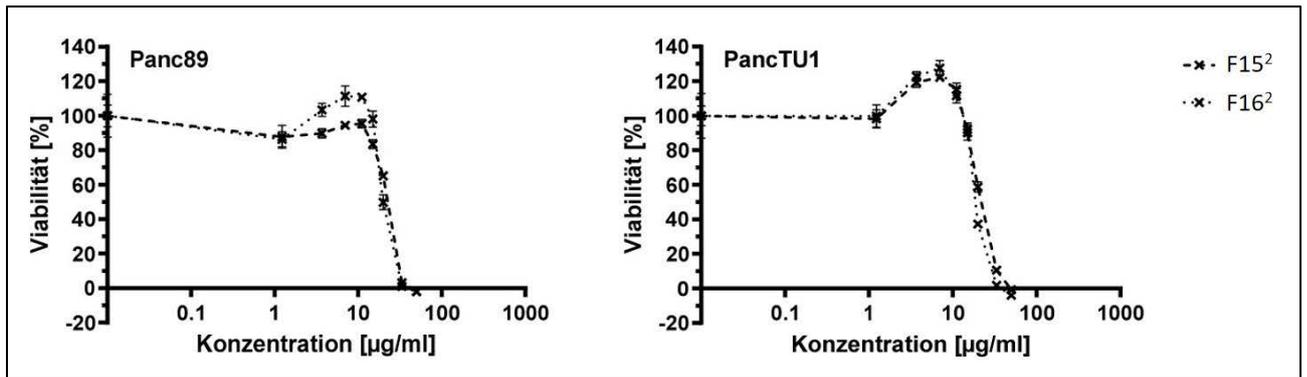


Abbildung 3.22: Dosis-Wirkungs-Kurven der Fraktionen F15² ($n = 1$), F16² ($n = 1$) gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen. Die Kurven wurden durch Testung serieller Verdünnungen der Fraktionen im Standard-Viabilitäts-Assay ermittelt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD vier technischer Replikate.

Tabelle 3.12: Übersicht der verschiedenen Algen-, Rohextrakt- und Fraktionschargen sowie der gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen im Standard-Viabilitäts-Assay ermittelten IC₅₀-Werte des ursprünglichen Rohextraktes FvT_A (1), seines biologischen Replikats FvT_A (3) sowie der jeweils technischen Replikate FvT_A (2) und FvT_A (4). **F15⁷, F16⁷ wurden eingetrocknet und für die IR-Messung eingesetzt. ***Die hier hervorgegangenen Fraktionen wurden zur UV-Messung eingesetzt.

Rohextrakt	Algen-charge	daraus hervorgegangene Fraktionen (etabliertes Aufreinigungsschema)	Rohextraktausbeute [%] bezogen auf die eingesetzte Algentrockenmenge	IC ₅₀ [µg/ml] des Rohextraktes		weitere Verwendung des Rohextraktes
				Panc89	PancTU1	
FvT_A (1)	Juni 2010	F15, F16	16,92	71,47 ($n = 3$)	76,96 ($n = 3$)	XAD16-Grobfractionierung
FvT_A (2)	Juni 2010	-	15,28	55,03 ($n = 3$)	85,39 ($n = 3$)	XAD16-Grobfractionierung
FvT_A (3)	Mai 2012	F15 ² , F16 ² , F15 ³ , F16 ³ , F15 ⁴ , F16 ⁴	16,78	83,82 ($n = 1$)	88,41 ($n = 1$)	
FvT_A (4)	Mai 2012	F15 ⁵ , F16 ⁵ , F16 ⁶ , F16 ⁶ , F15 ⁷ , F16 ⁷ **	16,33	69,70 ($n = 1$)	68,10 ($n = 1$)	
FvT_A (5)	Mai 2012	***	16,20	-	-	RP-Fraktionierungsstudien
FvT_A (6)	Mai 2012	-	17,85	-	-	Extraktvariationsstudien

Tabelle 3.13: Ermittelte Trockengehalte des Thallusmaterials (T, ohne endständige Rezeptakelblasen) der zwei verschiedenen Algenchargen. Die Trockengewichte (TG) wurden in Triplikaten von je 10 g Frischalgenmaterial, die bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet wurden, ermittelt. MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Algencharge	TG Probe 1 [g]	TG Probe 2 [g]	TG Probe 3 [g]	MW TG [g] ± SD	MW Trockengehalt [%]	MW Wassergehalt [%]
03.06.2010	2,64	2,57	2,74	2,65 ± 0,09	26,50	73,50
30.05.2012	2,54	2,56	2,80	2,63 ± 0,14	26,33	73,67

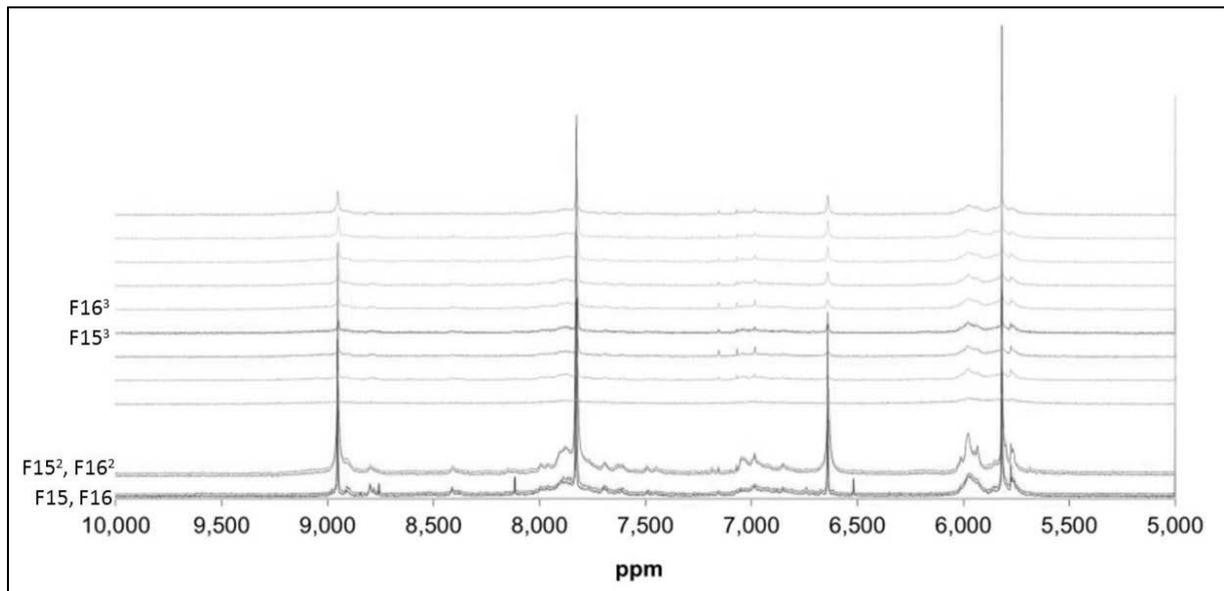


Abbildung 3.23: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F15, F16 und ihrer Replikate F15², F16² und F15³, F16³ sowie deren benachbarter Fraktionen.

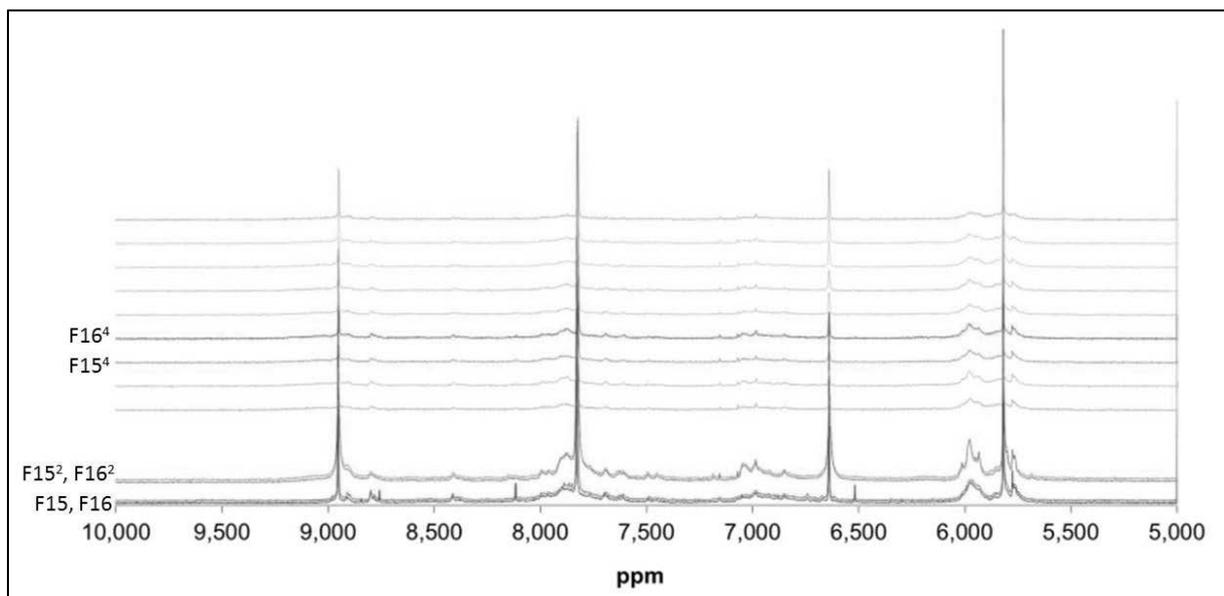


Abbildung 3.24: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F15, F16 und ihrer Replikate F15², F16² und F15⁴, F16⁴ sowie deren benachbarter Fraktionen.

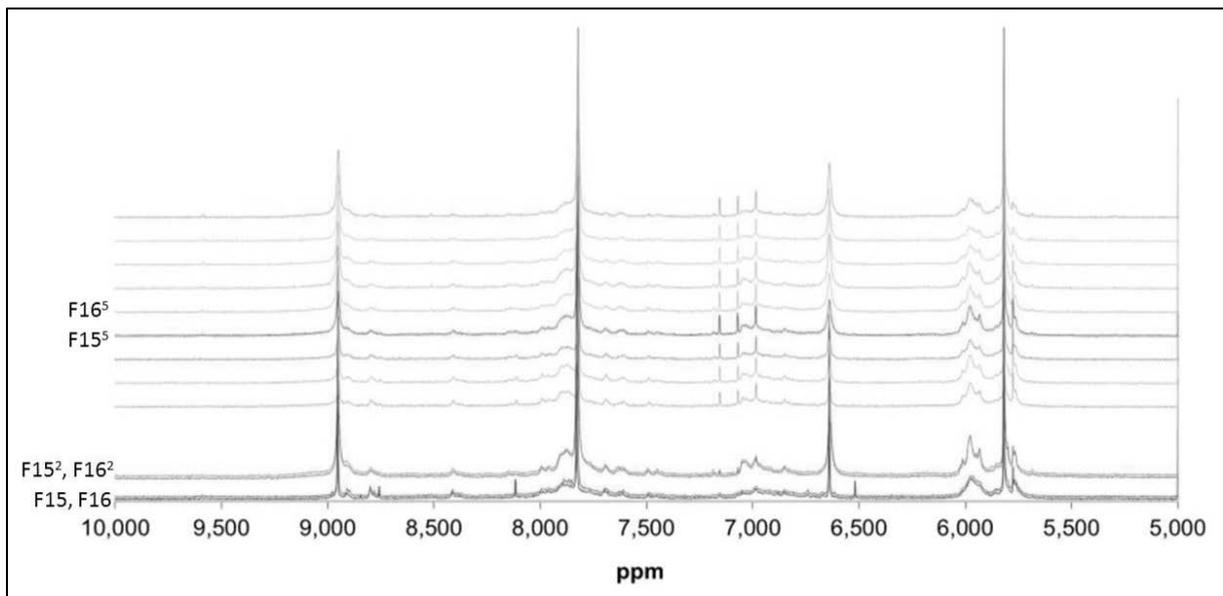


Abbildung 3.25: Ausschnitt der ¹H-NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F15, F16 und ihrer Replikate F15², F16² und F15⁵, F16⁵ sowie deren benachbarter Fraktionen.

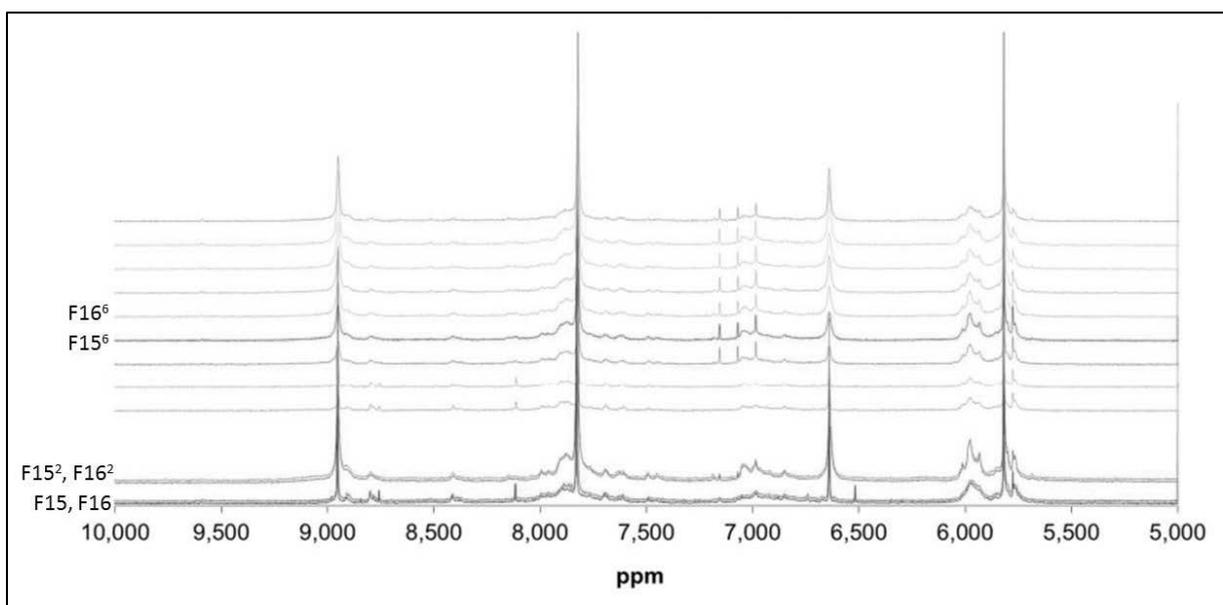


Abbildung 3.26: Ausschnitt der ¹H-NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F15, F16 und ihrer Replikate F15², F16² und F15⁶, F16⁶ sowie deren benachbarter Fraktionen.

* Für die weitergehenden Untersuchungen wurden die in den Fraktionierungsläufen 3-6 reproduzierten und als Aktivitäts-Peak 1 identifizierten Fraktionen zu jeweils gleichen Volumina (210 µl) gepoolt (im Folgenden „gepoolte Fraktion F15/F16 (Reproduktion)“ genannt). Um genügend Untersuchungsmaterial bereitzustellen, wurden nicht nur zwei, sondern jeweils drei benachbarte Fraktionen des Aktivitäts-Peaks 1 miteinander gepoolt (siehe Anhang 4, Tabelle A.3). Dies war aufgrund der sehr ähnlichen NMR-Profile und Aktivitäten im Standard-Viabilitäts-Assay sowie der vergleichbaren Trockengewichte dieser Fraktionen je Fraktionierungslauf möglich.

3.2.7 Gehalt an Endotoxinen und Schwermetallen in F15/F16

Bakterielle Endotoxine sowie Schwermetalle, wie z.B. Quecksilber, Blei, Cadmium, Kupfer und Chrom, können auf Zellkulturen stark schädigende Wirkungen ausüben. Daher wurden die Fraktionen des Aktivitäts-Peaks 1 auf ihren Gehalt an Endotoxinen und Schwermetallen analysiert.

Die Endotoxin-Bestimmung wurde freundlicherweise von der BMA-Labor GbR, Bochum, mittels des chromogen-kinetischen Limulus-Amöbocyten-Lysat-Tests vorgenommen. Der Gehalt an Endotoxinen betrug in der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) (verdünnt in Aqua ad iniectabilia) 0,006 EU/ml oder 0,06 EU/mg bei einer getesteten Konzentration von 100 µg/ml und 0,11 EU/ml oder 0,55 EU/mg bei einer getesteten Konzentration von 200 µg/ml (siehe Prüfbericht im Anhang A.5). Bei diesen Fraktionskonzentrationen war die Viabilität der Zellen zu 100 % inhibiert (Abb. 3.19). Offenbar wurde kein auffälliger Endotoxin-Gehalt durch die Fraktionen in diesen wirksamen Konzentrationen in die Zellkulturexperimente eingebracht, da die in der Literatur verfügbaren Endotoxin-Grenzwerte über den gemessenen Werten liegen: Der Grenzwert für steriles Wasser zur Injektion (Aqua ad iniectabilia) liegt bei 0,25 EU/ml, für Paclitaxel zur Injektion liegt er bei 0,67 EU/mg [Lonza 2011 - *Internetquelle*], für Medizinprodukte, die Kontakt haben zum kardiovaskulären oder lymphatischen System, bei 0,5 EU/ml [FDA 2012 - *Internetquelle*]. Es wurden keine Literaturdaten zu Endotoxin-Grenzwerten für entsprechende Zellkultur-Tests gefunden. Offenbar variiert der Effekt von Endotoxinen stark von Zelltyp zu Zelltyp [Dawson 1998].

Die Schwermetall-Bestimmung wurde freundlicherweise von der Umwelt Control Labor GmbH, Kiel, mit Hilfe des ICP-OES-Screening-Verfahrens vorgenommen. Der Gehalt an wesentlichen Schwermetallen gestaltete sich in der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion), verdünnt in Aqua ad iniectabilia, bei $c = 100 \mu\text{g/ml}$ folgendermaßen: Quecksilber $< 0,1 \mu\text{g/l}$, Blei $< 5 \mu\text{g/l}$, Cadmium $< 0,4 \mu\text{g/l}$, Kupfer $9,93 \mu\text{g/l}$, Chrom $< 1 \mu\text{g/l}$, Arsen $< 5 \mu\text{g/l}$ (siehe Prüfbericht im Anhang A.6). Offenbar wurde kein auffälliger Schwermetall-Gehalt durch die Fraktionen in der Wirkkonzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ in die Zellkulturexperimente eingebracht, da die in der Literatur verfügbaren Grenzwerte über den gemessenen Werten liegen. Zum Vergleich wurden die Grenzwerte der Deutschen Trinkwasserverordnung [BMG 2018] herangezogen: Quecksilber $0,0010 \text{ mg/l}$, Blei $0,010 \text{ mg/l}$, Cadmium $0,0030 \text{ mg/l}$, Kupfer $2,00 \text{ mg/l}$, Chrom $0,050 \text{ mg/l}$, Arsen $0,01 \text{ mg/l}$.

3.3 Identifizierung und Ansatzweise-Strukturaufklärung der aktiven Substanzen in F15/F16

Für die bereits gut aufgereinigten Fraktionen des Aktivitäts-Peaks 1 (F15, F16 oder gepoolte Probe) wurde eine Reihe von Experimenten zur Identifizierung der aktiven Substanzgruppe und zur Strukturaufklärung der aktiven Stoffe durchgeführt. Auch wurden bereits vorhandene Daten noch einmal genauer betrachtet, um entsprechende Schlussfolgerungen zu ziehen. Alle NMR-Messungen sowie

deren Auswertungen wurden freundlicherweise von Dr. Roland Geyer und Dr. Markus Fuhrmann von der numares AG, Regensburg, durchgeführt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die HPLC-MS-Analyse wurde freundlicherweise im Kieler Wirkstoffzentrum (heute: GEOMAR-Biotech) durchgeführt. Die IR-Spektroskopie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Axel Zeeck, Biovitica GmbH, Göttingen, durchgeführt. Die Gesamtinterpretation der Ergebnisse der Experimente zur Strukturaufklärung wurde freundlicherweise von Dr. Roland Geyer und Dr. Markus Fuhrmann von der numares AG, Regensburg, vorgenommen.

3.3.1 Hitzestabilität

Die gepoolte Fraktion F15/F16 (Reproduktion) wurde dahingehend untersucht, ob die aktiven Inhaltsstoffe hitzestabil sind, da dadurch Rückschlüsse auf die aktive Substanzklasse gezogen werden konnten. Es wurden jeweils 11 μl -Aliquots der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) für 10 min bei 40, 60, 70 und 80 °C erhitzt und anschließend im Standard-Viabilitäts-Assay getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Aktivität der Fraktionen durch die Hitzebehandlung nicht verändert hat (Abb. 3.27). Das heißt, dass die aktiven Stoffe bis einschließlich 80 °C hitzestabil sind und hitzeempfindliche Stoffe als aktive Stoffe ausgeschlossen werden können.

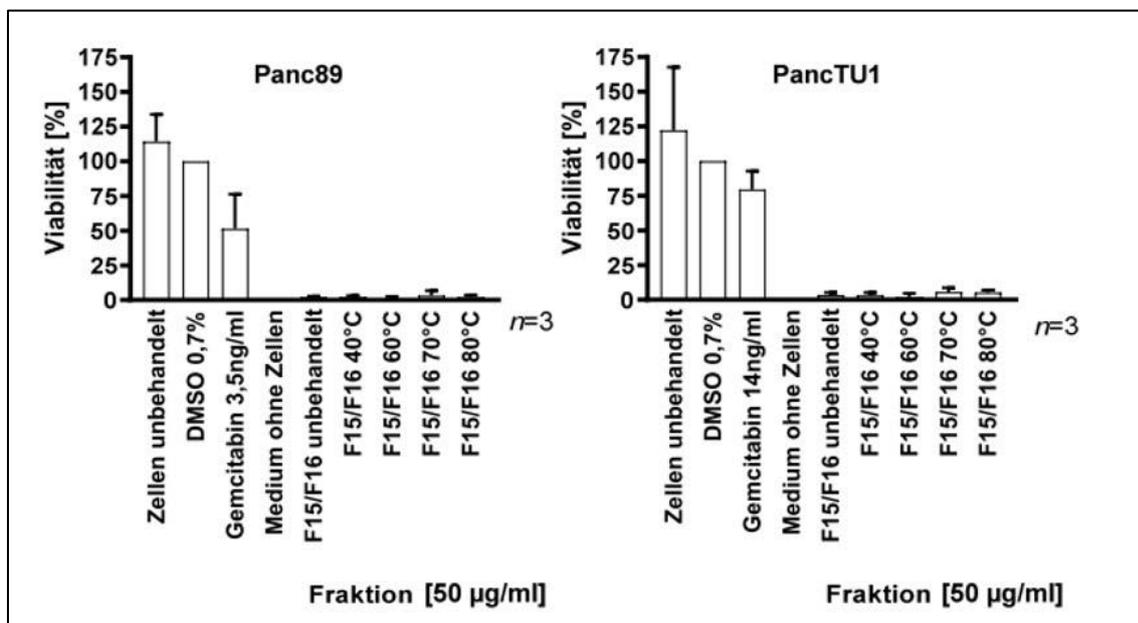


Abbildung 3.27: Aktivitäten der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) mit $c = 50 \mu\text{g/ml}$ nach 10-minütiger Hitzeeinwirkung bei 40, 60, 70 und 80 °C im Vergleich zur unbehandelten Probe gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (0,7 % DMSO) und als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dreier unabhängiger Experimente.

3.3.2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Die Analyse der vier charakteristischen $^1\text{H-NMR}$ -Signale von F15/F16, die im Verschiebungsbereich aromatisch gebundener Protonen auftraten (Abb. 3.20 und Anhang 7, Abb. A.12), ergab, dass die Signale nicht direkt miteinander korreliert sind. Dennoch zeigten jeweils zwei Signale (1 & 3 vs. 2 & 4) konstante Integralverhältnisse. Dies führte zu der Annahme, dass die vier Signale von zwei aromatischen Substanzen herkommen: Substanz 1 mit δ_{H} 7,89; 5,83 ppm und Substanz 2 mit δ_{H} 8,99; 6,64 ppm.

3.3.3 DOSY-NMR

Diese Annahme wurde durch DOSY-NMR bestätigt. Aus den gemessenen Diffusionskoeffizienten (Anhang 7, Abb. A.13) wurden die Molekulargewichte der zwei Substanzen ermittelt: 1331 g/mol ($\pm 5\%$) für Substanz 1 (δ_{H} 7,89; 5,83 ppm) und 1173 g/mol ($\pm 5\%$) für Substanz 2 (δ_{H} 8,99; 6,64 ppm) ($n = 2$).

3.3.4 Schlussfolgerungen aus der RP-HPLC an Amberlite® XAD7HP mit Gradientenelution

Da die beiden aktiven Substanzen während der Fraktionierung zur gleichen Zeit, also innerhalb der beiden Fraktionen F15 bei $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$: 74 %/26 % und F16 bei $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$: 71 %/29 %) von der Amberlite® XAD7HP-Säule eluierten (Abb. 3.16), sollten sie strukturell verwandt sein und ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen. Bei 280 nm zeigten sie ein Absorptionssignal.

3.3.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV- und Vis-Spektren von F15 und F16 (einzeln gemessen im Original-Eluenten $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) zeigten einen ausgeprägten Absorptionspeak bei 213 nm mit Schultern bei 227 und 275 nm (Abb. 3.28) sowie einen kleineren Peak bei 348 nm mit einer Schulter bei 440 nm (Abb. 3.29). Die gemessenen UV-Maxima sind charakteristisch für phenolische Substanzen [Robbins 2003]. Phloroglucinol (Sigma, 79330, $\geq 99,0\%$ (HPLC)), das Monomer der Braunalgenphlorotannine, sowie zwei Fucoïdan-Präparationen (Sigma, F5631, crude und Kiel Fucoïdan), alle gelöst in Aqua bidest., wurden als Referenzsubstanzen gemessen. Die UV-Spektren der Fraktionen wiesen Ähnlichkeiten zum UV-Spektrum von Phloroglucinol auf, jedoch nicht zu den UV-Spektren der beiden Fucoïdan-Präparationen. Die Vis-Spektren der Fraktionen F15 und F16 ließen sich keiner Referenzsubstanz eindeutig zuordnen.

Phloroglucinol hat ein Molekulargewicht von 126,11 g/mol. Mit den ermittelten Molekulargewichten von 1331 g/mol ($\pm 5\%$) und 1173 g/mol ($\pm 5\%$) könnten die aktiven Substanzen Polymere des Phloroglucinols sein.

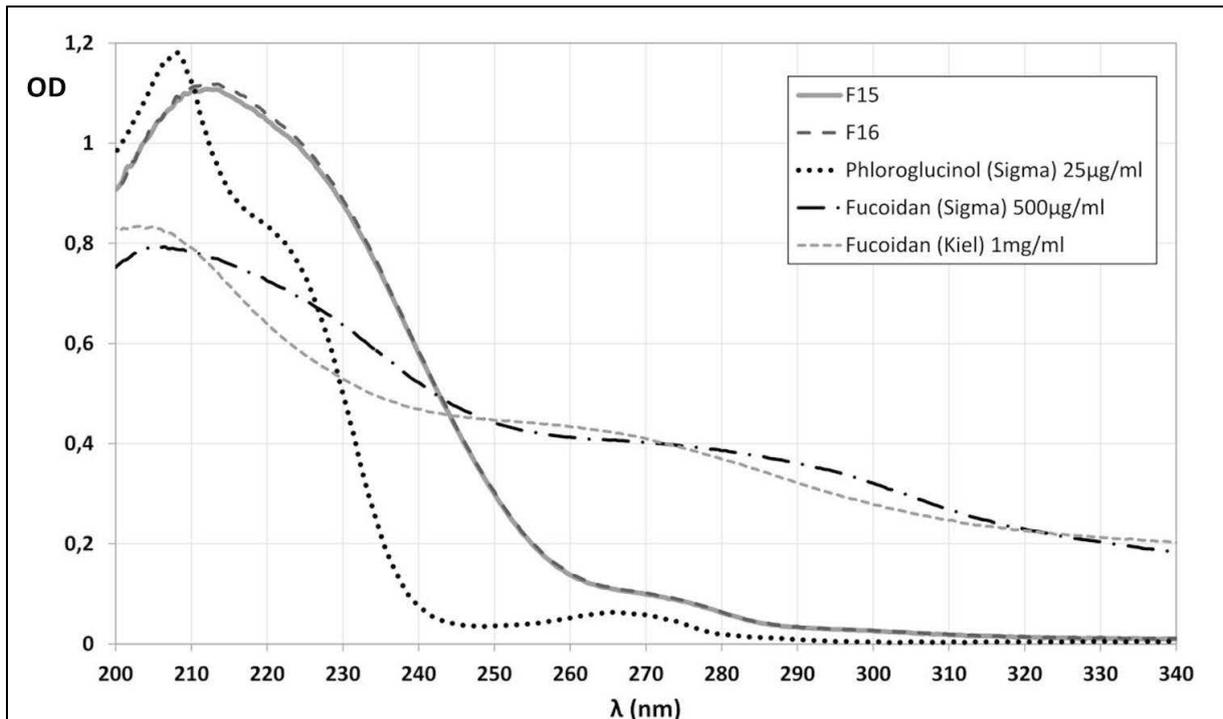


Abbildung 3.28: UV-Absorptionsspektren der Fraktionen F15 und F16 (im Original-Eluenten $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, F15: 74 %/26 %, F16: 72,5 %/27,5 %, 1:200 verdünnt mit Aqua bidest.) sowie von Phloroglucinol (Sigma) und zwei Fucoidan Präparationen (Sigma und Kiel Fucoidan) (alle gelöst in Aqua bidest.). Die UV-Spektren der Fraktionen (λ_{max} : 213, 227sh, 275sh nm) weisen Ähnlichkeiten zum Spektrum von Phloroglucinol auf, jedoch nicht zu den Spektren der Fucoidan-Präparationen.

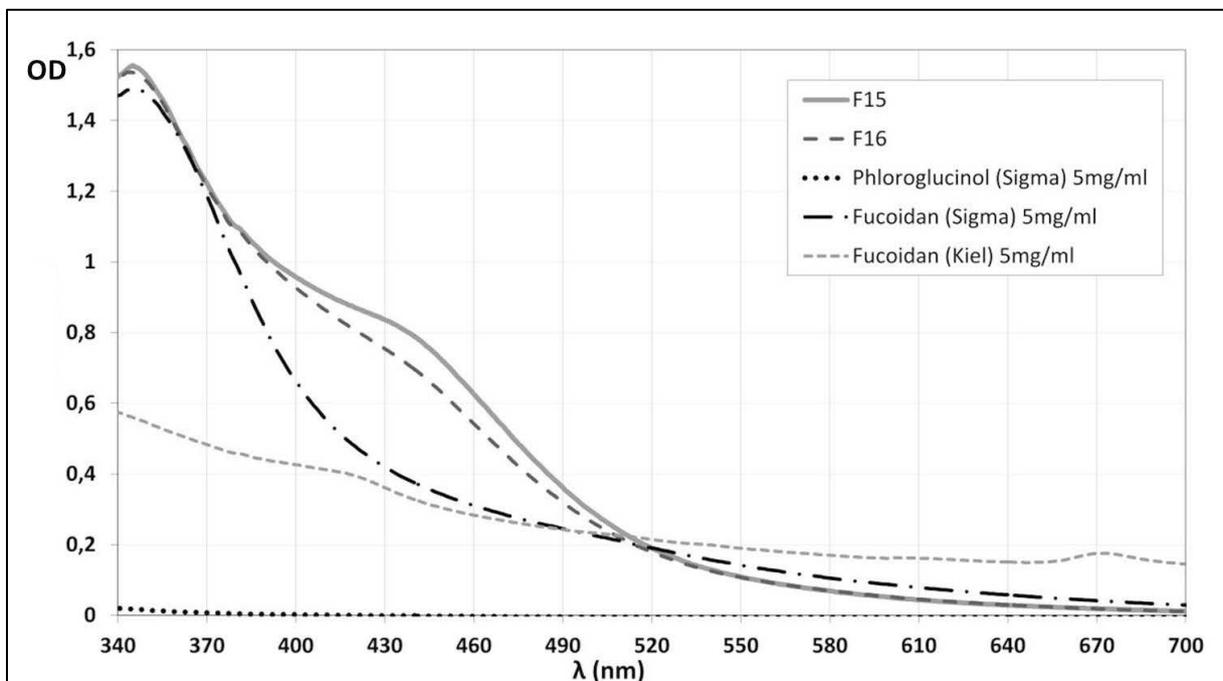


Abbildung 3.29: Vis-Absorptionsspektren der Fraktionen F15 und F16 (im Original-Eluenten $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, F15: 74 %/26 %, F16: 72,5 %/27,5 %, unverdünnt) sowie von Phloroglucinol (Sigma) und zwei Fucoidan Präparationen (Sigma und Kiel Fucoidan) (alle gelöst in Aqua bidest.). $\lambda_{\text{maxF15/F16}}$: 348, 440sh nm.

3.3.6 Folin-Ciocalteu-Assay

Die Ergebnisse des FC-Assays bestärkten die Annahme, dass die aktiven Substanzen zur Gruppe der Polyphenole gehören. Es wurde ein deutlicher Anstieg ($\approx 200\%$) des Gesamtpolyphenolgehalts in der Fraktion F16 im Vergleich zum Rohextrakt FvT_A beobachtet (Abb. 3.30 und Tabelle 3.14). Mit dem Assay interferierende Substanzen wie Glykoside, Peptide oder Ascorbinsäure sind laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Anhang 7, Abb. A.12) nicht mehr vorhanden (erkennbar an den fehlenden Signalen im Bereich von 1 - 5 ppm), interferierende aromatische Aminosäuren wurden aber zunächst noch nicht ausgeschlossen.

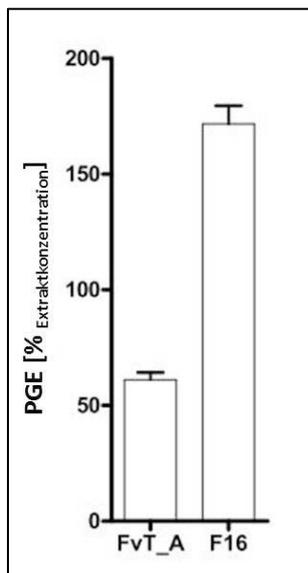


Abbildung 3.30: Mittels Folin-Ciocalteu-Assay bestimmter Anstieg des Gesamtpolyphenol-Gehalts in der Fraktion F16 im Vergleich zum Gehalt im Rohextrakt FvT_A. Die Werte sind angegeben als Phloroglucinol-äquivalente (PGE) in % bezogen auf die getestete Konzentration von Rohextrakt bzw. Fraktion (beide $c = 100\ \mu\text{g/ml}$) und als Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente ($n = 3$): 61,11 % für FvT_A, 171,67 % für F16.

Tabelle 3.14: Messwerte zum Folin-Ciocalteu-Assay zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts im Rohextrakt FvT_A und in der Fraktion F16 bezogen auf die getestete Konzentration (beide $c = 100\ \mu\text{g/ml}$). Der Assay wurde in drei unabhängigen Läufen, jeweils in Duplikaten und mit frisch angesetzter Extrakt- und Fraktionsverdünnung durchgeführt. Die PGE in % wurden anhand der in jedem Testlauf ermittelten Kalibriergeraden (jeweils $y = 0,0006 \cdot x$) bestimmt. MW: Mittelwert, PGE: Phloroglucinoläquivalente.

Extrakt/Fraktion [$c = 100\ \mu\text{g/ml}$]	OD _{750 nm}			PGE [%Extraktkonzentration]				
	MW 1	MW 2	MW 3	1	2	3	MW ($n = 3$)	SD ($n = 3$)
FvT_A	0,0345	0,0375	0,0380	57,50	62,50	63,33	61,11	3,15
F16	0,0980	0,1035	0,1075	163,33	172,50	179,17	171,67	7,95

3.3.7 HPLC-MS-Analyse

Die mittels HPLC-MS erhaltenen Massenchromatogramme der Fraktion F15 lieferten hinsichtlich der Substanzidentifizierung nur wenig verwertbare Ergebnisse, sowohl im Modus der positiven (Abb. 3.31) als auch im Modus der negativen Ionisierung (Abb. 3.32).

Die zugehörigen UV-Chromatogramme (Abb. 3.31 und 3.32) zeigten einen kleineren Peak bei RT 1,2 min mit UV_{max} bei 215 nm sowie Schultern bei 230 und 275 nm sowie einen breiten, benachbarten Peak bei RT 1,4 - 2,4 min mit ähnlichem UV-Absorptionsmuster. Beide Peaks waren nicht Basislinien-getrennt. Die UV-Absorptionsmuster stimmten mit den unter 3.3.5 erhaltenen Ergebnissen überein. Während dem Peak bei RT 1,2 min ein Massenpeak bei m/z 1008 $[M+H]^+$ zugeordnet werden konnte, wies der breite benachbarte Peak bei RT 1,4 - 2,4 min keinen eindeutig zuordbaren Massenpeak auf.

Ab RT 3 min zeigten sich keine UV-Peaks mehr, aber viele äquivalente Massenpeaks, bei positiver Ionisierung mit geringeren Massen als bei negativer Ionisierung. Eine Erklärung hierfür könnte das Vorliegen unterschiedlicher Derivate einer Verbindung sein.

Ab RT 4,5 min ließ insbesondere das Massenchromatogramm der negativen Ionisierung mit einer Vielzahl an undefinierbaren Peaks keine Auswertung mehr zu. Mögliche Gründe hierfür könnten Säulenbluten, das Vorliegen eines Gemisches oder die Fragmentierung der zu analysierenden Substanzen durch ESI sein.

Um per MS konkrete Aussagen hinsichtlich der Substanzidentifizierung treffen zu können, muss die Methode optimiert werden.

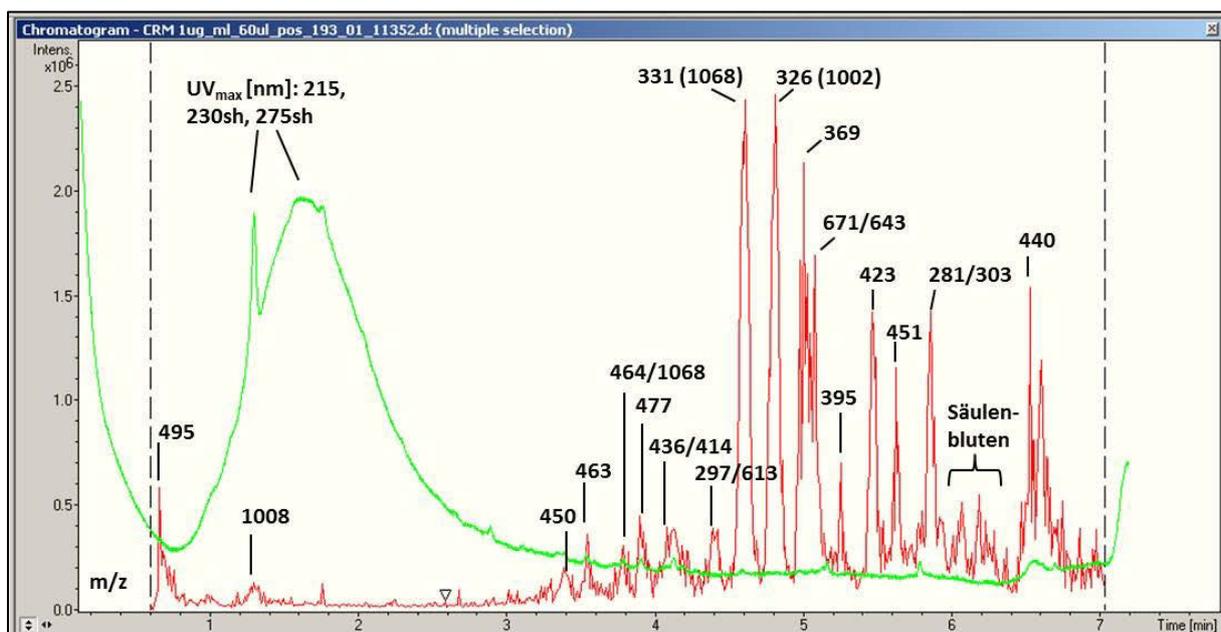


Abbildung 3.31: UV-Chromatogramm (200 - 550 nm, grün) der Fraktion F15 nach RP-HPLC an C18 und zugehöriges Massenchromatogramm (BPC 50-2200 +All MS, rot) nach ESI-MS, positive Ionisierung.

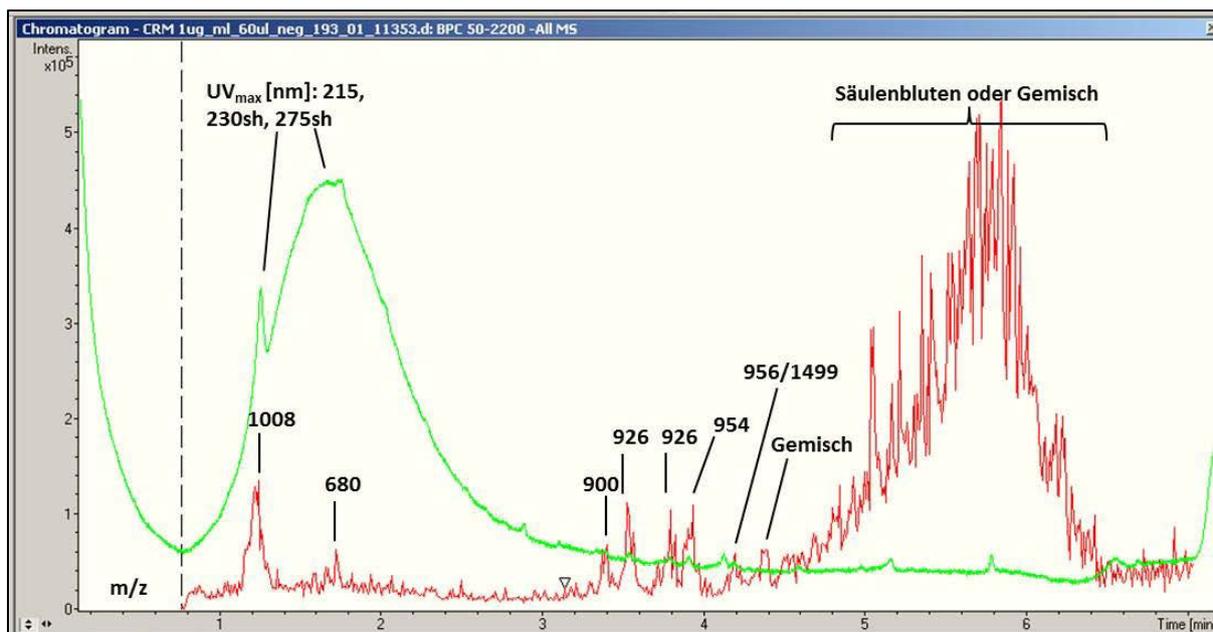


Abbildung 3.32: UV-Chromatogramm (200 - 550 nm, grün) der Fraktion F15 nach RP-HPLC an C18 und zugehöriges Massenchromatogramm (BPC 50-2200 +All MS, rot) nach ESI-MS, negative Ionisierung.

3.3.8 Gesamtinterpretation anhand weiterer NMR-Experimente sowie IR-Spektroskopie

Die Gesamtinterpretation der Ergebnisse zur Strukturaufklärung wurde freundlicherweise von Dr. Roland Geyer und Dr. Markus Fuhrmann von der numares AG, Regensburg, vorgenommen: Laut der erhaltenen ^1H -NMR-Spektren (Abb. 3.20 und Anhang 7, Abb. A.12) sind beide aktiven Substanzen in F15/F16 stark symmetrische und stark substituierte aromatische Stoffe. Das Vorhandensein von Alkyl-Substituenten am aromatischen Ring konnte ausgeschlossen werden. Die Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse von ^{13}C - und 2D-NMR-Messungen (COSY, NOESY, HSQC und HMBC) (Anhang 7, Abb. A.14-A.18) bestätigt. Es wurden hierbei nur quartäre C-Atome und keine an C gebundenen Protonen detektiert. Dagegen wurden phenolische C-Atome und Iod als Substituent detektiert. Fluor, Chlor und Brom wurden als Substituenten ausgeschlossen. Des Weiteren wurde in einem H/D-Austausch-Experiment (Wasserstoff/Deuterium) ein schneller H/D-Austausch für die ^1H -NMR-Signale bei 7,89 ppm, 6,64 ppm und 8,99 ppm beobachtet. Für das Signal bei 5,83 ppm fiel der H/D-Austausch langsamer aus. Der schnelle H/D-Austausch ist ein weiteres Indiz für das Vorhandensein phenolischer Protonen [persönliche Kommunikation mit Dr. Roland Geyer, die Messungen wurden bei der numares AG durchgeführt und sind hier nicht gezeigt]. Die Ergebnisse der durchgeführten IR-Spektroskopie (Anhang 7, Abb. A.19) bestärkten im Vergleich mit den in Parys et al. [2010] aufgeführten Daten die Annahme, dass es sich bei den aktiven Substanzen in F15/F16 um phenolische Substanzen handelt. Insgesamt unterstützten alle bisher ermittelten Daten die Annahme, dass die beiden aktiven Substanzen in F15/F16 der Gruppe der Braunalgenpolyphenole (Phlorotannine) angehören. Eine abschließende Strukturaufklärung ist

allerdings noch nicht gelungen [persönliche Kommunikation mit Dr. Roland Geyer und Dr. Markus Fuhrmann, numares AG].

4 Diskussion

Die große Zahl ökologischer Studien, die sich dem *F. vesiculosus* aus der Ostsee widmeten [Rothäusler et al. 2019; Schagerström et al. 2014; Maczassek 2014; Fürhaupter et al. 2008; Wikström und Kautsky 2007; Kautsky et al. 1992, 1986; Vogt und Schramm 1991], verdeutlicht die Bedeutung dieser Braunalge für die Ostsee. Dagegen wurde bisher in nur wenigen Studien das Wirkstoffpotential dieser Ostseealge untersucht. Bis zum Start der vorliegenden Arbeit verfügbare Aktivitätsstudien widmeten sich anti-viralen [Béress et al. 1993] und anti-koagulativen [Dürig et al. 1997] Wirkstoffen oder Stoffen, die die Oberflächenbesiedlung der Alge durch Bakterien beeinflussen [Lachnit et al. 2013; Saha et al. 2012, 2011]. Andere Studien beschäftigten sich mit der Abwehr von Fraßfeinden [Flöthe et al. 2014; Rohde et al. 2004; Koivikko et al. 2005] oder Epiphyten [Rönnerberg und Ruokolahti 1986] oder mit den potentiellen anti-bakteriellen Aktivitäten des auf der Algenoberfläche aufgelagerten Biofilms [Goecke et al. 2012]. Über das Potential von *F. vesiculosus* aus der Ostsee hinsichtlich Wirkungen gegen Krebs war jedoch noch nichts bekannt. Aufgrund dieser Wissenslücke wurde das Projekt „Algae against Cancer (AAC)“ (2010 - 2013) ins Leben gerufen, aus dem die vorliegende Doktorarbeit hervorging.

In ihr wurde das zytotoxische Potential des *F. vesiculosus* aus der Ostsee gegenüber humanen Pankreaskrebszelllinien systematisch untersucht, ausgehend von verschiedenen komplexen Rohextrakten bis hin zu aufgereinigten Fraktionen. Die Ergebnisse zeigten, dass die im Spätfrühling vom Standort Kieler Förde, westliche Ostsee, gesammelte Alge eine signifikante Anti-Krebs-Aktivität aufweist. Für die aktiven Substanzen wurde mittels des Verfahrens der Aktivitätsgeleiteten Fraktionierung ein mehrstufiges Aufreinigungsschema entwickelt. Untersuchungen zur chemischen Struktur der Wirkstoffe ergaben, dass es sich hierbei um Polyphenole handelt.

4.1 Aktivitäten der Rohextrakte

Zur Ermittlung der Extrakt-Aktivitäten wurde standardmäßig ein 72 h-iger XTT-Assay unter Verwendung zweier humaner PDAC-Zelllinien, Panc89 und PancTU1, durchgeführt. Die Zelllinien wurden aufgrund der Tatsache ausgewählt, dass noch immer ein großer Bedarf an neuen Therapieoptionen gegen Pankreaskrebs besteht [Ganeh et al. 2007]. Des Weiteren sind Pankreaskrebszelllinien in Studien, die das Anti-Krebs-Potential von Braunalgeninhaltsstoffen untersuchen, deutlich unterrepräsentiert [Ruan et al. 2018; Hussain et al. 2016; Murphy et al. 2014; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014 und Kapitel 1.2.4]. Vier der sechs initialen Rohextrakte, welche durch Mazeration aus gefrorenem Algenmaterial gewonnen wurden, zeigten bei ihrem Einsatz in der Konzentration von 100 µg/ml deutliche (> 20 %) und statistisch signifikante ($p < 0,05$, $n = 3$) zytotoxische Aktivität gegenüber der Panc89-Zelllinie. Gegenüber der PancTU1-Zelllinie zeigten drei der sechs Rohextrakte deutliche Aktivität, wobei nur ein Extrakt davon signifikant aktiv war.

Algen produzieren bioaktive Stoffe als Antwort auf bestimmte Stressbedingungen [Murphy et al. 2014]. Es ist bekannt, dass insbesondere Polyphenole von Braunalgen als Schutz gegenüber Fraßfeinden [Rohde und Wahl 2008; Geiselman und McConnell 1981], UV-Strahlung [Pavia et al. 1997] oder Pathogenen [Sieburth und Conover 1965] synthetisiert werden. Dass auch in den für die vorliegende Arbeit gesammelten Individuen entsprechende Abwehrmechanismen aktiv gewesen sein könnten, welche die nachgewiesene Anti-Krebs-Aktivität erklären, wird aufgrund der bei der Algensammlung gemachten Beobachtungen vermutet: Das Algenmaterial wurde im späten Frühjahr in einer geschützten Bucht der Kieler Außenförde nah am Ufer aus einer Tiefe von 30 - 50 cm von verschiedenen Individuen gesammelt. In diesem Bereich wuchs *F. vesiculosus* in einem größeren Algent Teppich. Die gesammelten Triebe waren frisch und dunkelgrün. Im Gegensatz zu Individuen, die in größerer Tiefe oder in benachbarten Buchten wuchsen, wiesen die Algen an der Sammelstelle kaum epiphytische (aufsitzende) Algen auf. Darüber hinaus wurden nur wenige Individuen des Fraßfeinds *Idotea baltica* (Baltische Meerassel) auf dem gesammelten Algenmaterial gefunden, und die invasive Braunalgenart *Fucus evanescens* war nur vereinzelt am Sammelstandort vertreten.

Um bisher unbekannte Wirkstoffe zu entdecken, zielte das initiale Extraktionsschema nicht nur auf eine bestimmte Stoffgruppe ab, sondern es sollten möglichst viele verschiedene Stoffe aus dem Algenmaterial extrahiert werden. Aus diesem Grunde wurden die drei verschiedenen Extraktionsmittel Aceton $\geq 99,5\%$ (_A), EtOH 96% (_E) und VE-Wasser (_W) eingesetzt, die in ihrer Gesamtheit ein breites Spektrum an Löslichkeiten abdecken. In der Tat zeigten die $^1\text{H-NMR}$ -Fingerabdrücke der Rohextrakte, dass Stoffe verschiedener chemischer Substanzklassen extrahiert worden sind, u.a. Kohlenhydrate, Aminosäuren sowie aromatische und heterozyklische Verbindungen.

Zum Zeitpunkt der Algensammlung waren die Rezeptakeln, die reproduktiven Teile von *F. vesiculosus* reif und, wie in Moss [1950] beschrieben, stark geschwollen und mit Schleim gefüllt - dies im Gegensatz zum restlichen Thallus. Aufgrund dieser deutlich sichtbaren morphologischen Unterschiede zwischen den Rezeptakeln und dem restlichen Thallus wurde eine entsprechende unterschiedliche Verteilung an potentiellen Wirkstoffen erwartet. Auch in der Literatur ist von einer Variabilität des Gehalts an bioaktiven Stoffen (Phenolen) innerhalb des Thallus von *F. vesiculosus* und anderen Braunalgenarten berichtet worden [Tuomi et al. 1989; Connan et al. 2006]. Um einen Aktivitätsvergleich zwischen den unterschiedlichen Algenteilen zu ermöglichen, wurde das gesammelte Algenmaterial daher nicht als Gesamtheit extrahiert, sondern direkt nach der Sammlung in Rezeptakeln (R) und restlichen Thallus (T) aufgeteilt und getrennt extrahiert. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten obige Annahme. Während in allen Thallusextrakten (FvT_A, FvT_E, FvT_W) eine deutliche ($> 20\%$) zytotoxische Aktivität gegenüber den verwendeten Krebszelllinien beobachtet

wurde, war nur ein Rezeptakelextrakt (FvR_A) deutlich (aber nicht signifikant) aktiv, und die anderen Rezeptakelextrakte zeigten keine bzw. nur minimale Aktivität.

Der acetonische Thallus-Extrakt (FvT_A), eingesetzt mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im Standard-Assay, zeigte mit einer Viabilitäts-Hemmung der Panc89-Zellen von $80,3 \% \pm 9,4$ ($p = 0,0045$, $n = 3$) und der PancTU1-Zellen von $82,6 \% \pm 10,0$ ($p = 0,0049$, $n = 3$) die stärkste zytotoxische Aktivität aller Rohextrakte. Dass diese Aktivität von Polyphenolen verursacht wird, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit herausgefunden. Typische Polyphenole in Braunalgen sind Phlorotannine [Ragan und Glombitza 1986]. Ragan und Glombitza [1986] empfehlen zur Extraktion dieser Stoffe die Verwendung frisch gesammelten oder gefrorenen Algenmaterials sowie wässriger Alkohole oder wässrigen Acetons in einem finalen Volumen von 50 - 80 %. In der vorliegenden Arbeit wurde auf gefrorenes Algenmaterial zurückgegriffen, um mehrere Extraktionsläufe mit demselben Algenbatch durchführen und gleichzeitig möglichst wenig modifiziertes Ausgangsmaterial einsetzen zu können. Das verwendete Thallusmaterial trug von sich aus einen Wassergehalt von rund 37 % zum Extraktionsansatz bei. Folglich stimmten die eingesetzten Extraktionsbedingungen mit den Empfehlungen von Ragan und Glombitza [1986] zur Extraktion von Phlorotanninen überein. Diese zufällige Übereinstimmung stützt die Annahme, dass es sich bei den aufgefundenen Wirkstoffen um Phlorotannine handelt.

$FvT_A >^* FvT_W \geq FvT_E \geq FvR_A (\geq FvR_E \geq FvR_W)$ wurde als Reihenfolge der Rohextrakt-Aktivitäten gegenüber der Viabilität von Panc89-Zellen bestimmt. Diese Reihenfolge implizierte, zusammen mit den zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und der Beobachtung des starken Schleimvorkommens in den Rezeptakeln, dass der Gehalt an Polyphenolen mit Anti-Krebs-Aktivität in den Rezeptakeln geringer war als im restlichen Thallusmaterial. Dies geht mit den Ergebnissen von Tuomi et al. [1989] einher, die in den vegetativen Teilen von *F. vesiculosus* einen höheren Polyphenolgehalt nachgewiesen haben als in den reproduktiven Teilen.

Der Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Fingerabdrücke der Rohextrakte zeigte, dass die acetonische Extraktion des restlichen Thallus das effektivste Verfahren zur Extraktion von Polyphenolen mit Anti-Krebs-Aktivität aus der Ostseealge *F. vesiculosus* war. Koivikko et al. [2005] präsentierten ähnliche Ergebnisse für gefriergetrocknetes Material derselben Ostseealge. Allerdings wurden die in jener Studie isolierten Phlorotannine nicht mit einer Aktivität in Verbindung gebracht.

Für FvT_A wurde ein IC_{50} -Wert von $72 \mu\text{g/ml}$ gegenüber Panc89-Zellen und von $77 \mu\text{g/ml}$ gegenüber PancTU1-Zellen nach 72 h-iger Behandlung ermittelt. Vergleichbare Studien, in denen inhibitorische Aktivitäten von *F. vesiculosus* gegenüber humanen Pankreaskrebszelllinien untersucht wurden, fehlen derzeit noch. Eine indisch-US-amerikanische Arbeitsgruppe führte umfassende Untersuchungen mit Polyphenolfractionen anderer Braunalgenarten durch, welche aus dem Golf von Mannar, Indien, gesammelt wurden [Aravindan et al. 2017, 2015, 2013]. IC_{50} -Werte wurden nicht

veröffentlicht, aber die Gruppe zeigte, dass die Fraktionen in der Konzentration von 100 µg/ml die Zelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 bei 24 h-iger Behandlung um mehr als 50 % inhibierten [Aravindan et al. 2013]. Eine chinesische Arbeitsgruppe untersuchte das in China bezogene Phlorotannin Eckol. Dieses zeigte in der Konzentration von 5-20 µg/ml jedoch keine signifikanten Viabilitäts-inhibierenden Effekte gegenüber der Pankreaskrebszelllinie SW1190 bei 72h-iger Behandlung. In vergleichbaren Kombinationsexperimenten mit dem proinflammatorischen Reg3A-Protein reduzierte Eckol dagegen dessen proliferationssteigernde Effekte gegenüber den SW1190-Zellen [Zhang, Zhou et al. 2019].

Im Vergleich zu den o.g. Studien von Aravindan et al. und zu Studien, die mit anderen Zelllinien durchgeführt worden sind, scheint die Aktivität von FvT_A in einem ähnlichen Bereich zu liegen: Geringfügig geringere IC₅₀-Werte wurden für Rohextrakte verschiedener Braunalgenarten von den Küsten Yucatáns, Mexico, gegenüber Hep-2, HeLa and KB-Zellen [Moo-Puc et al. 2009] sowie für einige Rohextrakte antarktischer Braunalgen gegenüber HCT 116-Zellen nach 72 h-iger Behandlung ermittelt [Frassini et al. 2019]. Ein Rohextrakt der Braunalge *Ecklonia cava* von der Jeju Insel, Korea, zeigte geringfügig geringere IC₅₀-Werte gegenüber U-937-Zellen, jedoch einen sehr viel höheren IC₅₀-Wert gegenüber THP-1-Zellen nach 72 h-iger Behandlung [Athukorala et al. 2006]. Für Rohextrakte verschiedener Braunalgenarten vom Persischen Golf wurden sehr viel höhere IC₅₀-Werte gegenüber HT-29-, Caco-2-, T47D-, MDA-MB468- und NIH 3T3-Zellen bei 48- bis 120 h-iger Behandlung ermittelt [Khanavi et al. 2010].

FvT_A wurde aus gefrorenem Algenmaterial angefertigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Verwendung von gefrorenem - und vermutlich auch von frischem - Algenmaterial als Ausgangsmaterial zur Extraktion eine wichtige Voraussetzung ist, die Anti-Krebs-Aktivität im Extrakt auffinden zu können. Der Sachverhalt wurde anhand einer vergleichenden Testreihe mit zwei weiteren Extrakten nachgewiesen, die im Gegensatz zu FvT_A aus getrocknetem Algenmaterial angefertigt worden sind. Weder der Extrakt FvTt_A, der ausschließlich mittels Aceton ≥ 99,5 % hergestellt worden ist (hier nicht gezeigtes Experiment), noch der Extrakt FvTt_AW, der mittels einer Mischung aus Aceton ≥ 99,5 % und demselben Volumen an Wasser hergestellt worden ist, welches auch im Extraktionsbatch der gefrorenen Alge vorhanden war, zeigte Aktivität. Die Ergebnisse entsprechen Ragan und Glombitza [1986], die postulierten, dass luft- oder ofengetrocknetes Material von Mitgliedern der *Fucales* immer unbrauchbar für die Extraktion von Phlorotanninen ist. Diese Übereinstimmung unterstützt erneut die Vermutung, dass die in dieser Arbeit beschriebene Anti-Krebs-Aktivität in *F. vesiculosus* von Phlorotanninen verursacht wird.

4.2 Aktivitäten der Fraktionen

Für die aktiven Substanzen im Rohextrakt FvT_A wurde in dieser Arbeit unter Anwendung der Methodik der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung ein mehrstufiges Aufreinigungsschema entwickelt, das aus den drei hintereinandergeschalteten Schritten Präzipitation, Normalphase- und Umkehrphase-Chromatographie besteht. Nach der Fraktionierung wurde die Aktivität in zwei Bereichen innerhalb der resultierenden 67 Fraktionen wiederaufgefunden. Der erste Aktivitäts-Peak war eher hydrophil und eluierte bei 72,5 % H₂O/27,5 % ACN, der zweite war eher hydrophob und eluierte bei 35 % H₂O/65 % ACN von der Amberlite® XAD7HP Säule. Aufgrund des Auftretens zweier Aktivitäts-Peaks mit unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften wurde die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Stoffen mit Anti-Krebs-Aktivität in FvT_A hergeleitet.

Für die Fraktionen des ersten Aktivitäts-Peaks, F15/F16, wurde mit Hilfe des etablierten Aufreinigungsschemas eine mehr als vierfache Reduktion des IC₅₀-Wertes im Vergleich zum Wert des Rohextraktes erzielt. Des Weiteren zeigten deren ¹H-NMR-Fingerabdrücke vier scharfe, mit der Anti-Krebs-Aktivität signifikant korrelierende Peaks. Einige Hintergrundsignale repräsentierten noch geringfügige Unreinheiten. Aufgrund der deutlichen Reduktion des IC₅₀-Wertes und der scharfen ¹H-NMR-Peaks wurde das etablierte Aufreinigungsschema als effektiv bewertet, wenn es auch noch nicht zu zwei komplett getrennten Reinstoffen geführt hat. Die bereits fortgeschrittene Reinheit der Fraktionen F15/F16 erlaubte die Durchführung detaillierterer Untersuchungen, wie die in dieser Arbeit dargelegte Teilweise-Strukturaufklärung der aktiven Substanzen sowie die in Geisen et al. [2015] beschriebenen Untersuchungen hinsichtlich der zellulären Mechanismen, die die aktiven Substanzen in verschiedenen Krebszelllinien induzierten.

Für die Fraktionen des zweiten Aktivitäts-Peaks, F36/F37, wurde mittels des Aufreinigungsschemas nur eine geringe Reduktion des IC₅₀-Wertes im Vergleich zum Wert des Rohextraktes erzielt. Auch zeigten die zugehörigen ¹H-NMR-Fingerabdrücke keine scharf getrennten Peaks. Demnach schien die Stoffzusammensetzung von F36/F37 noch komplex und die Aufreinigungseffizienz des etablierten Schemas für die Wirkstoffe in F36/F37 noch nicht ausreichend für weitere Untersuchungen zu sein.

Mit einem IC₅₀-Wert zwischen 15,2 µg/ml und 18,3 µg/ml gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen nach 72 h-iger Behandlung liegt die Aktivität von F15/F16 im Bereich der Aktivitäten bekannter Braunalgeninhaltsstoffe. So kann man für das Phlorotannin Dioxinodehydroeckol, isoliert aus *Ecklonia cava* (JeJu Insel, Korea), von den publizierten Daten einen IC₅₀-Wert von rund 18,5 µg/ml gegenüber MDA-MB-231-Zellen und von < 3,7 µg/ml gegenüber MCF-7-Zellen nach 48 h-iger Behandlung ableiten [Kong et al. 2009]. Für die fünf aus demselben Algenmaterial isolierten Phlorotannine, Fucodiphloretol G, Dieckol, 1-(3', 5'-Dihydroxyphenoxy)-7-(2'', 4'', 6-

trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxy-dibenzo-1,4-dioxin, Eckol und Phlorofucofuroeckol A, wurden IC_{50} -Werte zwischen 112 $\mu\text{g/ml}$ und 182 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber HeLa-, HT-1080-, A549- und HT-29-Zellen nach 24 h-iger Behandlung bestimmt [Li, Qian et al. 2011]. Shi et al. [2009] ermittelten für verschiedene Bromophenolderivate aus *Leathesia nana* (China) IC_{50} -Werte von 1,01 bis $> 10 \mu\text{g/ml}$ gegenüber A549-, BGC-823-, MCF-7-, B16-BL6-, HT-1080-, A2780-, Bel7402- und HCT-8 Zellen nach 96 h-iger Behandlung. Fucosterol, isoliert aus *Sargassum angustifolium* (Persischer Golf, Iran), zeigte IC_{50} -Werte von 27,9 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber T47D-Zellen nach 96 h-iger Behandlung und 70,4 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber HT-29-Zellen nach 72 h-iger Behandlung [Khanavi et al. 2012]. Für Fucoxanthin, das aus *Undaria pinnatifida* (Japan) isoliert worden ist, können von den publizierten Daten nach 72 h-iger Behandlung IC_{50} -Werte von rund 10,1 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber HT-29-Zellen und $< 5 \mu\text{g/ml}$ gegenüber Caco-2-Zellen [Hosokawa et al. 2004] sowie Werte von rund 6,6 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber PC-3-Zellen, zwischen 6,6 $\mu\text{g/ml}$ und 13,2 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber DU 145-Zellen und zwischen 3,3 $\mu\text{g/ml}$ und 6,6 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber LNCaP-Zellen hergeleitet werden [Kotake-Nara et al. 2001]. Eigene Experimente mit kommerziell verfügbarem Fucoxanthin (Sigma, F6932, $\geq 95 \%$ (HPLC)) ergaben nach 72 h-iger Behandlung IC_{50} -Werte von 12,52 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber Panc89-Zellen und von 24,37 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber PancTU1-Zellen ($n = 1, 5$ technische Replikate, hier nicht gezeigte Experimente). Die Aktivität von F15/16 und der anderen aufgeführten Algeninhaltsstoffe ist allerdings von anderer Größenordnung als die Aktivität von Gemcitabin, dem Standardchemotherapeutikum für Pankreaskrebs [Seufferlein et al. 2013]. Für dieses wurde in eigenen Experimenten nach 72 h-iger Behandlung ein IC_{50} -Wert von 3,5 ng/ml gegenüber Panc89-Zellen und von 14 ng/ml gegenüber PancTU1-Zellen ermittelt (hier nicht gezeigte Experimente).

Eine der größten Herausforderungen in der marinen Naturstoffforschung ist die Reproduzierbarkeit der implementierten Methodik [DG Mare 2013]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die etablierte Extraktions- und Aufreinigungsmethode hinsichtlich der Isolation der beschriebenen Wirkstoffe gegen Pankreaskrebs aus dem Ostsee-*F. vesiculosus* sehr gut reproduzierbar ist. Für F15¹/F16¹, Reproduktion von F15/F16 aus Algenmaterial der zweiten Sammlung (Anfang Juni 2012), die zwei Jahre nach der ersten Sammlung (Ende Mai 2010) durchgeführt worden ist, wurden vergleichbare ¹H-NMR-Fingerabdrücke und IC_{50} -Werte erhalten. Auch bestätigten zahlreiche technische Replikate die Reproduzierbarkeit der Extraktions- und Aufreinigungsmethode. Von Bedeutung ist auch der Nachweis, dass die Fraktionen F15/F16 in der Wirkkonzentration weder einen zellschädigenden Endotoxin- noch einen zellschädigenden Schwermetall-Gehalt aufwiesen und die aufgefundene Aktivität somit eindeutig auf die Algeninhaltsstoffe zurückgeführt werden konnte.

4.3 Entwicklung des Aufreinigungsschemas

Das mehrstufige Aufreinigungsschema wurde über eine Reihe von Festphasenextraktions-Experimenten und der nachfolgenden Testung der erhaltenen Fraktionen im Standard-Assay entwickelt. In dieser sog. Bindungsstudie wurden in verschiedenen chromatographischen Verfahren Erkenntnisse zum Trennverhalten der Extrakt-Aktivität gewonnen und die geeigneten Verfahren und deren Reihenfolge zur Aufreinigung der aktiven Substanzen bestimmt.

Die Bindungsstudie verlief zum Teil aber auch problematisch, und zwar aufgrund des oben beschriebenen Masseverlusts bei zusätzlich mit der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeiteten Fraktionen. Aus diesem Grund waren sechs der insgesamt 17 Experimente nicht auswertbar und mussten nachträglich aus der Studie ausgeschlossen werden. Folglich wäre es besser gewesen, den zusätzlichen Aufkonzentrationschritt mit der Sep-Pak® C18-Kartusche, dessen Durchführung auf nicht reproduzierten Ergebnissen einer Vorstudie basierte, von vornherein wegzulassen. Eine Wiederholung der Studie unter optimierten Bedingungen hätte sich aus rein wissenschaftlicher Sicht anschließen müssen. Diese war jedoch aus Zeit- und Kostengründen nicht möglich, vor allem nicht vor dem Hintergrund, dass trotzdem wertvolle Erkenntnisse zum Trennverhalten der Extrakt-Aktivität gewonnen wurden, mit denen ein effektives Aufreinigungsschema aufgestellt werden konnte. Das etablierte Aufreinigungsschema zeichnete sich, wie oben erwähnt, durch die erzielte vierfache Steigerung der Aktivität, die hohe Reinheit der Fraktionen F15 und F16 und seine Reproduzierbarkeit aus.

Eine weitere nicht optimale Umsetzung der Bindungsstudie war das Umlösen der erhaltenen Fraktionen in einer zu großen und nachträglich nicht reduzierbaren Menge DMSO, sodass die Fraktionen mit einer DMSO-Konzentration von 1 % auf den Zellen getestet werden mussten. Auf diese DMSO-Konzentration reagierten die Zellen bereits empfindlich, erkennbar an der geringeren Viabilität der mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Das Vorgehen wurde bei den nachfolgend produzierten Fraktionen verbessert, die Fraktionen in geringerer Menge DMSO gelöst und mit 0,7 % DMSO im Zellassay getestet. Das Lösen in möglichst geringer Menge DMSO ist allerdings immer eine Gratwanderung. Das Lösen muss sorgfältig beobachtet und die Menge an Lösungsmittel ggf. erhöht werden, da immer gewährleistet werden muss, dass sich die Fraktionen komplett und homogen lösen.

Das etablierte Aufreinigungsschema besteht aus der Abreicherung inaktiver, lipophiler Substanzen durch Verdünnen des in DMSO gelösten Rohextraktes FvT_A in großer Menge H₂O + 0,1 % AcOH, der Abreicherung weiterer inaktiver, stark polarer Substanzen durch Normalphase-HPLC an einer

Pharmprep60CC SiO₂-Säule und der Auftrennung des aktiven Durchlaufs durch Umkehrphase-ähnliche HPLC an einer Amberlite® XAD7HP-Säule und H₂O-ACN-Gradientenelution. Wie oben erwähnt, sind die aktiven Fraktionen F15/F16 im eher hydrophilen Bereich des Eluenten zu finden.

Der Einsatz makroporöser Harze zur Aufreinigung von Phlorotanninen aus Braunalgenrohextrakten ist inzwischen eingehender untersucht und aufgrund der Überlegenheit zu anderen Methoden, u.a. der guten Adsorptions- und Desorptionseigenschaften für Phlorotannine und der Wiederverwendbarkeit, empfohlen worden [Leyton et al. 2017; Kim et al. 2014]. Kim et al. [2014] sammelten Erfahrungen mit den vier Adsorbtionsharzen HP-20, SP-850, XAD-7HP und XAD-2 für die Aufreinigung von Phlorotanninen aus der Braunalge *Ecklonia cava*. HP-20 schnitt dabei am besten ab. Leyton et al. [2017] haben die Materialien HP-20, SP-850, XAD-7, XAD-16N, XAD-4 und XAD-2 zur Aufreinigung von Phlorotanninen aus der Braunalge *Macrocystis pyrifera* erforscht. In jener Studie wurde XAD-16N als am besten befunden. Auch in der vorliegenden Arbeit sind Trennerfolge mit XAD16 (\cong XAD16N) erzielt worden, und zwar in der vorbereitenden Grobfractionierungsstudie. In der Bindungsstudie erwiesen sich dann auch XAD7HP und XAD1180 als sehr gut geeignet für die Aufreinigung der Anti-Krebs-Wirkstoffe aus *F. vesiculosus*. Die Bioaktivität war bei allen drei Materialien sehr gut wiederaufzufinden, die aktiven Substanzen zeigten unter den gewählten Bedingungen eine gute Bindung und waren gut zu eluieren. Die letztendliche Materialauswahl basierte auf der Verwendbarkeit der Materialien für Säulen.

Andere Arbeitsgruppen verwendeten zur Aufreinigung von Phlorotanninen aus Rohextrakten u.a. die Methoden Flüssig-Flüssig-Extraktion in Ethylacetat [Catarino et al. 2019; Shibata et al. 2015], gefolgt von Ultrafiltration oder Gelfiltrationschromatographie mittels Sephadex LH-20 (Dextrangel) [Wang, Jónsdóttir et al. 2012]. Oder aber sie verwendeten Dünnschichtchromatographie mittels Kieselgel [Nakamura et al. 1996], NP-HPLC an Kieselgel (LiChrospher Si 60) [Koivikko et al. 2007], RP-HPLC an einer Phenomenex C18-Säule [Parys et al. 2010] oder auch die Zentrifugalverteilungs-Chromatographie [Lee, Ko et al. 2014]. Üblich ist eine vorhergehende Entfernung von lipophilen Substanzen aus dem Rohextrakt mittels *n*-Hexan [Catarino et al. 2019; Koivikko et al. 2007] oder Dichlormethan [Parys et al. 2010]. Wie oben bereits angeführt, wird ein mit Phlorotanninen angereicherter Rohextrakt üblicherweise mit wässrigen Mischungen organischer Lösungsmittel, wie Methanol, Ethanol, Aceton oder Acetonitril, hergestellt [Santos et al. 2019; Vissers et al. 2017; Wang, Jónsdóttir et al. 2012; Koivikko et al. 2005; Ragan und Glombitza 1986]. Umfassende Übersichten zu den bisher verwendeten Extraktions- und Aufreinigungsmethoden für Phlorotannine aus Braunalgen sind in Santos et al. [2019] sowie in Isaza Martínez und Torres Castañeda [2013] veröffentlicht worden. Aufgrund der strukturellen Vielfaltigkeit von Phlorotanninen und ihrer möglichen Einsatzgebiete dürfte es aber kein Standardprotokoll für ihre Aufreinigung geben. Letztendlich muss eine

Aktivitäts-geleitete Fraktionierung immer maßgeschneidert auf die ursprünglich ermittelte Bioaktivität hin erfolgen [Weller 2012]. Dies ist in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Aufreinigungsstufen vom Rohextrakt über eine grob gereinigte Fraktion (X16_3) bis hin zu einer stark aufgereinigten Fraktion (F15/F16) reproduzierbar gelungen.

4.4 Ansatzweise Strukturaufklärung und Versuch der De-Replikation

Untersuchungen zur chemischen Struktur mittels verschiedener 1D- und 2D-NMR-Techniken, DOSY, UV- und IR-Spektroskopie ergaben, dass die in F15/F16 nachgewiesene Aktivität von zwei strukturell verwandten Substanzen verursacht wird, die der Gruppe der Polyphenole angehören. Der phenolische Charakter der aktiven Substanzen wurde zunächst von den erhaltenen ¹H-NMR- und UV-Spektroskopie-Daten in Kombination mit den Ergebnissen des Folin-Ciocalteu- und des Hitzestabilitäts-Assays abgeleitet und anschließend mittels weiterer NMR-Techniken und der IR-Spektroskopie bestätigt. Von den erhaltenen Daten wurde weiterhin abgeleitet, dass es sich bei beiden Substanzen um stark symmetrische und stark substituierte aromatische Stoffe handelt, ohne ein Vorhandensein von Alkyl-Substituenten am aromatischen Ring. In der Summe führten die erhaltenen Strukturdaten und deren Vergleich mit Literaturdaten [Parys et al. 2010] zu der Schlussfolgerung, dass die beiden aktiven Substanzen der Gruppe der Phlorotannine angehören. Der finale Nachweis zur chemischen Struktur ist jedoch noch nicht gelungen [persönliche Kommunikation mit Dr. Roland Geyer und Dr. Markus Fuhrmann, numares AG].

Phlorotannine sind Polymere des Phloroglucinols (1,3,5-Trihydroxybenzen), die, abhängig von der Art der Bindungen zwischen den Phloroglucinol-Bausteinen, in Fucole, Phlorethole und Fucophlorethole eingeteilt werden [Ragan und Glombitza 1986]. Nach Ragan und Glombitza [1986] sind aussagekräftige Massenspektrometriedaten nötig, um mit Sicherheit aussagen zu können, dass die in F15/F16 aufgefundenen Wirkstoffe Phlorotannine sind. Deren Massenspektrometrieanalyse hat sich jedoch als schwierig herausgestellt, da sich die aufgefundenen Wirkstoffe sehr ähnlich sind und da sie, vermutlich aufgrund einer höhermolekularen Struktur, eine hohe Tendenz haben, während der Ionisierung zu fragmentieren bzw. da nach ESI wohl ein Gemisch unterschiedlicher Derivate vorliegt. Um besser auswertbare und aussagekräftige Massenspektren zu erhalten, muss die bisher durchgeführte HPLC-MS-Methode optimiert werden.

Ein diesbezüglicher Ansatzpunkt, der durch freundliche Unterstützung von Dr. Karsten Homann-Peiker von der Planton GmbH angegangen worden ist, ist die weitere Verbesserung der Trennung der Substanzen in F15/F16 während der analytischen HPLC. Durch die Verwendung einer anderen Trennsäule (NUCLEODUR Sphinx RP-Säule (250 mm * 2 mm, 3 µm) von MN anstatt Phenomenex monolithische C18-Säule (Onyx monolithic C18, 100 mm * 3 mm)), eines anderen Lösungsmittels (B:

MeOH statt ACN) sowie eines veränderten Gradienten konnten die Peaks der analytischen HPLC deutlich besser aufgelöst werden (Anhang 7, Abb. A.20). In den daraufhin erhaltenen Massenspektren wurden allerdings noch immer eine hohe Zahl an Hauptsignalen sowie eine Reihe von Hintergrundsignalen beobachtet, welche die Auswertung und Dateninterpretation weiterhin schwierig erschienen ließen (Anhang 7, Abb. A.20). Auffällig war jedoch, dass sich die Hauptsignale jeweils in m/z 62 unterschieden. Dies könnte ein Hinweis auf eine regelmäßige Abspaltung von Ethylenglycol ($C_2H_6O_2$) sein. Möglicherweise ist es auch ein Hinweis auf das Vorliegen eines Phlorotannins. Denn bei Lopes et al. [2018] taucht dieses Fragment ebenfalls auf, und zwar bei einem Phlorotannintrimer aus *Fucus guiryi* von der Küste Nordportugals. In Lopes et al. [2018] wird das Fragment als Summe aus den bei Phlorotanninen typischen Fragmenten m/z 18 (Wasser) + m/z 44 (möglicherweise Ethylengruppe und Wasser) beschrieben und Letzteres als Fragment, das bei der Spaltung des Phloroglucinolrings entstehen kann. Auch bei Catarino et al. [2019] taucht dieses Fragment auf, und zwar bei einem höhermolekularen Phlorotannin.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der MS-Analytik, welcher allerdings früher eingreift, ist das Hinzufügen eines weiteren Aufreinigungsschrittes an das bisher etablierte präparative Aufreinigungsschema. Entsprechend der Ergebnisse der ursprünglichen Bindungsstudie würde sich eine RP-Chromatographie an einem C-Material als zusätzlicher Feinreinigungsschritt tatsächlich anbieten. In jener Studie zeigten Fraktionen des Rohextraktes FvT_A, die mittels MeOH bzw. ACN von verschiedenen C-Materialien eluiert worden sind, mittlere Aktivitäten. Allerdings wurde in einem weiterführenden Fraktionierungs-Experiment mit FvT_A unter RP-Bedingungen, mit dem das am besten geeignete C-Material (C8- oder C18-Polygoprep von MN) und die am besten geeigneten Elutionsbedingungen (sauer, neutral oder basisch, ACN oder MeOH als Eluent) ausgewählt werden sollten, die ursprüngliche Aktivität nicht wieder aufgefunden (Anhang 8, Abb. A.21 und A.22, sowie nicht gezeigte XTT-Viabilitäts-Testungen gegenüber CEM- und Raji-Zellen der AG Prof. Peipp, UKSH Kiel). Die genauen Ursachen hierfür sind bislang unklar. Zur Etablierung der RP-Feinreinigungsmethode mit dem Langfristziel der finalen Strukturaufklärung sind daher weitere Experimente notwendig, beispielsweise unter Einsatz von F15/F16 anstatt des Rohextraktes als Ausgangsmaterial und/oder anderen C-Materialien (bspw. NUCLEODUR®, NUCLEOSIL® von MN).

Ein dritter Ansatzpunkt ist die Veränderung der MS-Bedingungen, um der ursprünglich beobachteten Fragmentierung (Abb. 3.31 und 3.32) entgegenzuwirken. Dieser Ansatz wurde bei der oben genannten weiteren HPLC-MS-Messung durch veränderte Bedingungen bei der Elektrospray-Ionisation (5500 V, 150 °C, N_2 -Fluss = 10 l/min anstatt 4000 V, 320 °C, N_2 -Fluss = 9 l/min) bereits

realisiert. Die methodischen Änderungen erzielten aber, wie oben erwähnt, noch keine klar auswertbaren Ergebnisse.

Im Allgemeinen gestalten folgende Eigenschaften die Identifikation und Strukturaufklärung von Phlorotanninen als sehr schwierig: ihre Größe und Komplexität, die drastisch steigende Anzahl möglicher Strukturen für Moleküle mit einem Polymerisationsgrad > 2 sowie ihre große strukturelle Ähnlichkeit untereinander. Letzteres ist dafür verantwortlich, dass in den Ergebnissen analytischer Verfahren, wie der NMR, für verschiedene Substanzen nur haarfeine Unterschiede auftreten. Ein weiterer erschwerender Faktor ist, dass Phlorotanninstandards kommerziell nicht verfügbar sind [Santos et al. 2019; Ford et al. 2019; Catarino et al. 2019; Steevensz et al. 2012; Wang, Jónsdóttir et al. 2012]. Parys et al. [2010] gelang es dennoch, verschiedene Phlorotannine mit bis zu 7 Phloroglucinoleinheiten (PGU) aus *F. vesiculosus* mittels ^1H und ^{13}C -NMR, HMBC, HSQC und LC-ESI-MS in ihrer Struktur aufzuklären. In einer neueren Arbeit wurden verschiedene Phlorotannine mit bis zu 27 PGU aus *Laminaria digitata* mittels ^1H , ^{13}C -NMR, RP-UHPLC-ESI-MS/MS und MALDI-TOF-MS charakterisiert [Vissers et al. 2017]. Ein wesentlicher Ansatzpunkt bei der Identifizierung von Phlorotanninen ist, die Art der Bindungen zwischen den Phloroglucinolbausteinen zu bestimmen. Was Parys et al. [2010] und Vissers et al. [2017] mittels ^{13}C -NMR und MS geschafft haben, ist in der vorliegenden Arbeit bisher nicht gelungen, da neben der noch nicht optimalen MS-Methodik die durchgeführte ^{13}C -NMR wiederholt keine Signale ergeben hatte. Der Grund für Letzteres war nachweislich nicht eine mangelhafte Methodik, sondern das Vorhandensein ausschließlich quartärer C-Atome. Umso wichtiger scheint für die Strukturaufklärung der Wirksubstanzen in F15/F16 das Gelingen einer aussagekräftigen MS zu sein. Eine weitere Option dafür wäre möglicherweise noch der Einsatz von MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator), ein Verfahren, das laut Literatur zur Ionisierung größerer Moleküle besser geeignet ist als ESI [Santos et al. 2019].

Trotz der bestehenden Restunsicherheit hinsichtlich der spezifischen Substanzklasse und Struktur kann bereits zu diesem Zeitpunkt ein Versuch der Dereplikation vorgenommen werden, um frühzeitig abzuklären, ob die aufgefundenen Wirkstoffe nicht schon bekannt sind. Hierfür eignen sich die ermittelten Molekulargewichte von 1331 g/mol ($\pm 5\%$) für Substanz 1 und 1173 g/mol ($\pm 5\%$) für Substanz 2. In der Annahme, dass die beiden Wirkstoffe Phlorotannine sind, kann anhand der genannten Molekulargewichte und anhand des Molekulargewichts des Phlorotannin-Monomers Phloroglucinol von 126,11 g/mol - zunächst unter Vernachlässigung möglicher Substituenten - die Anzahl der Untereinheiten der Wirkstoffe abgeschätzt werden. Nach dieser ersten Näherung besteht Substanz 1 aus mindestens zehn und Substanz 2 aus mindestens acht Untereinheiten. Seit den 70-er

Jahren ist bereits eine Vielzahl von Phlorotanninen aus *F. vesiculosus* isoliert worden, die meisten durch Prof. Glombitza und seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Pharmazeutische Biologie an der Universität Bonn [Isaza Martínez und Torres Castañeda 2013]. Die meisten der bisher aus *F. vesiculosus* isolierten und mindestens ansatzweise aufgeklärten Phlorotannine bestehen jedoch aus weniger als acht PGU bzw. weisen ein geringeres Molekulargewicht auf als die Wirkstoffe aus F15/F16 [Catarino et al. 2019; Heavisides et al. 2018; Lopes et al. 2018; Hermund et al. 2018; Agregán et al. 2017; Heffernan et al. 2015; Wang, Jónsdóttir et al. 2012; Liu und Gu 2012; Steevensz et al. 2012; Parys et al. 2010; Koivikko et al. 2007; Sandsdalen et al. 2003; Ragan und Glombitza 1986; Geiselman und McConnell 1981]. Andere aus *F. vesiculosus* isolierte Phlorotannine sind hochmolekular und weisen mit 2,7 bis $6,5 \cdot 10^5$ g/mol bedeutend größere Molekulargewichte auf als Substanz 1 und 2 [McInnes et al. 1984].

Heffernan et al. [2015] haben in *F. vesiculosus*-Extrakten von im Herbst gesammelten Spezies der Küste Irlands mittels UPLC-QQQ-MS/MS (für engl. Ultra Performance Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry) auch Phlorotannine mit neun bis dreizehn PGU nachgewiesen. Jedoch wurden diese Substanzen nur ansatzweise, hinsichtlich ihres Molekulargewichts und Polymerisierungsgrads, aufgeklärt. Da keine weiteren Strukturdaten in jener Publikation angegeben worden sind, ist eine detaillierte Dereplikation hinsichtlich dieser Substanzen nicht möglich.

Wang, Jónsdóttir et al. [2012] isolierten aus im Oktober vor der Küste Islands gesammeltem *F. vesiculosus* 21 Phlorotannine, von denen drei mittels HPLC-ESI-MSⁿ ansatzweise als Nonamere und eins als Dekamer aufgeklärt worden sind. Dennoch ist es eher unwahrscheinlich, dass jene Substanzen mit den Wirkstoffen aus F15/F16 übereinstimmen, da sich die publizierten Molekulargewichte (1118 g/mol für die Nonamere und 1242 g/mol für das Dekamer) vom erhaltenen Molekulargewicht-Mittelwert der Wirkstoffe aus F15/F16 unterscheiden - auch wenn die Unsicherheit von 5 % für Substanz 2 das publizierte Molekulargewicht der Nonamere gerade noch mit einschließt. Auch vor dem Hintergrund des für Substanz 1 und 2 ermittelten hohen Grad an Symmetrie und der Tatsache, dass sich Sammelorte und Sammelzeitpunkte der jeweils extrahierten Algenmaterialien deutlich voneinander unterscheiden, ist eine Übereinstimmung der Wirksubstanzen aus F15/F16 mit den in Wang, Jónsdóttir et al. [2012] beschriebenen Substanzen eher unwahrscheinlich. Auch Catarino et al. [2019] detektierten in *F. vesiculosus*, welcher im Juli von der Küste Nordportugals gesammelt worden ist, mittels UHPLC-ESI-MS/MS neben geringmolekularen Phlorotanninen auch Phlorotannine mit mehr als 8 PGU. Darunter waren auch Phlorotannine, die mit 1118 g/mol und 1242 g/mol die gleichen molekularen Massen aufwiesen wie jene, die in Wang, Jónsdóttir et al. [2012] publiziert worden sind. Weitere detektierte Phlorotannine wiesen Molekulargewichte von 1180, 1304 und 1366 g/mol auf und fielen damit ebenfalls in den Bereich der 5 %-igen Unsicherheit

für die Substanzen 1 und 2. Allerdings konnten auch Catarino et al. [2019] keine ausführlichen Daten zur Strukturaufklärung liefern, sodass auch hier eine detaillierte Dereplikation nicht möglich ist.

Ebenso detektierten Steevensz et al. [2012] in *F. vesiculosus*, welcher im Oktober in Neuschottland, Canada gesammelt worden ist, mittels UHPLC-ESI-HRMS auch Phlorotannine mit mehr als 8 PGU, lieferten jedoch ebenfalls keine ausführlichen Strukturdaten.

Zusammenfassend kann aus dem Abgleich mit den bisher publizierten Daten geschlossen werden, dass die in F15/F16 aufgefundenen Wirkstoffe mit großer Wahrscheinlichkeit noch unbekannt bzw. noch nicht detailliert beschrieben sind. Für eine abgesicherte Aussage ist jedoch die finale Strukturaufklärung nötig.

4.5 Aussichten

Als weiterer Schritt in der Entwicklung der aufgefundenen Wirkstoffe gegen Pankreaskrebs aus *F. vesiculosus* als Therapeutikum wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zu den Mechanismen, über die sie in den Pankreaskrebszellen den Zelltod induzieren, durchgeführt. Für jene Experimente, die Gegenstand der Dissertation von Dr. Ulf Geisen, UKSH Kiel [2015], waren, wurde die gepoolte Fraktion F15/F16 (Reproduktion), in jener Arbeit Fv1 bzw. KF1 genannt, verwendet. Dr. Geisen fand heraus, dass der Wirkmechanismus von Fv1 vergleichbar mit dem von Chemotherapeutika ist: Fv1 inhibierte proliferierende Zellen über die Induktion des Zellzyklus-abhängigen Zelltods, beeinflusste jedoch ruhende Zellen wie kontakt-inhibierte PDAC-Zellen und nicht-maligne mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) nicht. Über die Messung der Hämoglobin-Freisetzung behandelter frischer roter Blutzellen von gesunden Spendern und die Lactat Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung behandelter Panc89-Zellen wurde des Weiteren gezeigt, dass Fv1 keine akute Zytotoxizität aufweist [Geisen 2015; Geisen et al. 2015]. In weiteren Untersuchungen des Projektpartners UKSH zu den Wirkmechanismen von Fv1 wurden die bisherigen Erkenntnisse zum induzierten Zelltod bestätigt [Plenge 2018]. Darüber hinaus wäre es interessant zu prüfen, welche weiteren Signalwege die aufgefundenen Wirkstoffe beeinflussen. Gibt es womöglich eine Beeinflussung des zentralen NF- κ B-Signalwegs, wie es für das Phlorotannin Eckol in der PDAC-Zelllinie SW1990 [Zhang, Zhou et al. 2019], für das Dieckol aus der Braunalge *Ecklonia cava* in Brustkrebszellen [Lee et al. 2020] oder für Fucoïdan aus der Braunalge *Turbinaria conoides* in den PDAC-Zelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 [Delma et al. 2019] bereits nachgewiesen worden ist? Auch wäre es interessant zu prüfen, ob die aufgefundenen Wirkstoffe gegenüber Pankreaskrebsstammzellen aktiv sind, wie es Aravindan et al. [2015] für Polyphenole aus indischen Braunalgenarten gezeigt hatten. Derartige Aktivitäten würden die *F. vesiculosus*-Wirkstoffe für die Entwicklung als Therapeutikum zusätzlich attraktiv machen. Weitere nächste Schritte bei dieser Entwicklung wären die finale Aufreinigung der Wirkstoffe, um deren chemische Struktur final aufklären zu können sowie

Aktivitäts- und Toxizitätstests *in vivo* und Untersuchungen zur Wirkstoffaufnahme und Bioverfügbarkeit.

Auch hat es Potential, die aktiven Stoffe der Fraktionen des zweiten aufgefundenen Wirkungspeaks, F36/F37, zu identifizieren. Vielleicht verstecken sich dahinter Wirkstoffe mit besseren Eigenschaften oder zielgerichteteren Mechanismen. Dafür müsste jedoch zunächst das Aufreinigungsschema weiter optimiert werden.

Aufgrund des Rückgangs der *F. vesiculosus*-Populationen in der westlichen Ostsee [Vogt und Schramm 1991] müssten außerdem Strategien etabliert werden, die eine ökologisch vertretbare Versorgung mit dem Algenmaterial sicherstellen. Erste Versuche, *F. vesiculosus* mit Hilfe von fertilem Material, das aus einer benachbarten Bucht des ursprünglichen Sammelstandorts in der Kieler Förde gesammelt worden ist, zu kultivieren, waren vielversprechend [Maczassek 2014]. Andere Experimente bezüglich einer Aquakultur durch vegetative Vermehrung, im Detail zum Überleben und Wachstum von frei schwimmendem *F. vesiculosus* für eine sog. Offshore-Aquakultur, waren ebenfalls erfolgreich [Meichßner 2016]. Die Umsetzung der Kultivierung von *F. vesiculosus* in der Ostsee wird von der CAU Kiel durch Rafael Meichßner und Prof. Dr. Rüdiger Schulz in Kooperation mit CRM - Coastal Research & Management Kiel weiterhin erforscht und entwickelt [CAU Kiel 2019 - *Internetquelle*]. Offenbar kann *F. vesiculosus* inzwischen aus der Aquakultur eines portugiesischen Unternehmens bezogen werden [Lopes et al. 2018, Algaplus 2018 - *Internetquelle*]. Weitere Wege könnten die Synthese der Wirkstoffe auf chemischem Weg oder deren Produktion mittels gentechnisch veränderter Mikroorganismen, auch *metabolic engineering* genannt, sein. Letzteres ist beispielweise für das sonst aus Trauben oder anderen Früchten isolierte Polyphenol Resveratrol gelungen, das inzwischen in *E. coli* [Jeong et al. 2015] und in *Saccharomyces cerevisiae* [Wang et al. 2011] produziert werden kann.

Sollte weiterhin auf Algenmaterial zurückgegriffen werden, so sollte der Sammelzeitpunkt möglichst mit dem Zeitpunkt des höchsten Gehalts der ermittelten Wirkstoffe korrelieren. Aufschlussreiche Untersuchungen zum Thema wurden in jüngerer Vergangenheit von einer Kieler Arbeitsgruppe am GEOMAR (Prof. Dr. Tasdemir) durchgeführt. In jener Studie wurden die jahreszeitlichen Unterschiede im Metabolomprofil und deren Bioaktivität des Ostsee-*F. vesiculosus*, welcher aus einer Nachbarbucht des ursprünglichen Sammelstandorts gesammelt worden ist, analysiert. Dabei wurde u.a. festgestellt, dass der Gehalt eines im komplexen Extrakt identifizierten Phlorotannin-Tetramers im Winter am geringsten und im Spätfrühling, im Mai, am höchsten ist, und dass dies gleichzeitig mit der höchsten apoptotischen Aktivität des Extrakts gegenüber Panc 1-Zellen korreliert. Weitere Phloro-

tannine im Extrakt wurden in Ihrer Struktur bisher nicht aufgeklärt [Heavisides et al. 2018]. Die Studie als sinnvolle Ergänzung zur vorliegenden Arbeit gibt, wenn auch nicht spezifisch hinsichtlich der in F15/F16 aufgefundenen Wirkstoffe, einen Hinweis darauf, dass der Erntezeitpunkt Mai/Juni für eine hohe Ausbeute der aktiven Stoffe gut gewählt war.

Neben der jahreszeitlichen Metabolomanalyse wäre auch eine vergleichende und hinsichtlich der aufgefundenen Wirkstoffe spezifische Studie mit Individuen aus der Nordsee interessant. Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob die aufgefundenen Wirkstoffe charakteristisch sind für *F. vesiculosus* aus der Ostsee, d.h. ob ihre Synthese tatsächlich eine Adaptation an die speziellen Habitatbedingungen der Ostsee ist. In der Tat wurden bereits zu anderen Aspekten Unterschiede zwischen *F. vesiculosus*-Populationen aus der Ostsee und der Nordsee beobachtet [Barboza et al. 2019; Nygård und Dring 2008; Tatarenkov et al. 2007; Pearson et al. 2000].

4.6 Zusammenfassende Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde reproduzierbar gezeigt, dass die aus der Ostsee stammende Braunalge *F. vesiculosus* signifikante zytotoxische Aktivität gegenüber humanen Pankreaskrebszelllinien aufweist. Dies ist die erste systematische Studie, die sich mit der Aufreinigung von Wirkstoffen gegen Pankreaskrebszellen aus der häufigsten und auffälligsten Braunalge der Ostsee beschäftigt hat. Damit leistet die Arbeit einerseits einen wesentlichen Beitrag für die Entwicklung neuer Therapieoptionen bei Pankreaskrebs. Andererseits trägt sie womöglich zu einer besseren Wahrnehmung des einmaligen Ökosystems Ostsee bei, welches eher bekannt ist für seine Artenarmut aufgrund des niedrigen Salzgehaltes und für seine Verschmutzung aufgrund des massiven Eintrags von Nähr- und Schadstoffen aus Landwirtschaft und Industrie [Rheinheimer 1996].

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden:

Peer-reviewed Article:

Zenthoefer, M., Geisen, U., Hofmann-Peiker, K., Fuhrmann, M., Kerber, J., Kirchhöfer, R., Hennig, S., Peipp, M., Geyer, R., Piker, L., Kalthoff, H. (2017). Isolation of polyphenols with anticancer activity from the Baltic Sea brown seaweed *Fucus vesiculosus* using biosay-guided fractionation. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 2021–2037. doi:10.1007/s10811-017-1080-z

Patent:

Zenthoefer, M., Geisen, U., Kalthoff, H., Fuhrmann, M., Kirchhöfer, R., Alban, S., Hennig, S., Piker, L., Geyer, R. (Datum der Veröffentlichung: 15.10.2015) Zytostatikum. DE102014105260, Schriftartencode: A1

Poster:

Zenthoefer, M., Geisen, U., Peipp, M., Fuhrmann, M., Ehrig, K., Stüwe-Jung, R., Geyer, R., Genzel, N., Gramatzki, M., Alban, S., Huber, F., Kirchhöfer, R., Hennig, S., Kalthoff, H., Piker, L. (2013). Anti-cancer activities of extracts from Baltic Sea brown seaweed: Preliminary results from the German Research Project Algae Against Cancer. *21st International Seaweed Symposium - Seaweed Science for Sustainable Prosperity*, Bali, Indonesien
und zugehöriger Konferenz-Abstract in: *Program & Abstract*: S. 214. International Seaweed Association.

Vortrag:

Zenthoefer, M., Piker, L., Peipp, M., Gramatzki, M., Geisen, U., Kalthoff, H., Weniger, Y., Alban, S., Hennig, S., Fuhrmann, M., Huber, F., Kirchhöfer, R. (2012). AAC – Algae Against Cancer: Preliminary data of a national research project. *SUBMARINER Blue Biotechnology Cooperation Event*, Kiel
und zugehöriger Konferenz-Abstract in: *Perspectives from the SUBMARINER Blue Biotechnology Cooperation Event - Blue Biotechnology in the Baltic Sea Region: New Strategies and Future Perspectives*: S. 41. European Union.

Folgende, die vorliegende Dissertation ergänzende Veröffentlichung ist von meinem Team-Kollegen, Herrn Dr. Ulf Geisen, vorgenommen worden:

Peer-reviewed Article:

Geisen, U., Zenthoefer, M., Peipp, M., Kerber, J., Plenge, J., Managò, A., Fuhrmann, M., Geyer, R., Hennig, S., Adam, D., Piker, L., Rimbach, G., Kalthoff, H. (2015). Molecular mechanisms by which a *Fucus vesiculosus* extract mediates cell cycle inhibition and cell death in pancreatic cancer cells. *Mar Drugs* 13(7), 4470–4491. doi: 10.3390/md13074470

Literaturverzeichnis

Wissenschaftliche Artikel, Bücher, Sammelbände, Berichte, Abschlussarbeiten, Verordnungen

- Abdala-Díaz, R. T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Conde Álvarez, R. M., & Figueroa, F. L. (2006). Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology*, *148*(3), 459–465. doi:10.1007/s00227-005-0102-6
- Abdul, Q. A., Choi, R. J., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2016). Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(6), 1856–1866. doi:10.1002/jsfa.7489
- Adikrisna, R., Tanaka, S., Muramatsu, S., Aihara, A., Ban, D., Ochiai, T., ... Arii, S. (2012). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells and Selective Toxicity of Chemotherapeutic Agents. *Gastroenterology*, *143*(1), 234–245. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.054
- Agregán, R., Munekata, P. E. S., Franco, D., Dominguez, R., Carballo, J., & Lorenzo, J. M. (2017). Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, *99*(Part 3, September 2017), 979–985. doi:10.1016/j.foodres.2017.03.043
- Ahn, J., Yang, Y., Lee, K., & Choi, J. (2015). Dieckol, isolated from the edible brown algae *Ecklonia cava*, induces apoptosis of ovarian cancer cells and inhibits tumor xenograft growth. *J Cancer Res Clin Oncol*, *141*(2), 255–268. doi:10.1007/s00432-014-1819-8
- Ahn, M.-J., Yoon, K.-D., Min, S.-Y., Lee, J. S., Kim, J. H., Kim, T. G., ... Kim, J. (2004). Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease by Phlorotannins from the Brown Alga *Ecklonia cava*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *27*(4), 544–547. doi:10.1248/bpb.27.544
- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., & Kizaki, M. (2005). Fucoidan Induces Apoptosis of Human HS-Sultan Cells Accompanied by Activation of Caspase-3 and Down-Regulation of ERK Pathways. *American Journal of Hematology*, *78*(1), 7–14. doi:10.1002/ajh.20182
- Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011 a). Fucoidan from *Sargassum sp.* and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*(3), 331–336. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.009
- Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011 b). Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Marine Drugs*, *9*(12), 2605–2621. doi:10.3390/md9122605
- Alekseyenko, T. V., Zhanayeva, S. Y., Venediktova, A. A., Zvyagintseva, T. N., Kuznetsova, T. A., Besednova, N. N., & Korolenko, T. A. (2007). Antitumor and antimetastatic activity of Fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *143*(6), 730–732. doi:10.1007/s10517-007-0226-4
- Almeida, H., Sathy, B., Dudurych, I., Buckley, C., O'Brien, F., & Kelly, D. (2017). Anisotropic Shape-Memory Alginate Scaffolds Functionalized with Either Type I or Type II Collagen for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*, *23*(1-2), 55–68. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0055
- Almeida, T. P., Ferreira, J., Vettorazzi, A., Azqueta, A., Rocha, E., & Abreu, A. R. (2018). Cytotoxic activity of fucoxanthin, alone and in combination with the cancer drugs imatinib and doxorubicin, in CML cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *59*, 24–33. doi:10.1016/j.etap.2018.02.006
- Alves de Sousa, A. P., Rocha Torres, M., Pessoa, C., Odorico de Moraes, M., Rocha Filho, F. D., Negreiros Nunes Alves, A. P., & Costa-Lotufo, L. V. (2007). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate Polymers*, *69* (1), 7–13. doi:10.1016/j.carbpol.2006.08.018
- Angst, E., Park, J. L., Moro, A., Lu, Q.-Y., Lu, X., Li, G., ... Hines, O. J. (2013). The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Pancreas*, *42*(2), 223–229. doi:10.1097/MPA.0b013e318264ccae
- Appari, M., Babu, K. R., Kaczorowski, A., Gross, W., & Herr, I. (2014). Sulforaphane, quercetin and catechins complement each other in elimination of advanced pancreatic cancer by miR-let-7 induction and K-ras inhibition. *International Journal of Oncology*, *45*(4), 1391–1400. doi:10.3892/ijo.2014.2539
- Aravindan, S., Delma, C. R., Thirugnanasambandan, S. S., Herman, T. S., & Aravindan, N. (2013). Anti-Pancreatic Cancer Deliverables from the Sea: First-Hand Evidence on the Efficacy, Molecular Targets and Mode of Action for Multifarious Polyphenols from Five Different Brown-Algae. *PLoS ONE*, *8*(4):e61977, 15 pp. doi:10.1371/journal.pone.0061977

- Aravindan, S., Ramraj, S. K., Somasundaram, S. T., Herman, T. S., & Aravindan, N. (2015). Polyphenols from marine brown algae target radiotherapy-coordinated EMT and stemness-maintenance in residual pancreatic cancer. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*(1):182, 14 pp. doi:10.1186/s13287-015-0173-3
- Aravindan, S., Ramraj, S., Kandasamy, K., Somasundaram, S. T., Somasundaram, D. B., Herma, T. S., & Aravindan, N. (2017). *Hormophysa triquerta* polyphenol, an elixir that deters CXCR4- and COX2-dependent dissemination destiny of treatment-resistant pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, *8*(4), 5717–5734. doi: 10.18632/oncotarget.13900
- Arlt, A., Schäfer, H., & Kalthoff, H. (2012). The “N-factors” in pancreatic cancer: functional relevance of NF- κ B, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis*, *1*(11): e35, 8 pp. doi:10.1038/oncsis.2012.35
- Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Dickinson, J. L., Holloway, A. F., & Woods, G. M. (2016). Fucoidan enhances the therapeutic potential of arsenic trioxide and all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia, in vitro and in vivo. *Oncotarget*, *7*(29), 46028–46041. doi: 10.18632/oncotarget.10016
- Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Woods, G. M., Holloway, A. F., Karpinić, S. S., & Dickinson, J. L. (2016). Fucoidan Suppresses the Growth of Human Acute Promyelocytic Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(3), 688–697. doi:10.1002/jcp.25119
- Athukorala, Y., Kim, K. N., & Jeon, Y. J. (2006). Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(7), 1065–1074. doi:10.1016/j.fct.2006.01.011
- Awale, S., Dibwe, D. F., Balachandran, C., Fayez, S., Feineis, D., Lombe, B. K., & Bringmann, G. (2018). Ancistrololikone E3, a 5,8'-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloid, Eliminates the Tolerance of Cancer Cells to Nutrition Starvation by Inhibition of the Akt/mTOR/Autophagy Signaling Pathway. *J. Nat. Prod.*, *81*(10), 2282–2291. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00733
- Bäck, S., Collins, J. C., & Russell, G. (1992). Effects of salinity on growth of Baltic and Atlantic *Fucus vesiculosus*. *British Phycological Journal*, *27*(1), 39–47. doi:10.1080/00071619200650061
- Banafa, A. M., Roshan, S., Liu, Y., Chen, H., Chen, M., Yang, G., & He, G. (2013). Fucoidan Induces G1 Phase Arrest and Apoptosis through Caspases-dependent Pathway and ROS Induction in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]*, *33*(5), 717–724. doi:10.1007/s11596-013-1186-8
- Banerjee, K., Kumar, S., Ross, K. A., Gautam, S., Poelaert, B., Nasser, M. W., ... Jain, M. (2018). Emerging trends in the immunotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Cell International*, *417*, 35–46. doi:10.1016/j.canlet.2017.12.012
- Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Ahmad, A., Azmi, A. S., Sarkar, S. H., ... Sarkar, F. H. (2012). Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*, *5*(3), 355–364. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0299
- Barbosa, M., Lopes, G., Ferreres, F., Andrade, P. B., Pereira, D. M., Gil-Izquierdo, Á., & Valentão, P. (2017). Phlorotannin extracts from Fucales: Marine polyphenols as bioregulators engaged in inflammation-related mediators and enzymes. *Algal Research*, *28*(Dezember 2017), 1–8. doi:10.1016/j.algal.2017.09.009
- Barboza, F. R., Kotta, J., Weinberger, F., Jormalainen, V., Kraufvelin, P., Molis, M., ... Wahl, M. (2019). Geographic variation in fitness-related traits of the bladderwrack *Fucus vesiculosus* along the Baltic Sea-North Sea salinity gradient. *Ecology and Evolution*, *9*(16), 9225–9238. doi:10.1002/ece3.5470
- Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(12), 897–909. doi:10.1038/nrc949
- Belcher, H., & Swale, E. (1976). *A beginner's guide to Freshwater Algae*. London: Her Majesty's Stationery Office, 47pp.
- Béress, A., Wassermann, O., Bruhn, T., Béress, L., Kraiselburd, E. N., Gonzalez, L. V., ... Chavez, P. I. (1993). A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Natural Products*, *56*(4), 478–488. doi:10.1021/np50094a005
- Bernhard, K., Stöhr, R., Piker, L., & Plieth, C. (2012). The antioxidative properties of fucoidans are based on their superoxide scavenging activities. *Unpublished Manuscript*.
- Berteau, O., & Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, *13*(6), 29R–40R. doi:10.1093/glycob/cwg058
- Bhagwandin, V. J., Bishop, J. M., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2016). The Metastatic Potential and Chemoresistance of Human Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS ONE*, *11*(2):e0148807, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0148807
- Bhakuni, D., & Rawat, D. (2005). Separation and Isolation Techniques. In: D. Bhakuni & D. Rawat (Eds.), *Bioactive Marine Natural Products* (pp. 64–79). Springer: New York und Anamaya Publishers: New Delhi, India.

- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., ... Mukhopadhyay, D. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, *491*(7424), 399–405. doi:10.1038/nature11547
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Kelly, M., Sanderson, C. J., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I. (2010). Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydrate Research*, *345*(14), 2038–2047. doi:10.1016/j.carres.2010.07.009
- Bimonte, S., Barbieri, A., Leongito, M., Piccirillo, M., Giudice, A., Pivonello, C., ... Izzo, F. (2016). Curcumin AntiCancer Studies in Pancreatic Cancer. *Nutrients*, *8*(7):433, 12 pp. doi:10.3390/nu8070433
- Bittkau, K. S., Dörschmann, P., Blümel, M., Tasdemir, D., Roeder, J., Klettner, A., & Alban, S. (2019). Comparison of the Effects of Fucoidans on the Cell Viability of Tumor and Non-Tumor Cell Lines. *Marine Drugs*, *17*(8):441, 19 pp. doi:10.3390/md17080441
- Bixler, H. J., & Porse, H. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*, *23*(3), 321–335. doi:10.1007/s10811-010-9529-3
- Blaszczak, W., Lach, M. S., Barczak, W., & Suchorska, W. M. (2018). Fucoidan Exerts Anticancer Effects Against Head and Neck Squamous Cell Carcinoma In Vitro. *Molecules*, *23*(12): 3302, 15 pp. doi:10.3390/molecules23123302
- BMG - Bundesministerium für Gesundheit (2018). *Deutsche Trinkwasserverordnung (TrinkwV)*. Änderungsverordnung, mit dem Datum vom 8. Januar 2018 im Bundesgesetzblatt veröffentlicht, am 9. Januar 2018 Inkraft getreten.
- Boopathy, N. S., & Kathiresan, K. (2010). Anticancer Drugs from Marine Flora: An overview. *Journal of Oncology*, *2010*:214186, 18 pp. doi:10.1155/2010/214186
- Bourrelly, P. (1981). *Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II: Les Algues jaunes et brunes, Chrysophycées, Phaeophycées, Xanthophycées et Diatomées*. (2nd ed.). Paris: Editions N. Boubée & Cie, 517 pp.
- Bucar, F., Wube, A., & Schmid, M. (2013). Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, *30*(4), 525–545. doi:10.1039/c3np20106f
- Burney, M., Mathew, L., Gaikwad, A., Nugent, E. K., Gonzalez, A. O., & Smith, J. A. (2018). Evaluation Fucoidan Extracts from *Undaria pinnatifida* and *Fucus vesiculosus* in Combination with Anticancer Drugs in Human Cancer Orthotopic Mouse Models. *Integrative Cancer Therapies*, *17*(3), 755–761. doi:10.1177/1534735417740631
- Burrell, R. (1994). Human responses to bacterial endotoxin. *Circulatory Shock*, *43*(3), 137–153.
- Burriss, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., ... Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in Survival and Clinical Benefit with Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients with Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *15*(6), 2403–2413. doi:10.1200/JCO.1997.15.6.2403
- Burtin, P. (2003). Nutritional Value of Seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *2*(4), 498–503.
- Cabrita, M. T., Vale, C., & Rauter, A. P. (2010). Halogenated Compounds from Marine Algae. *Marine Drugs*, *8*(8), 2301–2317. doi:10.3390/md8082301
- Catarino, M. D., Silva, A. M., & Cardoso, S. M. (2017). Fucaceae: A Source of Bioactive Phlorotannins. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6):1327, 30 pp. doi:10.3390/ijms18061327
- Catarino, M. D., Silva, A. M. S., Mateus, N., & Cardoso, S. M. (2019). Optimization of Phlorotannins Extraction from *Fucus vesiculosus* and Evaluation of Their Potential to Prevent Metabolic Disorders. *Marine Drugs*, *17*(3):162, 23 pp. doi:10.3390/md17030162
- Chakraborty, S., & Singh, S. (2013). Surgical resection improves survival in pancreatic cancer patients without vascular invasion- a population based study. *Annals of Gastroenterology*, *26*(4), 346–352.
- Chapman, V. J. (1970). *Seaweeds and Their Uses* (2nd ed.). London: Methuen & Co. Ltd, 304 pp.
- Chen, M.-C., Hsu, W.-L., Hwang, P.-A., & Chou, T.-C. (2015). Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Marine Drugs*, *13*(7), 4436–4451. doi:10.3390/md13074436
- Chen, S., Zhao, Y., Zhang, Y., & Zhang, D. (2014). Fucoidan Induces Cancer Cell Apoptosis by Modulating the Endoplasmic Reticulum Stress Cascades. *PLoS ONE*, *9*(9): e108157, 10 pp. doi:10.1371/journal.pone.0108157
- Chengkui, Z., Tseng, C.K., Junfu, Z., & Chang, C.F. (1984). Chinese seaweeds in herbal medicine. *Hydrobiologia* *116*, 152–154. doi:10.1007/BF00027655
- Chevolot, L., Foucault, A., Chaubet, F., Kervarec, N., Siquin, C., Fisher, A.-M., & Boisson-Vidal, C. (1999). Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, *319*(1-4), 154–165. doi:10.1016/s0008-6215(99)00127-5

- Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., & Collic-Jouault, S. (2001). A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, 330(4), 529–535. doi:10.1016/S0008-6215(00)00314-1
- Cho, H. M., Doan, T. P., Ha, T. K. Q., Kim, H. W., Lee, B. W., Pham, H. T. T., ... Oh, W. K. (2019). Dereplication by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectroscopy (qTOF-MS) and Antiviral Activities of Phlorotannins from *Ecklonia cava*. *Marine Drugs*, 17(3):149, 18 pp. doi:10.3390/md17030149
- Cho, T.-M., Kim, W.-J., & Moon, S.-K. (2014). AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 344–352. doi:10.1016/j.fct.2013.12.009
- Chu, G. C., Kimmelman, A. C., Hezel, A. F., & DePinho, R. A. (2007). Stromal Biology of Pancreatic Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 887–907. doi:10.1002/jcb.21209
- Chung, T.-W., Choi, H.-J., Lee, J.-Y., Jeong, H.-S., Kim, C.-H., Joo, M., ... Ha, K.-T. (2013). Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(4), 580–585. doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.019
- Church, F. C., Meade, J. B., Treanor, R. E., & Whinna, H. C. (1989). Antithrombin Activity of Fucoidan. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(6), 3618–3623.
- Cock, J. M., Peters, A. F., & Coelho, S. M. (2011). Brown algae. *Current Biology*, 21(15), R573–R575. doi:10.1016/j.cub.2011.05.006
- Cock, J. M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A. E., Amoutzias, G., ... Wincker, P. (2010). The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465(7298), 617–621. doi:10.1038/nature09016
- Cong, Q., Chen, H., Liao, W., Xiao, F., Wang, P., Qin, Y., ... Ding, K. (2016). Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrate Polymers*, 136, 899–907. doi:10.1016/j.carbpol.2015.09.087
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E., & Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica Marina*, 49(1), 39–46. doi:10.1515/BOT.2006.005
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... Intergroup, for the G. T. D. of U. and the P. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817–1825. doi:10.1056/NEJMoa1011923
- Council of Europe (Ed.) (2013). *European Pharmacopoeia 7th Edition* (7th ed.). Strasbourg, France: EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.
- Council of Europe (Ed.) (2017). *European Pharmacopoeia 9th Edition* (9th ed.). Strasbourg, France: EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.
- Crane, C. H., Varadhachary, G. R., Yordy, J. S., Staerckel, G. A., Javle, M. M., Safran, H., ... Wolff, R. A. (2011). Phase II Trial of Cetuximab, Gemcitabine, and Oxaliplatin Followed by Chemoradiation With Cetuximab for Locally Advanced (T4) Pancreatic Adenocarcinoma: Correlation of Smad4 (Dpc4) Immunostaining With Pattern of Disease Progression. *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), 3037–3043. doi:10.1200/JCO.2010.33.8038
- Crane, C. H., Winter, K., Regine, W. F., Safran, H., Rich, T. A., Curran, W., ... Willet, C. G. (2009). Phase II Study of Bevacizumab With Concurrent Capecitabine and Radiation Followed by Maintenance Gemcitabine and Bevacizumab for Locally Advanced Pancreatic Cancer: Radiation Therapy Oncology Group RTOG 0411. *Journal of Clinical Oncology*, 27(25), 4096–4102. doi:10.1200/JCO.2009.21.8529
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D’Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., ... Nifantiev, N. E. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17(5), 541–552. doi:10.1093/glycob/cwm014
- Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., & Cerezo, A. S. (2004). Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 11(18), 2399–2419. doi:10.2174/0929867043364504
- Dawson, M. E. (1998). The Significance of Endotoxin to Cell Culture and Biotechnology. *LAL Update* 16(1), March 2018. Technical Report, Associates of Cape Cod Incorporated, 4 pp.
- Delcuve, G. P., Rastegar, M., & Davie, J. R. (2009). Epigenetic Control. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), 243–250. doi:10.1002/jcp.21678
- Delma, C. R., Somasundaram, S. T., Srinivasan, G. P., Khursheed, M., Bashyam, M. D., & Aravindan, N. (2015). Fucoidan from *Turbinaria conoides*: A multifaceted “deliverable” to combat pancreatic cancer progression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 447–457. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.12.031

- Delma, C. R., Thirugnanasambandan, S., Srinivasan, G. P., Raviprakash, N., Manna, S. K., Natarajan, M., & Natarajan, A. (2019). Fucoidan from marine brown algae attenuates pancreatic cancer progression by regulating p53 – NFκB crosstalk. *Phytochemistry*, *167*:112078. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112078
- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B., & Hervé, C. (2017). A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydrate Polymers*, *175*, 395–408. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.082
- Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., ... Kurzrock, R. (2008). Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, *14*(14), 4491–4499. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0024
- DG Mare - DG Maritime Affairs and Fisheries (2013). Study in support of Impact Assessment work on Blue Biotechnology. *Interim Report FWC MARE/2012/06 – SC E1/2012/01*, ECORYS Nederland BV, 76 pp.
- Ding, X.-Z., & Adrian, T. E. (2002). Resveratrol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas*, *25*(4), e71–e76. doi:10.1097/00006676-200211000-00024
- Dithmer, M., Kirsch, A.-M., Richert, E., Fuchs, S., Wang, F., Schmidt, H., ... Klettner, A. (2017). Fucoidan Does Not Exert Anti-Tumorigenic Effects on Uveal Melanoma Cell Lines. *Marine Drugs*, *15*(7):193, 14 pp. doi:10.3390/md15070193
- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjag-Braek, G. (2005). Alginates from Algae. In: A. Steinbüchel & S. K. Rhee (Eds.), *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry* (pp. 215–240). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Duan, J., Yue, W., E, J., Malhotra, J., Lu, S., Gu, J., ... Tan, X.-L. (2016). In vitro comparative studies of resveratrol and triacetylresveratrol on cell proliferation, apoptosis, and STAT3 and NFκB signaling in pancreatic cancer cells. *Scientific Reports*, *6*:31672, 10 pp. doi:10.1038/srep31672
- Ducreux, M., Seufferlein, T., Van Laethem, J. L., Laurent-Puig, P., Smolenschi, C., Malka, D., Boige, V., Hollebecque, A., & Conroy, T. (2019). Systemic treatment of pancreatic cancer revisited. *Seminars in oncology*, *46*(1), 28–38. doi:10.1053/j.seminoncol.2018.12.003
- Dürig, J., Bruhn, T., Zurborn, K.-H., Gutensohn, K., Bruhn, H. D., & Béress, L. (1997). Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro. *Thrombosis Research*, *85*(6), 479–491. doi:10.1016/s0049-3848(97)00037-6
- Duffy, A., Kortmanský, J., Schwartz, G. K., Capanu, M., Puleio, S., Minsky, B., ... O'Reilly, E. M. (2008). A phase I study of erlotinib in combination with gemcitabine and radiation in locally advanced, non-operable pancreatic adenocarcinoma. *Annals of Oncology*, *19*(1), 86–91. doi:10.1093/annonc/mdm441
- Ebers, G. (Ed.). (1875). *Papyrus Ebers. Das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift*. Leipzig: Engelmann.
- Elsässer, H., Lehr, U., Agricola, B., & Kern, H. (1993). Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, *64*(4), 201–207. doi:10.1007/BF02915113
- Eo, H. J., Kwon, T.-H., Park, G. H., Song, H. M., Lee, S.-J., Park, N.-H., & Jeong, J. B. (2016). In Vitro Anticancer Activity of Phlorofucofuroeckol A via Upregulation of Activating Transcription Factor 3 against Human Colorectal Cancer Cells. *Marine Drugs*, *14*(4):69, 13 pp. doi:10.3390/md14040069
- Eom, S.-H., Kim, D.-H., Lee, S.-H., Yoon, N.-Y., Kim, J. H., Kim, T. H., ... Kim, Y.-M. (2013). In Vitro Antibacterial Activity and Synergistic Antibiotic Effects of Phlorotannins Isolated from *Eisenia bicyclis* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, *27*(8), 1260–1264. doi:10.1002/ptr.4851
- Eom, S.-H., Moon, S.-Y., Lee, D.-S., Kim, H.-J., Park, K., Lee, E.-W., ... Kim, Y.-M. (2015). In vitro antiviral activity of dieckol and phlorofucofuroeckol-A isolated from edible brown alga *Eisenia bicyclis* against murine norovirus. *Algae*, *30*(3), 241–246. doi:10.4490/algae.2015.30.3.241
- Esser, K. (1986). *Kryptogamen: Cyanobakterien Algen Pilze Flechten* (2. ed.). Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 566 pp.
- Ettl, H., & Gärtner, G. (2014). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtentalgen* (2nd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 773 pp.
- Fan, P., Zhang, Y., Liu, L., Zhao, Z., Yin, Y., Xiao, X., ... Herr, I. (2016). Continuous exposure of pancreatic cancer cells to dietary bioactive agents does not induce drug resistance unlike chemotherapy. *Cell Death and Disease*, *7*(6):e2246, 12 pp. doi:10.1038/cddis.2016.157
- Fitton, J. H. (2003). Brown Marine Algae: A Survey of Therapeutic Potentials. *Alternative and Complementary Therapies*, *9*(1), 29–33. doi:10.1089/10762800360520767
- Fitton, J. H., Stringer, D. N., Park, A. Y., & Karpinić, S. S. (2019). Therapies from Fucoidan: New Developments. *Marine Drugs*, *17*(10):571, 15 pp. doi:10.3390/md17100571

- Flöthe, C. R., Molis, M., Kruse, I., Weinberger, F., & John, U. (2014). Herbivore-induced defence response in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae): temporal pattern and gene expression. *European Journal of Phycology*, 49(3), 356–369. doi:10.1080/09670262.2014.946452
- Folmer, F., Jaspars, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews*, 9(4), 557–579. doi:10.1007/s11101-010-9200-2
- Ford, L. L. (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 30(6), 587–599. doi:10.1002/pca.2851
- Frassini, R., da Silva, P. Y., Moura, S., Zambotti Villela, L., Paternostro Martins, A., Colepicolo, P., ... Roesch-Ely, M. (2019). Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Antarctic Macroalgae Extracts against Colorectal Cancer. *Advances in Biological Chemistry*, 9(5), 167–177. doi:10.4236/abc.2019.95013
- Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2013). Bioactive Phenolic Compounds from Algae. In: B. Hernández-Ledesma & M. Herrero (Eds.), *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources* (pp. 113–129). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. doi:10.1002/9781118412893.ch6
- Freudig, D. (2006). *Lexikon der Biologie (Studienausgabe)*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 7072 pp.
- Fujihara, M., Iizima, N., Yamamoto, I., & Nagumo, T. (1984). Purification and chemical and physical characterisation of an antitumour polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. *Carbohydrate Research*, 125(1), 97–106. doi:10.1016/0008-6215(84)85145-9
- Fundueanu, G., Esposito, E., Mihai, D., Carpov, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M., & Nastruzzi, C. (1998). Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 170(1), 11–21. doi:10.1016/S0378-5173(98)00063-5
- Fürhaupter, K., Grage A., Wilken, H., & Meyer, T. (2008). *Kartierung mariner Pflanzenbestände im Flachwasser der Ostseeküste – Schwerpunkt Fucus und Zostera*. Schriftenreihe: LANU SH - Gewässer ; D 22. Landesamt für Natur und Umwelt des Landes Schleswig Holstein (Ed.), 310 pp.
- Garg, S., Afzal, S., Elwakeel, A., Sharma, D., Radhakrishnan, N., Dhanjal, J. K., ... Wadhwa, R. (2019). Marine Carotenoid Fucoxanthin Possesses Anti-Metastasis Activity: Molecular Evidence. *Marine Drugs*, 17(6):338, 14 pp. doi:10.3390/md17060338
- Geiselman, J. A., & McConnell, O. J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology*, 7(6), 1115–1133. doi:10.1007/BF00987632
- Geisen, U. (2015). *Baltic Brown Seaweeds as potential novel therapeutic agents for Pancreatic Cancer*. Dissertation CAU Kiel, Uelvestull: Der Andere Verlag, 117 pp.
- Geisen, U., Zenthoefer, M., Peipp, M., Kerber, J., Plenge, J., Managò, A., ... Kalthoff, H. (2015). Molecular Mechanisms by Which a *Fucus vesiculosus* Extract Mediates Cell Cycle Inhibition and Cell Death in Pancreatic Cancer Cells. *Marine Drugs*, 13(7), 4470–4491. doi:10.3390/md13074470
- Ghaneh, P., Costello, E., & Neoptolemos, J. P. (2007). Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, 56(8), 1134–1152. doi:10.1136/gut.2006.103333
- Glombitza, K.-W., & Gerstberger, G. (1985). Phlorotannins with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*. *Phytochemistry*, 24(3), 543–551. doi:10.1016/S0031-9422(00)80764-5
- Glombitza, K.-W., & Haperich, S. (1997). Phlorotannins from the brown alga *Cystophora torulosa*. *Phytochemistry*, 46(4), 735–740. doi:10.1016/S0031-9422(97)00327-0
- Glombitza, K.-W., Koch, M., & Eckhardt, G. (1977). Chlorierte Phloretrole aus *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry*, 16(6), 796–798. doi:10.1016/S0031-9422(00)89270-5
- Glombitza, K.-W., Rösener, H.-U., & Müller, D. (1975). Bifuhalol und Diphloretol aus *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, 14(4), 1115–1116. doi:10.1016/0031-9422(75)85198-3
- Glombitza, K.-W., & Schmidt, A. (1999). Trihydroxyphloretols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium*. *Phytochemistry*, 51(8), 1095–1100. doi:10.1016/S0031-9422(99)00120-X
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2012). Dual effect of macroalgal extracts on growth of bacteria in Western Baltic Sea. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 47(1), 75–86. doi:10.4067/S0718-19572012000100007
- Gómez, V. E., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2015). Unraveling the complexity of autophagy: Potential therapeutic applications in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 11–19. doi:10.1016/j.semcan.2015.09.011
- Gosch, B. J., Magnusson, M., Paul, N. A., & De Nys, R. (2012). Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *Global Change Biology Bioenergy*, 4(6), 919–930. doi:10.1111/j.1757-1707.2012.01175.x

- Gupta, D., Silva, M., Radziun, K., Martinez, D. C., Hill, C., Marshall, J., ... Reilly, G. C. (2020). Fucoidan Inhibition of Osteosarcoma Cells is Species and Molecular Weight Dependent. *Marine Drugs*, 18(2):104, 29 pp. doi:10.3390/md18020104
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 315–326. doi:10.1016/j.tifs.2011.03.011
- Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), 405–434. doi:10.1007/s10555-010-9235-2
- Halling, B., Vetvicka, V., & Blakemore, W. (2015). Evaluation of The Immunomodulatory In Vivo Activity of *Laminaria hyperborea* Fucoidan Relative to Commercial (1,3/1,6)-B-D-Glucans from Yeast and Mushrooms. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 2(2):205, 13 pp. doi:10.15744/2393-9060.2.205
- Han, S.-S., Jang, J.-Y., Kim, S.-W., Kim, W.-H., Lee, K. U., & Park, Y.-H. (2006). Analysis of Long-term Survivors After Surgical Resection for Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 32(3), 271–275. doi:10.1097/01.mpa.0000202953.87740.93
- Han, Y.-S., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2015). Fucoidan inhibits the migration and proliferation of HT-29 human colon cancer cells via the phosphoinositide-3 kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin pathways. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 3446–3452. doi:10.3892/mmr.2015.3804
- Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possibles Modes of Action. *Journal of Natural Products*, 59(2), 205–215. doi:10.1021/np960040+
- Heavisides, E., Rouger, C., Reichel, A. F., Ulrich, C., Wenzel-Storjohann, A., Sebens, S., & Tasdemir, D. (2018). Seasonal Variations in the Metabolome and Bioactivity Profile of *Fucus vesiculosus* Extracted by an Optimised, Pressurised Liquid Extraction Protocol. *Marine Drugs*, 16(12):503, 28 pp. doi:10.3390/md16120503
- Heery, C., Tesfaye, A., Weinberg, B., & Marshal, J. (2017). Therapeutic Cancer Vaccines. In: D. Kerr & R. Johnson (Eds.), *Immunotherapy for Gastrointestinal Cancer* (pp. 47–78). Cham: Springer. doi:10.1007/978-3-319-43063-8_3 pp
- Heffernan, N., Brunton, N. P., FitzGerald, R. J., & Smyth, T. J. (2015). Profiling of the Molecular Weight and Structural Isomer Abundance of Macroalgae-Derived Phlorotannins. *Marine Drugs*, 13(1), 509–528. doi:10.3390/md13010509
- Heo, S.-J., & Jeon, Y.-J. (2009). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95(2), 101–107. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., ... Heeschen, C. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313–323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002
- Hermund, D. B., Plaza, M., Turner, C., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Jacobsen, C., & Nielsen, K. F. (2018). Structure dependent antioxidant capacity of phlorotannins from Icelandic *Fucus vesiculosus* by UHPLC-DAD-ECD-QTOFMS. *Food Chemistry*, 240, 904–909. doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.032
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*, 20(10), 1218–1249. doi:10.1101/gad.1415606
- Hishinuma, S., Ogata, Y., Tomikawa, M., Ozawa, I., Hirabayashi, K., & Igarashi, S. (2006). Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg*, 10(4), 511–518. doi:10.1016/j.gassur.2005.09.016
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597. doi:10.1007/s10811-010-9632-5
- Hoppe, H. A. (1979). Marine Algae and their Products and Constitutents in Pharmacy. In: H. A. Hoppe, T. Levring, & Y. Tanaka (Eds.), *Marine Algae in Pharmaceutical Science* (pp. 25–120). Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T., & Miyashita, K. (2004). Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1675(1-3), 113–119. doi:10.1016/j.bbagen.2004.08.012
- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., ... Takahashi, K. (1999). Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. *Food Science and Technology Research*, 5(3), 243–246. doi:10.3136/fstr.5.243
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, 6(8), 2969–2972.

- Hsu, H.-Y., Lin, T., Lu, M.-K., Leng, P.-J., Tsao, S.-M., & Wu, Y.-C. (2017). Fucoïdan induces Toll-like receptor 4-regulated reactive oxygen species and promotes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in lung cancer. *Scientific Reports*, 7:44990, 13 pp. doi:10.1038/srep44990
- Hsu, H.-Y., Lin, T.-Y., Hu, C.-H., Shu, D. T. F., & Lu, M.-K. (2018). Fucoïdan upregulates TLR4/CHOP-mediated caspase-3 and PARP activation to enhance cisplatin-induced cytotoxicity in human lung cancer cells. *Cancer Letters*, 432, 112–120. doi:10.1016/j.canlet.2018.05.006
- Hsu, H.-Y., Lin, T.-Y., Hwang, P.-A., Tseng, L.-M., Chen, R.-H., Tsao, S.-M., & Hsu, J. (2013). Fucoïdan induces changes in the epithelial to mesenchymal transition and decreases metastasis by enhancing ubiquitin-dependent TGF β receptor degradation in breast cancer. *Carcinogenesis*, 34(4), 874–884. doi:10.1093/carcin/bgs396
- Hübel, H. (1969). Großalgen der Ostsee. In: E. A. Arndt (Ed.), *Zwischen Düne und Meeresgrund: Tiere und Pflanzen des Ostseeraumes* (pp. 75–100). Leipzig, Jena, Berlin: Urania-Verlag.
- Huguet, F., André, T., Hammel, P., Artru, P., Balosso, J., Selle, F., ... Louvet, C. (2007). Impact of Chemoradiotherapy After Disease Control with Chemotherapy in Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma in GERCOR Phase II and III Studies. *Journal of Clinical Oncology*, 25(3), 326–331. doi:10.1200/JCO.2006.07.5663
- Hussain, E., Wang, L.-J., Jiang, B., Riaz, S., Butt, G. Y., & Shi, D.-Y. (2016). A review of the components of brown seaweeds as potential candidates in cancer therapy. *RSC Advances*, 6(15), 12592–12610. doi:10.1039/C5RA23995H
- Hyun, J.-H., Kim, S.-C., Kang, J.-I., Kim, M.-K., Boo, H.-J., Kwon, J.-M., ... Kang, H.-K. (2009). Apoptosis inducing activity of fucoïdan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(10), 1760–1764. doi:10.1248/bpb.32.1760
- Isaza Martínez, J. H., & Torres Castañeda, H. G. (2013). Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *Journal of Chromatographic Science*, 51(8), 825–838. doi:10.1093/chromsci/bmt045
- Ito, H., & Sugiura, M. (1976). Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thunbergii*. *Chem.Pharm.Bull.*, 24(5), 1114–1115. doi: 10.1248/cpb.24.1114
- Jennrich, P. (2010). Schwermetalle als Auslöser sekundärer Mitochondriopathien. *Umwelt Medizin Gesellschaft*, 23(1), 44–50.
- Jensen, A., & Haug, A. (1956). *Geographical and Seasonal Variation in the Chemical Composition of Laminaria Hyperborea and Laminaria Digitata from the Norwegian Coast*. Report. ser. A. no. 14, Akademisk trykningsentral, 20 pp.
- Jeong, Y. J., Woo, S. G., An, C. H., Jeong, H. J., Hong, Y.-S., Kim, Y.-M., ... Kim, C. Y. (2015). Metabolic Engineering for Resveratrol Derivative Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Molecules and Cells*, 38(4), 318–326. doi:10.14348/molcells.2015.2188
- Jin, J.-O., Song, M.-G., Kim, Y.-N., Park, J., & Kwak, J.-Y. (2010). The Mechanism of Fucoïdan-Induced Apoptosis in Leukemic Cells: Involvement of ERK1/2, JNK, Glutathione, and Nitric Oxide. *Molecular Carcinogenesis*, 49(8), 771–782. doi:10.1002/mc.20654
- Jin, W., Zhang, Q., Wang, J., & Zhang, W. (2013). A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoïdins. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 1–6. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.067
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science*, 321(5897), 1801–1806. doi:10.1126/science.1164368
- Kanai, M. (2014). Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9384–9391. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9384
- Kang, M.-C., Lee, S.-H., Lee, W.-W., Kang, N., Kim, E.-A., Kim, S. Y., ... Jeon, Y.-J. (2014). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Ishige okamurae* against high-glucose induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells and zebrafish model. *Journal of Functional Foods*, 11, 304–312. doi: 10.1016/j.jff.2014.09.007
- Kautsky, H., Kautsky, L., Kautsky, N., Kautsky, U., & Lindblad, C. (1992). Studies on the *Fucus vesiculosus* community in the Baltic Sea. *Acta Phytogeogr. Suec.*, 78, 33–48.
- Kautsky, N., Kautsky, H., Kautsky, U., & Waern, M. (1986). Decreased depth penetration of *Fucus vesiculosus* (L.) since the 1940's indicates eutrophication of the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 28, 1–8. doi:10.3354/meps028001
- Kawaguchi, T., Hayakawa, M., Koga, H., & Torimura, T. (2015). Effects of fucoïdan on proliferation, AMP-activated protein kinase, and downstream metabolism- and cell cycle-associated molecules in poorly differentiated human hepatoma HLF cells. *International Journal of Oncology*, 46(5), 2216–2222. doi:10.3892/ijo.2015.2928
- Keitel, S. (2013). Control of elemental impurities. *Pharmaceutical Technology*, 37(11), 16–17.

- Keusgen, M., & Glombitza, K.-W. (1995). Phlorethols, fuhalols and their derivatives from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. *Phytochemistry*, *38*(4), 975–985. doi:10.1016/0031-9422(94)00755-I
- Khanavi, M., Gheidarloo, R., Sadati, N., Ardekani, M. R. S., Nabavi, S. M. B., Tavajohi, S., & Ostad, S. N. (2012). Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacognosy Magazine*, *8*(29), 60–64. doi:10.4103/0973-1296.93327
- Khanavi, M., Nabavi, M., Sadati, N., Shams Ardekani, M., Sohrabipour, J., Nabavi, S. M. B., ... Ostad, S. N. (2010). Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *Biological Research*, *43*(1), 31–37. doi: 10.4067/S0716-97602010000100005
- Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, *18*(6), 641–649. doi:10.1039/b101061f
- Khotimchenko, Y. S., Kovalev, V. V., Savchenko, O. V., & Ziganshina, O. A. (2001). Physical-Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*, *27*(Supplement 1), S53–S64. doi: 10.1023/A:1013851022276
- Kim, E. J., Park, S. Y., Lee, J.-Y., & Park, J. H. Y. (2010). Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterology*, *10*:96, 11 pp. doi:10.1186/1471-230X-10-96
- Kim, H.-J., Dasagrandhi, C., Kim, S.-H., Kim, B.-G., Eom, S.-H., & Kim, Y.-M. (2018). In Vitro Antibacterial Activity of Phlorotannins from Edible Brown Algae *Eisenia bicyclis* Against Streptomycin-Resistant *Listeria monocytogenes*. *Indian Journal of Microbiology*, *58*(1), 105–108. doi:10.1007/s12088-017-0693-x
- Kim, I.-H., & Nam, T.-J. (2018). Fucoidan downregulates insulin-like growth factor-I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. *Oncology Reports*, *39*(3), 1516–1522. doi:10.3892/or.2018.6193
- Kim, J., Yoon, M., Yang, H., Jo, J., Han, D., Jeon, Y., & Cho, S. (2014). Enrichment and purification of marine polyphenol phlorotannins using macroporous adsorption resins. *Food Chemistry*, *162*, 135–142. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.035
- Kim, R.-K., Suh, Y., Yoo, K.-C., Cui, Y.-H., Hwang, E., Kim, H.-J., ... Lee, S.-J. (2015). Phloroglucinol suppresses metastatic ability of breast cancer cells by inhibition of epithelial-mesenchymal cell transition. *Cancer Science*, *106*(1), 94–101. doi:10.1111/cas.12562
- Kim, S.-K. (Ed.) (2012). *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology* (1st ed.). John Wiley & Sons, Ltd., 592 pp.
- Klöppel, G., & Heitz, P. U. (1988). Pancreatic Endocrine Tumors. *Pathology - Research and Practice*, *183*(2), 155–168. doi:10.1016/S0344-0338(88)80043-8
- Klöppel, G., Solcia, E., Longnecker, D. S., Capella, C., & Sobin, L. H. (1996). *Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas* (2nd ed.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 61 pp.
- Ko, A. H. (2016). Nanomedicine developments in the treatment of metastatic pancreatic cancer: focus on nanoliposomal irinotecan. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 1225–1235. doi:10.2147/IJN.S88084
- Koivikko, R., Eränen, J. K., Loponen, J., & Jormalainen, V. (2008). Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *Journal of Chemical Ecology*, *34*(1), 57–64. doi:10.1007/s10886-007-9410-2
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T., & Jormalainen, V. (2005). Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*, *31*(1), 195–212. doi:10.1007/s10886-005-0984-2
- Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K., & Jormalainen, V. (2007). High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Phlorotannins from the Brown Alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochemical Analysis*, *18*(4), 326–332. doi:10.1002/pca.986
- Kong, C.-S., Kim, J.-A., Yoon, N.-Y., & Kim, S.-K. (2009). Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(7), 1653–1658. doi:10.1016/j.fct.2009.04.013
- Kota, J., Hancock, J., Kwon, J., & Korc, M. (2017). Pancreatic cancer: Stroma and its current and emerging targeted therapies. *Cancer Letters*, *391*, 38–49. doi:10.1016/j.canlet.2016.12.035
- Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., & Nagao, A. (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *The Journal of Nutrition*, *131*(12), 3303–3306. doi: 10.1093/jn/131.12.3303
- Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., & Shimeno, H. (2003). Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochemical Pharmacology*, *65*(2), 173–179. doi:10.1016/S0006-2952(02)01478-8
- Kumar, S., Bhanjana, G., Verma, R., Dhingra, D., Dilbaghi, N., & Kim, K. (2017). Metformin-loaded alginate nanoparticles as an effective antidiabetic agent for controlled drug release. *J Pharm Pharmacol*, *69*(2), 143–150. doi:10.1111/jph.12672

- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Harsha, C., & Banik, K. (2017). Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clinical Science*, *131*(15), 1781–1799. doi:10.1042/CS20160935
- Kürbitz, C., Heise, D., Redmer, T., Goumas, F., Arlt, A., Lemke, J., ... Trauzold, A. (2011). Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. *Cancer Science*, *102*(4), 728–734. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01870.x
- La Barre, S., Potin, P., Leblanc, C., & Delage, L. (2010). The Halogenated Metabolism of Brown Algae (Phaeophyta), Its Biological Importance and Its Environmental Significance. *Marine Drugs*, *8*(4), 988–1010. doi:10.3390/md8040988
- Lachnit, T., Fischer, M., Künzel, S., Baines, J. F., & Harder, T. (2013). Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus*. *FEMS Microbiology Ecology*, *84*(2), 411–420. doi:10.1111/1574-6941.12071
- Lan, C.-Y., Chen, S.-Y., Kuo, C.-W., Lu, C.-C., & Yen, G.-C. (2019). Quercetin facilitates cell death and chemosensitivity through RAGE/PI3K/AKT/mTOR axis in human pancreatic cancer cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, *27*(4), 887–896. doi: 10.1016/j.jfda.2019.07.001
- Lee, H., Kim, J.-S., & Kim, E. (2012). Fucoïdan from Seaweed *Fucus vesiculosus* Inhibits Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cell via PI3K-Akt-mTOR Pathways. *PLoS ONE*, *7*(11):e50624, 10 pp. doi:10.1371/journal.pone.0050624
- Lee, H.-A., Lee, J.-H., & Han, J.-S. (2017). A phlorotannin constituent of *Ecklonia cava* alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 1149–1154. doi:10.1080/13880209.2017.1291693
- Lee, H.-E., Choi, E.-S., Shin, J.-A., Lee, S.-O., Park, K.-S., Cho, N.-P., & Cho, S.-D. (2014). Fucoïdan induces caspase-dependent apoptosis in MC3 human mucoepidermoid carcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *7*(1), 228–232. doi:10.3892/etm.2013.1368
- Lee, J.-H., Ko, J.-Y., Oh, J.-Y., Kim, C.-Y., Lee, H.-J., Kim, J., & Jeon, Y.-J. (2014). Preparative isolation and purification of phlorotannins from *Ecklonia cava* using centrifugal partition chromatography by one-step. *Food Chemistry*, *158*, 433–437. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.112
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, *37*(1), 106–126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- Lee, Y.-J., Park, J.-H., Park, S.-A., Joo, N.-R., Lee, B. H., Lee, K. B., & Oh, S.-M. (2020). Dieckol or phlorofucofuroeckol extracted from *Ecklonia cava* suppresses lipopolysaccharide-mediated human breast cancer cell migration and invasion. *Journal of Applied Phycology*, *32*, 631-640. doi: 10.1007/s10811-019-01899-2
- Leischner, H. (2010). *Onkologie Basics* (2nd ed.). München: Elsevier GmbH, 132 pp.
- Le Lann, K., Surget, G., Couteau, C., Coiffard, L., Cerantola, S., Gaillard, F., ... Stiger-Pouvreau, V. (2016). Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Applied Phycology*, *28*(6), 3547–3559. doi: 10.1007/s10811-016-0853-0
- Leyton, A., Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Correa, J. R., & Lienqueo, M. E. (2017). Purification of phlorotannins from *Macrocystis pyrifera* using macroporous resins. *Food Chemistry*, *237*, 312–319. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.114
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., ... Simeone, D. M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, *67*(3), 1030–1037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030
- Li, H., Fan, X., & Houghton, J. (2007). Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *101*, 805–815. doi:10.1002/jcb.21159
- Li, H., Li, J., Tang, Y., Lin, L., Xie, Z., Zhou, J., ... Zuo, D. (2017). Fucoïdan from *Fucus vesiculosus* suppresses hepatitis B virus replication by enhancing extracellular signal-regulated Kinase activation. *Virology Journal*, *14*(1):178, 8 pp. doi:10.1186/s12985-017-0848-8
- Li, J., Wientjes, M. G., & Au, J. L.-S. (2010). Pancreatic Cancer: Pathobiology, Treatment Options, and Drug Delivery. *The AAPS Journal*, *12*(2), 223–232. doi:10.1208/s12248-010-9181-5
- Li, L., Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Abbruzzese, J., & Kurzrock, R. (2004). Nuclear Factor- κ B and I κ B Kinase Are Constitutively Active in Human Pancreatic Cells, and Their Down-Regulation by Curcumin (Diferuloylmethane) Is Associated with the Suppression of Proliferation and the Induction of Apoptosis. *Cancer*, *101*(10), 2351–2362. doi:10.1002/cncr.20605
- Li, Y., Go, V. L. W., & Sarkar, F. H. (2015). The role of nutraceuticals in pancreatic cancer prevention and therapy: Targeting cellular signaling, miRNAs and epigenome. *Pancreas*, *44*(1), 10 pp. doi:10.1097/MPA.0000000000000257

- Li, Y., Karagöz, G. E., Young, H. S., Zhang, T., Jiang, Y., Yu, Y., ... Sun, D. (2012). Sulforaphane inhibits pancreatic cancer through disrupting Hsp90–p50Cdc37 complex and direct interactions with amino acids residues of Hsp90. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(12), 1617–1626. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.11.004
- Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Bao, B., & Sarkar, F. H. (2013). Pancreatic cancer stem cells: Emerging target for designing novel therapy. *Cancer Letters*, 338(1), 94–100. doi:10.1016/j.canlet.2012.03.018
- Li, Y., Li, Y., Je, J., & Kim, S. (2015). Dieckol as a novel anti-proliferative and anti-angiogenic agent and computational anti-angiogenic activity evaluation. *Environ Toxicol Pharmacol*, 39(1), 259–270. doi:10.1016/j.etap.2014.11.027
- Li, Y., Qian, Z.-J., Kim, M.-M., & Kim, S.-K. (2011). Cytotoxic activities of phlorethol and fucophlorethol derivatives isolated from Laminariaceae *Ecklonia cava*. *Journal of Food Biochemistry*, 35(2), 357–369. doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00387.x
- Li, Y.-X., Li, Y., Qian, Z.-J., Ryu, B., & Kim, S. (2011). Suppression of vascular endothelial growth factor (VEGF) induced angiogenic responses by fucodiphloroethol G. *Process Biochemistry*, 46(5), 1095–1103. doi:10.1016/j.procbio.2011.01.035
- Li, Y.-X., Wijesekara, I., Li, Y., & Kim, S.-K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46(12), 2219–2224. doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.015
- Liew, C., Chan, L., Ching, A., & Heng, P. (2006). Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *Int J Pharm*, 309(1-2), 25–37. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.040
- Lin, S.-R., Fu, Y.-S., Tsai, M.-J., Cheng, H., & Weng, C.-F. (2017). Natural Compounds from Herbs that can Potentially Execute as Autophagy Inducers for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7):1412, 15 pp. doi:10.3390/ijms18071412
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum* (Vol. 2). Holmiae (Stockholm): Impensis Laurentii Salvii, pp. 561-1200. doi:10.5962/bhl.title.669
- Liu, H., & Gu, L. (2012). Phlorotannins from brown algae (*Fucus vesiculosus*) inhibited the formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1326–1334. doi:10.1021/jf204112f
- Liu, L., Heinrich, M., Myers, S., & Dworjanyn, S. A. (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 591–619. doi:10.1016/j.jep.2012.05.046
- Liu, M., Hansen, P. E., & Lin, X. (2011). Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities. *Marine Drugs*, 9(7), 1273–1292. doi:10.3390/md9071273
- Lobban, C. S., & Wynne, M. J. (Eds.). (1981). *The Biology of Seaweeds* (Botanical Monographs Volume 17). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 786 pp.
- Loehrer SR, P. J., Feng, Y., Cardenes, H., Wagner, L., Brell, J. M., Cella, D., ... Benson III, A. B. (2011). Gemcitabine Alone Versus Gemcitabine Plus Radiotherapy in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29(31), 4105–4112. doi:10.1200/JCO.2011.34.8904
- Lohmann, C., Schilling, P. (Eds.), unter Mitwirkung von Fürhaupter, K. (2001). 1. *Taxonomischer Makrophyten-Workshop „Taxonomie mariner Makrophyten und ihre Bedeutung für das Monitoring im Rahmen der internationalen Meeresschutzabkommen“ 25.05.-01.06.01, Maasholm*, Bericht Dezember 2001, Umweltbundesamt, 136 pp.
- Lonardo, E., Cioffi, M., Sancho, P., Sanchez-Ripoll, Y., Trabulo, S. M., Dorado, J., ... Heesch, C. (2013). Metformin Targets the Metabolic Achilles Heel of Human Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(10):e76518, 13 pp. doi:10.1371/journal.pone.0076518
- Lonardo, E., Frias-Aldeguer, J., Hermann, P. C., & Heesch, C. (2012). Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness. *Cell Cycle*, 11(7), 1282–1290. doi:10.4161/cc.19679
- Lopes, G., Barbosa, M., Vallejo, F., Gil-Izquierdo, Á., Andrade, P. B., Valentão, P., ... Ferreres, F. (2018). Profiling phlorotannins from *Fucus spp.* of the Northern Portuguese coastline: Chemical approach by HPLC-DAD-ESI/MSn and UPLC-ESI-QTOF/MS. *Algal Research*, 29, 113–120. doi:10.1016/j.algal.2017.11.025
- Lopes-Costa, E., Abreu, M., Gargiulo, D., Rocha, E., & Ramos, A. (2017). Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. *J Toxicol Environ Health A*, 80(13-15), 776–787. doi:10.1080/15287394.2017.1357297
- Lowe, H. I., Daley, D., Watson, C., Powell, S.-A., Ayeah, K. N., Toyang, N. J., ... Lamm, A. S. (2016). Anticancer Activity of Three Jamaican Macroalgae against Prostate, Pancreatic and Skin Cancers. *European Journal of Medicinal Plants*, 13(2), 5 pp. doi:10.9734/EJMP/2016/23662
- Lüning, K. (1985). *Meeresbotanik: Verbreitung, Ökophysiologie und Nutzung der marinen Makroalgen*. Stuttgart: G. Thieme, 375 pp.

- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., & Tong, H. (2019). Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Marine Drugs*, 17(9):487, 15 pp. doi:10.3390/md17090487
- Lüttge, U., & Kluge, M. (2012). *Botanik - Die einführende Biologie der Pflanzen* (6th ed.). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 666 pp.
- Maczassek, K. (2014). *Effects of sequential stressors on survival of young life stages of the bladder wrack Fucus vesiculosus L.* RADOST - Berichtsreihe (Nr. 25), GEOMAR - Helmholtz Zentrum für Ozeanforschung, 28 pp.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., & Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 392–397. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.002
- Marasini, B., & Sahu, R. (2017). Natural Anti-Cancer Agents: Implications in Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Treatment. *Mini Rev Med Chem*, 17(11), 920–927. doi:10.2174/1389557517666170315124438
- Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M., & Nakano, T. (2003). Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *In Vivo*, 17(3), 245–249.
- Maruyama H., Yamamoto I. (1984). An antitumor fucoidan fraction from an edible brown seaweed, *Laminaria religiosa*. In: Bird C.J., Ragan M.A. (Eds.) *Eleventh International Seaweed Symposium. Developments in Hydrobiology Vol. 22* (pp. 534-536). Dordrecht: Springer.
- Mathew, L., Burney, M., Gaikwad, A., Nyshadham, P., Nugent, E. K., Gonzalez, A., & Smith, J. A. (2017). Preclinical Evaluation of Safety of Fucoidan Extracts from *Undaria pinnatifida* and *Fucus vesiculosus* for Use in Cancer Treatment. *Integrative Cancer Therapies*, 16(4), 572–584. doi:10.1177/1534735416680744
- Mayer, A. M. S., & Panick, B. (1982). Inhibición del crecimiento de ascitis de Ehrlich y leucemia P-388 con extractos de productos naturales: *Macrocystis pyrifera*, un alga marina patogénica de importancia económica. *Medicina (Buenos Aires)*, 42, 857–858.
- Mayer, A. M. S., & Panick, B. (1984). Antitumor evaluation of marine algae in Argentina. In: *Eleventh International Seaweed Symposium: Proceedings of the Eleventh International Seaweed Symposium, held in Qingdao, People's Republic of China, June 19-25, 1983* (pp. 529–533).
- McCandless, E. L. (1981). Polysaccharides of the Seaweeds. In: C. S. Lobban & M. J. Wynne (Eds.), *The Biology of Seaweeds* (pp. 559–588). Berkeley and Los Angeles: Blackwell Scientific Publications.
- McCarroll, J. A., Naim, S., Sharbeen, G., Russia, N., Lee, J., Kavallaris, M., ... Phillips, P. A. (2014). Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer. *Frontiers in Physiology*, 5:141, 9 pp. doi:10.3389/fphys.2014.00141
- McInnes, A. G., Ragan, M. A., Smith, D. G., & Walter, J. A. (1984). High-molecular-weight phloroglucinol-based tannins from brown algae: Structural variants. *Hydrobiologia*, 116(1), 597–602. doi:10.1007/BF00027755
- Meichßner, R. (2016). *Aquaculture of detached thalli of three Fucus- species in the Baltic Sea: analysis of growth patterns and bioactive ingredients*. Master Thesis, Kiel University, 106 pp.
- Misra, A., & Sinha, R. (1979). Algae as Drug Plants in India. In: H. A. Hoppe, T. Levring, & Y. Tanaka (Eds.), *Marine Algae in Pharmaceutical Science* (pp. 237–242). Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Miyashita, K., & Hosokawa, M. (2017). Fucoxanthin in the management of obesity and its related disorders. *Journal of Functional Foods*, 36, 195–202. doi:10.1016/j.jff.2017.07.009
- Mondal, M., Lakshmi T, P., Krishna, R., & Sakthivel, N. (2017). Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. *Journal of Luminescence*, 192, 990–998. doi:10.1016/j.jlumin.2017.08.007
- Montero, L., del Pilar Sánchez-Camargo, A., Ibáñez, E., & Gilbert-López, B. (2018). Phenolic compounds from edible algae: bioactivity and health benefits. *Current Medicinal Chemistry*, 25(37), 4808–4826. doi:10.2174/0929867324666170523120101
- Montero, L., Sánchez-Camargo, A. P., García-Cañas, V., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Russo, M., ... Ibáñez, E. (2016). Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography A*, 1428, 115–125. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.053
- Moo-Puc, R., Robledo, D., & Freile-Pelegrín, Y. (2009). In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas*, 35(4), 345–358. doi: 10.1158/1940-6207.PREV-09-B78
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., ... Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus Gemcitabine Compared with Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, 25(15), 1960–1966. doi:10.1200/jco.2005.23.16

- Moss, B. L. (1950). Studies in the Genus *Fucus*: II. The anatomical structure and chemical composition of receptacles of *Fucus vesiculosus* from three contrasting habitats. *Annals of Botany*, 14(55), 395–410. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a083254
- Moureau-Zabotto, L., Phélip, J.-M., Afchain, P., Mineur, L., André, T., Vendrely, V., ... Louvet, C. (2008). Concomitant Administration of Weekly Oxaliplatin, Fluorouracil Continuous Infusion, and Radiotherapy After 2 Months of Gemcitabine and Oxaliplatin Induction in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Groupe Coordinateur Multidisciplinaire en O. *Journal of Clinical Oncology*, 26(7), 1080–1085. doi:10.1200/JCO.2007.12.8223
- Moussavou, G., Kwak, D. H., Obiang-Obonou, B. W., Maranguy, C. A. O., Dinzouna-Boutamba, S. D., Lee, D. H., ... Choo, Y. K. (2014). Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. *Marine Drugs*, 12(9), 4898–4911. doi:10.3390/md12094898
- Mulcahy Levy, J. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(9), 528–542. doi:10.1038/nrc.2017.53
- Murphy, C., Hotchkiss, S., Worthington, J., & McKeown, S. R. (2014). The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy. *Journal of Applied Phycology*, 26(5), 2211–2264. doi:10.1007/s10811-014-0245-2
- Murtaza, I., Adhami, V. M., Hafeez, B. Bin, Saleem, M., & Mukhtar, H. (2009). Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF- κ B. *Int. J. Cancer*, 125(10), 2465–2473. doi:10.1002/ijc.24628
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., & Tanaka, R. (1996). Antioxidant Activity of Phlorotannins Isolated from the Brown Alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science*, 62(6), 923–926. doi:10.2331/fishsci.62.923
- Nakazawa, S., Kuroda, H., Abe, F., Nishino, T., Ohtsuki, M., & Umezaki, I. (1974). Antitumor effect of water extracts from marine algae (I). *Chemotherapy (Japan)*, 22, 1435–1444.
- Naumann, P., Liermann, J., Fortunato, F., Schmid, T. E., Weber, K.-J., Debus, J., & Combs, S. E. (2017). Sulforaphane enhances irradiation effects in terms of perturbed cell cycle progressions and increased DNA damage in pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, 12(7):e0180940, 13 pp. doi:10.1371/journal.pone.0180940
- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(6), 333–348. doi:10.1038/s41575-018-0005-x
- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., ... Büchler, M. W. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 389(10073), 1011–1024. doi:10.1016/S0140-6736(16)32409-6
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., ... Büchler, M. W. (2010). Adjuvant Chemotherapy with Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. *JAMA*, 304(10), 1073–1081. doi:10.1001/jama.2010.1275
- Neoptolemos, John P. Stocken, D. D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J. A., Hickey, H., Beger, H., ... Büchler, M. W. (2004). A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350(12), 1200–1210. doi:10.1056/NEJMoa032295
- Neureiter, D., Jäger, T., Ocker, M., & Kiesslich, T. (2014). Epigenetics and pancreatic cancer: Pathophysiology and novel treatment aspects. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), 7830–7848. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7830
- New, M., Acker, T. Van, Long, J. S., Sakamaki, J., Ryan, K. M., & Tooze, S. A. (2017). Molecular Pathways Controlling Autophagy in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7(28), 11 pp. doi:10.3389/fonc.2017.00028
- Niklas, K. J., & Kutschera, U. (2010). The evolution of the land plant life cycle. *The New Phytologist*, 185(1), 27–41. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03054.x
- Nishiguchi, T., Jiang, Z., Ueno, M., Takeshita, S., Cho, K., Roh, S. W., ... Oda, T. (2014). Reevaluation of bactericidal, cytotoxic, and macrophage-stimulating activities of commercially available *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Algae*, 29(3), 237–247. doi:10.4490/algae.2014.29.3.237
- Nishino, H. (1998). Cancer prevention by carotenoids. *Mutation Research*, 402(1-2), 159–163. doi:10.1016/s0027-5107(97)00293-5
- Nygård, C. A., & Dring, M. J. (2008). Influence of salinity, temperature, dissolved inorganic carbon and nutrient concentration on the photosynthesis and growth of *Fucus vesiculosus* from the Baltic and Irish Seas. *European Journal of Phycology*, 43(3), 253–262. doi:10.1080/09670260802172627

- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., ... Riess, H. (2007). Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, *297*(3), 267–277. doi:10.1001/jama.297.3.267
- Okabe, T., Nozomi, Y., & Ohsawa, N. (1983). Establishment and Characterization of a Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Producing Cell Line from a Human Carcinoma of the Exocrine Pancreas. *Cancer*, *51*(4), 662–668. doi:10.1002/1097-0142(19830215)51:4<662::aid-cnrcr2820510419>3.0.co;2-x
- Okada, Y., Ishimaru, A., Suzuki, R., & Okuyama, T. (2004). A new phloroglucinol derivative from the brown alga *Eisenia bicyclis*: potential for the effective treatment of diabetic complications. *J Nat Prod*, *67*(1), 103–105. doi:10.1021/np030323j
- Okuzumi, J., Nishino, H., Murakoshi, M., Iwashima, A., Tanaka, Y., Yamane, T., ... Takahashi, T. (1990). Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Letters*, *55*(1), 75–81. doi:10.1016/0304-3835(90)90068-9
- Okuzumi, J., Takahashi, T., Yamane, T., Kitao, Y., Inagake, M., Ohya, K., ... Tanaka, Y. (1993). Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Letters*, *68*(2-3), 159–168. doi:10.1016/0304-3835(93)90142-V
- Oliveira, C., Granja, S., Neves, N. M., Reis, R. L., Baltazar, F., Silva, T. H., & Martins, A. (2019). Fucoidan from *Fucus vesiculosus* inhibits new blood vessel formation and breast tumor growth in vivo. *Carbohydr Polym*, *223*:115034. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115034
- Pan, T.-J., Li, L., Zhang, J.-W., Yang, Z.-S., Shi, D.-M., Yang, Y.-K., & Wu, W.-Z. (2019). Antimetastatic Effect of Fucoidan-*Sargassum* against Liver Cancer Cell Invasiveness Formation via Targeting Integrin α V β 3 and Mediating α V β 3/Src/E2F1 Signaling. *Journal of Cancer*, *10*(20), 4777–4792. doi:10.7150/jca.26740
- Park, E., & Pezzuto, J. (2013). Antioxidant marine products in cancer chemoprevention. *Antioxid Redox Signal*, *19*(2), 115–138. doi:10.1089/ars.2013.5235
- Park, H. S., Hwang, H. J., Kim, G.-Y., Cha, H.-J., Kim, W.-J., Kim, N. D., ... Choi, Y. H. (2013). Induction of apoptosis by Fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family. *Marine Drugs*, *11*(7), 2347–2364. doi:10.3390/md11072347
- Park, H. S., Kim, G.-Y., Nam, T.-J., Kim, N. D., & Choi, Y. H. (2011). Antiproliferative Activity of Fucoidan Was Associated with the Induction of Apoptosis and Autophagy in AGS Human Gastric Cancer Cells. *Journal of Food Science*, *76*(3), T77–T83. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02099.x
- Park, H. Y., Choi, I.-W., Kim, G.-Y., Kim, B. W., Kim, W.-J., & Choi, Y. H. (2015). Fucoidan induces G1 arrest of the cell cycle in EJ human bladder cancer cells through down-regulation of pRB phosphorylation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *25*(3), 246–251. doi:10.1016/j.bjp.2015.03.011
- Park, S. J., & Jeon, Y. J. (2012). Dieckol from *Ecklonia cava* Suppresses the Migration and Invasion of HT1080 Cells by Inhibiting the Focal Adhesion Kinase Pathway Downstream of Rac1-ROS Signaling. *Mol. Cells*, *33*(2), 141–149. doi:10.1007/s10059-012-2192-6
- Parys, S., Kehraus, S., Krick, A., Glombitza, K.-W., Carmeli, S., Klimo, K., ... König, G. M. (2010). In vitro chemopreventive potential of fucophloretols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, *71*(2-3), 221–229. doi:10.1016/j.phytochem.2009.10.020
- Pavia, H., & Brock, E. (2000). Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, *193*, 285–294. doi:10.3354/meps193285
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A., & Aberg, P. (1997). Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, *157*, 139–146. doi:10.3354/meps157139
- Pavia, H., & Toth, G. B. (2000). Inducible Chemical Resistance to Herbivory in the Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*, *81*(11), 3212–3225. doi:10.2307/177411
- Pearson, G., Kautsky, L., & Serrao, E. (2000). Recent evolution in Baltic *Fucus vesiculosus*: reduced tolerance to emersion stresses compared to intertidal (North Sea) populations. *Marine Ecology Progress Series*, *202*, 67–79. doi:10.3354/meps202067
- Pelzer, U., Schwaner, I., Stieler, J., Adler, M., Seraphin, J., Dörken, B., ... Oettle, H. (2011). Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group. *European Journal of Cancer*, *47*(11), 1676–1681. doi:10.1016/j.ejca.2011.04.011
- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*, *14*(2), 103–117. doi:10.1080/00071617900650121
- Percival, E. G. V., & Ross, A. G. (1950). Fucoidin. Part 1. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. *J. Chem. Soc.*, 717–720.

- Pham, N.-A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M., & Hedley, D. W. (2004). The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(10), 1239–1248.
- Plenge, J. (2018). *Untersuchungen zur Induktion von nicht-apoptotischem, reguliertem Zelltod als mögliche Strategie in der Krebstherapie*. Dissertation CAU Kiel, 86 pp.
- Probst, W. (1997). Algen. *Unterricht Biologie*, 21(225), 4–13.
- Ragan, M. A. (1981). Chemical Constituents of Seaweeds. In: C. S. Lobban & M. J. Wynne (Eds.), *The Biology of Seaweeds* (pp. 589–626). Berkeley and Los Angeles: Blackwell Scientific Publications.
- Ragan, M. A., & Glombitza, K.-W. (1986). Phlorotannins, brown algal Polyphenols. In: D. J. Round, F. E., Chapman (Ed.), *Progress in Phycological Research* (pp. 129–241). Bristol, U.K: Biopress Ltd.
- Rajeshkumar, S., Vanaja, M., Malarkodi, C., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Kannan, C., & Annadurai, G. (2013). Development in Therapeutic importance of most sought marine algal Polysaccharide Fucoindans. *International Journal of Research in Biomedicine and Biotechnology*, 3(2), 37–43.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207–216. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.012
- Reddy, L., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1), 1–13. doi:10.1016/S0163-7258(03)00042-1
- Rheinheimer, G. (Ed.). (1996). *Meereskunde der Ostsee* (2nd ed.). Berlin, Heideberg: Springer-Verlag, 338 pp.
- Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., ... Stanger, B. Z. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 25(6), 735–747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021.Stromal
- RKI und GEKID - Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Eds.). (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/ 2016. 12. Ausgabe*. Berlin, 158 pp. doi:10.25646/5977
- RKI und GEKID - Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Eds.). (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012 10. Ausgabe*. Berlin, 152 pp. doi:10.17886/rkipubl-2015-004
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. doi:10.1021/jf026182t
- Rönnerberg, O., & Ruokolahiti, C. (1986). Seasonal variation of algal epiphytes and phenolic content of *Fucus vesiculosus* in a northern Baltic archipelago. *Annales Botanici Fennici*, 23(4), 317–323.
- Rohde, S., Molis, M., & Wahl, M. (2004). Regulation of anti-herbivore defence by *Fucus vesiculosus* in response to various cues. *Journal of Ecology*, 92(6), 1011–1018. doi: 10.1111/j.0022-0477.2004.00936.x
- Rohde, S., & Wahl, M. (2008). Temporal dynamics of induced resistance in a marine macroalga: Time lag of induction and reduction in *Fucus vesiculosus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367(2), 227–229. doi:10.1016/j.jembe.2008.10.003
- Rothäusler, E., Uebermuth, C., Haavisto, F., & Jormalainen, V. (2019). Living on the edge: Gamete release and subsequent fertilisation in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) are weakened by climate change-forced hyposaline conditions. *Phycologia*, 58(2), 111–114. doi:10.1080/00318884.2018.1524246
- Roussis, V., Vagias, C., & Tziveleka, L. A. (2004). Cytotoxic metabolites from marine algae. In: S. E. Kintzios & M. G. Barberaki (Eds.), *Plants that fight cancer* (pp. 195–241). Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press.
- Ruan, B.-F., Ge, W.-W., Lin, M.-X., & Li, Q.-S. (2018). A Review of the Components of Seaweeds as Potential Candidates in Cancer Therapy. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18(3), 354–366. doi:10.2174/1871520617666171106130325
- Rui, X., Pan, H.-F., Shao, S.-L., & Xu, X.-M. (2017). Anti-tumor and anti-angiogenic effects of Fucoindan on prostate cancer: possible JAK- STAT3 pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1):378, 8 pp. doi:10.1186/s12906-017-1885-y
- Rustgi, A. K. (2014). Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Gen*, 28(1), 1–7. doi:10.1101/gad.228452.113
- Ryu, M. J., & Chung, H. S. (2015). Anti-inflammatory Activity of Fucoindan with Blocking NF-κB and STAT1 in Human Keratinocytes Cells. *Natural Product Sciences*, 21(3), 205–209.
- Sadeeshkumar, V., Duraikannu, A., Ravichandran, S., Kodisundaram, P., Fredrick, W., & Gobalakrishnan, R. (2017). Modulatory efficacy of dieckol on xenobiotic-metabolizing enzymes, cell proliferation, apoptosis, invasion and angiogenesis during NDEA-induced rat hepatocarcinogenesis. *Mol Cell Biochem.*, 433(1-2), 195–204. doi:10.1007/s11010-017-3027-8
- Saha, M., Rempt, M., Gebser, B., Grueneberg, J., Pohnert, G., & Weinberger, F. (2012). Dimethylsulphopropionate (DMSP) and proline from the surface of the brown alga *Fucus vesiculosus* inhibit bacterial attachment. *Biofouling*, 28(6), 593–604. doi: 10.1080/08927014.2012.698615

- Saha, M., Rempt, M., Grosser, K., Pohnert, G., & Weinberger, F. (2011). Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*. *Biofouling*, 27(4), 423–433. doi:10.1080/08927014.2011.580841
- Sandsdalen, E., Haug, T., Stensvåg, K., & Styrvold, O. B. (2003). The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 777–782. doi:10.1023/A:1026052715260
- Sanjeewa, K. K. A., Lee, J.-S., Kim, W.-S., & Jeon, Y. (2017). The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: An update on anticancer effects reported for fucoidan and laminaran. *Carbohydrate Polymers*, 177, 451–459. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.005
- Sanjeewa, K., Kim, E., Son, K., & Jeon, Y. (2016). Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *J Photochem Photobiol B*, 162, 100–105. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027
- Santos, S. A. O., Félix, R., Pais, A. C. S., Rocha, S. M., & Silvestre, A. J. D. (2019). The Quest for Phenolic Compounds from Macroalgae: A Review of Extraction and Identification Methodologies. *Biomolecules*, 9(12):847, 56 pp. doi:10.3390/biom9120847
- Saravana, P., Cho, Y., Park, Y., Woo, H., & Chun, B. (2016). Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. *Carbohydr Polym*, 153, 518–525. doi:10.1016/j.carbpol.2016.08.014
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). Natural Products Isolation. In: S. D. Sarker, Z. Latif, & A. I. Gray (Eds.), *Natural Products Isolation* (2nd ed., pp. 1–26). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Sathya, R., Kanaga, N., Sankar, P., & Jeeva, S. (2017). Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(Supplement 2), S2608–S2614. doi:10.1016/j.arabjc.2013.09.039
- Satomi, Y. (2017). Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. *Anticancer Research*, 37(4), 1557–1562. doi:10.21873/anticancer.11484
- Satomi, Y., & Nishino, H. (2013). Inhibition of the enzyme activity of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 3A4 by fucoxanthin, a marine carotenoid. *Oncology Letters*, 6(3), 860–864. doi:10.3892/ol.2013.1457
- Sawaki, A., Hoki, N., Ito, S., Matsumoto, K., Mizuno, N., Hara, K., ... Yamao, K. (2009). Clinical impact of radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Journal of Gastroenterology*, 44(12), 1209–1214. doi:10.1007/s00535
- Schagerström, E., Forslund, H., Kautsky, L., Pärnoja, M., & Kotta, J. (2014). Does thalli complexity and biomass affect the associated flora and fauna of two co-occurring *Fucus* species in the Baltic Sea? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 149, 187–193. doi:10.1016/j.ecss.2014.08.022
- Seidel, V. (2006). Initial and Bulk Extraction. In: S. D. Sarker, Z. Latif, & A. I. Gray (Eds.), *Natural Products Isolation* (2nd ed., pp. 27–46). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Kim, S.-K. (2013). Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 366–374. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030
- Seufferlein T., Ettrich T.J. (2019). Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC). *Transl Gastroenterol Hepatol.*, 4(21), 5 pp. doi:10.21037/tgh.2019.03.05
- Seufferlein, T., Porzner, M., Becker, T., Budach, V., Ceyhan, G., Esposito, I., ... Yekebas, E. (2013). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 51(12), 1395–1440. doi:10.1055/s-0033-1356220
(oder auch: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>)
- Shamoto, T., Matsuo, Y., Shibata, T., Tsuboi, K., Nagasaki, T., Takahashi, H., ... Takeyama, H. (2014). Zerumbone Inhibits Angiogenesis by Blocking NF-κB Activity in Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 43(3), 396–404. doi: 10.1097/MPA.0000000000000039
- Shankar, S., Marsh, L. M., & Srivastava, R. K. (2013). EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C Nude mice through modulation of FKHL1/FOXO3a and neuropilin. *Mol Cell Biochem.*, 372(1-2), 83–94. doi:10.1007/s11010-012-1448-y.EGCG
- Shankar, S., Nall, D., Tang, S.-N., Meeker, D., Passarini, J., Sharma, J., & Srivastava, R. K. (2011). Resveratrol Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics in Human and KrasG12D Transgenic Mice by Inhibiting Pluripotency Maintaining Factors and Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 6(1):e16530, 13 pp. doi:10.1371/journal.pone.0016530

- Shen, H.-Y., Li, L.-Z., Xue, K.-C., Hu, D.-D., & Gao, Y.-J. (2017). Antitumor activity of fucoidan in anaplastic thyroid cancer via apoptosis and anti-angiogenesis. *Molecular Medicine Reports*, *15*(5), 2620–2624. doi:10.3892/mmr.2017.6338
- Shi, C., Hruban, R. H., & Klein, A. P. (2009). Familial Pancreatic Cancer. *Arch Pathol Lab Med*, *133*(3), 365–374. doi:10.1043/1543-2165-133.3.365
- Shibata, T., Nagayama, K., Sugiura, S., Makino, S., Ueda, M., & Tamaru, Y. (2015). Analysis on Composition and Antioxidative Properties of Phlorotannins Isolated from Japanese *Eisenia* and *Ecklonia* Species. *American Journal of Plant Sciences*, *6*(15), 2510–2521. doi:10.4236/ajps.2015.615253
- Shibata, T., Nagayama, K., Tanaka, R., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. (2003). Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *Journal of Applied Phycology*, *15*(1), 61–66. doi:10.1023/A:1022972221002
- Sideras, K., Braat, H., Kwekkeboom, J., van Eijck, C. H., Peppelenbosche, M. P., Sleijfer, S., & Bruno, M. (2014). Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies. *Cancer Treatment Reviews*, *40*(4), 513–522. doi:10.1016/j.ctrv.2013.11.005
- Sieburth, J. M. N., & Conover, J. T. (1965). *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature*, *208*(5005), 52–53. doi:10.1038/208052a0
- Silverman, D. T., Swanson, C. A., Gridley, G., Wacholder, S., Greenberg, R. S., Brown, L. M., ... Hoover, R. N. (1998). Dietary and Nutritional Factors and Pancreatic Cancer: a Case-Control Study Based on Direct Interviews. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(22), 1710–1719. doi:10.1093/jnci/90.22.1710
- Singh, S., Sharma, B., Kanwar, S. S., & Kumar, A. (2016). Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. *Frontiers in Plant Science*, *7*:1667, 13 pp. doi:10.3389/fpls.2016.01667
- Singleton, V. L. (1985). This Week's Citation Classic: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid-reagents. *Current Contents*, (48), 18–18.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.
- Stanciu, C., & Bennet, J. R. (1974). Alginate/Antacid in the Reduction of Gastro-Oesophageal Reflux. *The Lancet*, *303*(7848), 109–111. doi:10.1016/S0140-6736(74)92340-X
- Steevensz, A. J., MacKinnon, S. L., Hankinson, R., Craft, C., Connan, S., Stengel, D. B., & Melanson, J. E. (2012). Profiling phlorotannins in brown macroalgae by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, *23*(5), 547–553. doi:10.1002/pca.2354.
- Steneberg, A. (2004). Algen in Ernährung und Medizin - Meersalat und Wunderdroge? *Umwelt & Gesundheit*, *3*, 102–107.
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. (Eds.). (2014). *World Cancer Report 2014*. Lyon, France: International Agency for research on Cancer, 630 pp.
- Strobel, O., Neoptolemos, J., Jäger, D., Büchler, M.W. (2019). Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nat Rev Clin Oncol*, *16*, 11–26. doi:10.1038/s41571-018-0112-1
- Su, J., Zhou, X., Yin, X., Wang, L., Zhao, Z., Hou, Y., ... Wang, Z. (2017). The effects of curcumin on proliferation, apoptosis, invasion, and NEDD4 expression in pancreatic cancer. *Biochemical Pharmacology*, *140*, 28–40. doi:10.1016/j.bcp.2017.05.014
- Subramaniam, D., Kaushik, G., Dandawate, P., & Anant, S. (2018). Targeting Cancer Stem Cells for Chemoprevention of Pancreatic Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(22), 2585–2594. doi:10.2174/0929867324666170127095832
- Sudo, K., Yamaguchi, T., Ishihara, T., Nakamura, K., Hara, T., Denda, T., ... Yokosuka, O. (2011). Phase II Study of Oral S-1 and Concurrent Radiotherapy in Patients with Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*, *80*(1), 119–125. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.01.027
- Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M., & Hirata, T. (2006). Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(26), 9805–9810. doi:10.1021/jf062204q
- Sun, J., & Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*, *6*(4), 1285–1309. doi:10.3390/ma6041285
- Synytsya, A., Kim, W.-J., Kim, S.-M., Pohl, R., Synytsya, A., Kvasnička, F., ... Park, Y. II. (2010). Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers*, *81*(1), 41–48. doi:10.1016/j.carbpol.2010.01.052
- Takahashi, H., Kawaguchi, M., Kitamura, K., Narumiya, S., Kawamura, M., Tengan, I., ... Shirahata, S. (2018). An Exploratory Study on the Anti-inflammatory Effects of Fucoidan in Relation to Quality of Life in Advanced Cancer Patients. *Integrative Cancer Therapies*, *17*(2), 282–291. doi:10.1177/1534735417692097

- Tan, C., & Hou, Y. (2014). First Evidence for the Anti-inflammatory Activity of Fucoxanthin in High-Fat-Diet-Induced Obesity in Mice and the Antioxidant Functions in PC12 Cells. *Inflammation*, *37*(2), 443–450. doi:10.1007/s10753-013-9757-1
- Tanniou, A., Vandanjon, L., Incera, M., Serrano Leon, E., Husa, V., Le Grand, J., ... Stiger-Pouvreau, V. (2014). Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *Journal of Applied Phycology*, *26*(2), 1215–1230. doi:10.1007/s10811-013-0198-x
- Tatarenkov, A., Jönsson, R. B., Kautsky, L., & Johannesson, K. (2007). Genetic structure in populations of *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) over spatial scales from 10 m to 800 km. *Journal of Phycology*, *43*(4), 675–685. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00369.x
- Teas, J. (1981). The consumption of seaweed as a protective factor in the etiology of breast cancer. *Medical Hypotheses*, *7*(5), 601–613. doi:10.1016/0306-9877(81)90004-9
- Teas, J., Pino, S., Critchley, A., & Braverman, L. E. (2004). Variability of Iodine Content in Common Commercially Available Edible Seaweeds. *Thyroid*, *14*(10), 836–841. doi:10.1089/thy.2004.14.836
- Teas, J., Vena, S., Cone, D. L., & Irhimeh, M. (2013). The consumption of seaweed as a protective factor in the etiology of breast cancer: proof of principle. *Journal of Applied Phycology*, *25*(3), 771–779. doi:10.1007/s10811-012-9931-0
- Teng, H., Yang, Y., Wei, H., Liu, Z., Liu, Z., Ma, Y., ... Zou, X. (2015). Fucoïdan Suppresses Hypoxia-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Mouse Hepatocarcinoma Hongming Teng 1, Yazong Yang. *Marine Drugs*, *13*(6), 3514–3530. doi:10.3390/md13063514
- Terasaki, M., Matsumoto, N., Hashimoto, R., Endo, T., Maeda, H., Hamada, J., ... Mutoh, M. (2019). Fucoxanthin administration delays occurrence of tumors in xenograft mice by colonospheres, with an anti-tumor predictor of glycine. *J Clin Biochem Nutr*, *64*(1), 52–58. doi:10.3164/jcbn.18
- Thind, K., Padrnos, L. J., Ramanathan, R. K., & Borad, M. J. (2017). Immunotherapy in pancreatic cancer treatment: a new frontier. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *10*(1), 168–194. doi:10.1177/1756283X16667909
- Thomas, R. (Ed.). (2004). *Practical Guide to ICP-MS* (1st ed.). New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 324 pp.
- Trauzold, A., Röder, C., Sipos, B., Karsten, K., Arlt, A., Jiang, P., ... Kalthoff, H. (2005). CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *The FASEB Journal*, *19*(6), 620–622. doi:10.1096/fj.04-2984fje
- Tsai, H., Tai, C., Huang, C., Chang, F., & Wang, J. (2017). Efficacy of Low-Molecular-Weight Fucoïdan as a Supplemental Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Marine Drugs*, *15*(4):122, 12 pp. doi:10.3390/md15040122
- Tuomi, J., Ilvessalo, H., Niemelä, P., Sirén, S., & Jormalainen, V. (1989). Within-plant variation in phenolic content and toughness of the brown alga *Fucus vesiculosus* L. *Botanica Marina*, *32*(6), 505–509. doi:10.1515/botm.1989.32.6.505
- Ueda, J., Athikomkulchai, S., Miyatake, R., Saiki, I., Esumi, H., & Awale, S. (2014). (+)-Grandifloracin, an antiausterity agent, induces autophagic PANC-1 pancreatic cancer cell death. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 39–47. doi:10.2147/DDDT.S52168
- Ueno, H., Kosuge, T., Matsuyama, Y., Yamamoto, J., Nakao, A., Egawa, S., ... Kanemitsu, K. (2009). A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *British Journal of Cancer*, *101*(6), 908–915. doi:10.1038/sj.bjc.6605256
- Van Alstyne, K. L. (1995). Comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds. *Journal of Chemical Ecology*, *21*(1), 45–58. doi:10.1007/BF02033661
- Van den Hoek, C., Jahns, H. M., & Mann, D. G. (1993). *Algen*. (C. van den Hoek, H. M. Jahns, & D. G. Mann, Eds.) (3rd ed.). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 411 pp.
- Van Poppel, G., & van den Berg, H. (1997). Vitamins and cancer. *Cancer Letters*, *114*(1-2), 195–202. doi:10.1016/S0304-3835(97)04662-4
- Vaz, A. P., Ponnusamy, M. P., Seshacharyulu, P., & Batra, S. K. (2014). A concise review on the current understanding of pancreatic cancer stem cells. *Journal of Cancer Stem Cell Research*, *2*:e1004, 12 pp. doi:10.14343/JCSCR.2014.2e1004
- Vaz, J., Ansari, D., Sasor, A., & Andersson, R. (2015). SPARC: A Potential Prognostic and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. *Pancreas*, *44*(7), 1024–1035. doi:10.1097/MPA.0000000000000409
- Vendrelly, V., Peuchant, E., Buscail, E., Moranvillier, I., Rousseau, B., Bedel, A., ... Dabernat, S. (2017). Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. *Cancer Letters*, *390*, 91–102. doi:10.1016/j.canlet.2017.01.002

- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K., & Kim, S. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *72*, 269–281. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet*, *378*(9791), 607–620. doi:10.1016/S0140-6736(10)62307-0
- Vissers, A. M., Caligiani, A., Sforza, S., Vincken, J.-P., & Gruppen, H. (2017). Phlorotannin Composition of *Laminaria digitata*. *Phytochemical Analysis*, *28*(6), 487–495. doi:10.1002/pca.2697
- Vogt, H., & Schramm, W. C. D. of F. in K. B. W. A. the C. (1991). Conspicuous decline of *Fucus* in Kiel Bay (Western Baltic): what are the causes? *Marine Ecology Progress Series*, *69*, 189–194. doi:10.3354/meps069189
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., ... Renschler, M. F. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, *369*(18), 1691–1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C., Friess, H., & Büchler, M. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Surgery*, *91*(5), 586–594. doi:10.1002/bjs.4484
- Wang, J., Chen, S., Xu, S., Yu, X., Dongqing, M., Hu, X., & Cao, X. (2012). In Vivo Induction of Apoptosis by Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Associated with Down-Regulating STAT3/EGFR Signaling in Sarcoma 180 (S180) Xenografts-Bearing Mice. *Marine Drugs*, *10*(9), 2055–2068. doi:10.3390/md10092055
- Wang, J., Zhang, W., Sun, L., Yu, H., Ni, Q.-X., Risch, H., & Gao, Y.-T. (2012). Green tea drinking and risk of pancreatic cancer: a large-scale, population-based case-control study in urban Shanghai. *Cancer Epidemiology*, *36*(6), e354–e358. doi:10.1016/j.canep.2012.08.004
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Liu, H., Gu, L., Kristinsson, H. G., Raghavan, S., & Ólafsdóttir, G. (2012). Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(23), 5874–5883. doi:10.1021/jf3003653
- Wang, W., Wu, J., Zhang, X., Hao, C., Zhao, X., Jiao, G., ... Yu, G. (2017). Inhibition of Influenza A Virus Infection by Fucoidan Targeting Viral Neuraminidase and Cellular EGFR Pathway. *Scientific Reports*, *7*:40760, 14 pp. doi:10.1038/srep40760
- Wang, Y., Halls, C., Zhang, J., Matsuno, M., Zhang, Y., & Yu, O. (2011). Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, *13*(5), 455–463. doi:10.1016/j.ymben.2011.04.005
- Wang, Z.-J., Zheng, L., Yang, J.-M., Kang, Y., & Park, Y.-D. (2018). Proteomic analyses for profiling regulated proteins/enzymes by *Fucus vesiculosus* fucoidan in B16 melanoma cells: a combination of enzyme kinetics functional study. *Int J Biol Macromol*, *112*, 667–674. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.011
- Wang-Gillam, A., Li, C.-P., Bodoky, G., Dean, A., Shan, Y.-S., Jameson, G., ... Chen, L.-T. (2016). Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, *387*(10018), 545 – 557. doi:10.1016/S0140-6736(15)00986-1
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, *93*(9), 2325–2327. doi:10.1021/ja00738a045
- Wan-Loy, C., & Siew-Moi, P. (2016). Marine Algae as a Potential Source for Anti-Obesity Agents. *Marine Drugs*, *14*(12):222, 19 pp. doi:10.3390/md14120222
- Washington, N., & Denton, G. (1995). Effect of Alginate and Alginate-cimetidine Combination Therapy on Stimulated Postprandial Gastro-oesophageal Reflux. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *47*(11), 879–882. doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb03264.x
- Wehr, J. D. (2016). Brown Algae (Phaeophyceae) in Rivers. In: O. Necchi JR (Ed.), *River Algae* (pp. 129–151). Cham: Springer.
- Wei, R., Lee, M.-S., Lee, B., Oh, C.-W., Choi, C.-G., & Kim, H.-R. (2016). Isolation and identification of anti-inflammatory compounds from ethyl acetate fraction of *Ecklonia stolonifera* and their anti-inflammatory action. *Journal of Applied Phycology*, *28*(6), 3535–3545. doi:10.1007/s10811-016-0847-y
- Weller, M. G. (2012). A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*, *12*(7), 9181–9209. doi:10.3390/s120709181
- Wersal, R. M., & Madsen, J. D. (2012). *Aquatic Plants Their Uses and Risks - A review of the global status of aquatic plants*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Ed.), The International Plant Protection Convention, 60 pp.
- Wijesekara, I., Yoon, N. Y., & Kim, S.-K. (2010). Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *BioFactors*, *36*(6), 408–414. doi:10.1002/biof.114

- Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y.-J. (2012). Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 13–20. doi:10.1016/j.carbpol.2011.12.029
- Wikström, S. A., & Kautsky, L. (2007). Structure and diversity of invertebrate communities in the presence and absence of canopy-forming *Fucus vesiculosus* in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 72(1-2), 168–176. doi:10.1016/j.ecss.2006.10.009
- Wild, C., Weiderpass, E., & Stewart, B. W. (Eds.). (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 611 pp.
- Winter, J. M., Cameron, J. L., Campbell, K. A., Arnold, M. A., Chang, D. C., Coleman, J., ... Yeo, C. J. (2006). 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg*, 10(9), 1199–1210. doi: 10.1016/j.gassur.2006.08.018
- Wittekind, C. (Ed.). (2017). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren* (8. Auflage.). Weinheim: WILEY-VCH, 336 pp.
- Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). Recent Progress in Pancreatic Cancer. *A Cancer Journal for Clinicians*, 63(5), 318–348. doi:10.3322/caac.21190
- Wong, H. H., & Lemoine, N. R. (2009). Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 6(7), 412–422. doi:10.1038/nrgastro.2009.89
- Wu, X. (2015). *Anti-proliferative effect of fucoxanthin on human pancreatic cancer cells*. Master Thesis, Auckland University of Technology, publicly available from 2021-11-17 from <http://hdl.handle.net/10292/9557>
- Wynne, M. J. (1981). Phaeophyta: Morphology and Classification. In: C. S. Lobban & M. J. Wynne (Eds.), *The Biology of Seaweeds* (pp. 52–85). Berkeley and Los Angeles: Blackwell Scientific Publications.
- Xu, Q., Zong, L., Chen, X., Jiang, Z., Nan, L., Li, J., ... Ma, Z. (2015). Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 10–19. doi:10.1111/nyas.12837
- Xu, X., Song, F., Wang, S., Li, S., Xiao, F., Zhao, J., ... Shi, J. (2004). Dibenzyl Bromophenols with Diverse Dimerization Patterns from the Brown Alga *Leathesia nana*. *J Nat Prod.*, 67(10), 1661–1666. doi:10.1021/np0400609
- Xue, M., Ge, Y., Zhang, J., Wang, Q., Hou, L., Liu, Y., ... Li, Q. (2012). Anticancer Properties and Mechanisms of Fucoidan on Mouse Breast Cancer In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 7(8):e43483, 9 pp. doi:10.1371/journal.pone.0043483
- Yamamoto, I., Nagumo, T., Fujihara, M., Takahashi, M., Ando, Y., Okada, M., & Kawai, K. (1977). Antitumor effects of seaweeds. *Jap.J.Exp.Med.*, 47(3), 133–140.
- Yamamoto, I., Nagumo, T., Takahashi, M., Fujihara, M., Suzuki, Y., & Iizima, N. (1981). Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effect of an extract from *Sargassum kjellmanianum*. *Jap.J.Exp.Med.*, 51(3), 187–189.
- Yamamoto, I., Nagumo, T., Yagi, K., Tominaga, H., & Aoki, M. (1974). Antitumor effect of seaweeds. I. Antitumor effect of extracts from *Sargassum* and *Laminaria*. *Jap.J.Exp.Med.*, 44(6), 543–546.
- Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E., & Maruyama, H. (1982). Antitumor activity of crude extracts from edible marine algae against L-1210 leukemia. *Botanica Marina*, 25 (9), 455–457. doi:10.1515/botm.1982.25.9.455
- Yamamoto I., Takahashi M., Tamura E., Maruyama H., Mori H. (1984) Antitumor activity of edible marine algae: Effect of crude fucoidan fractions prepared from edible brown seaweeds against L-1210 leukemia. In: Bird C.J., Ragan M.A. (Eds.) *Eleventh International Seaweed Symposium. Developments in Hydrobiology, Vol 22* (pp. 145–148). Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-94-009-6560-7_22
- Yamamoto, K., Ishikawa, C., Katano, H., Yasumoto, T., & Mori, N. (2011). Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Letters*, 300(2), 225–234. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.016
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., & Nagata, T. (1999). Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(3), 605–607. doi:10.1271/bbb.63.605
- Yang, G., Zhang, Q., Kong, Y., Xie, B., Gao, M., Tao, Y., ... Wu, X. (2015). Antitumor activity of fucoidan against diffuse large B cell lymphoma in vitro and in vivo. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(11), 925–931. doi:10.1093/abbs/gmv094
- Yende, S. R., Harle, U. N., & Chaugule, B. B. (2014). Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum species*. *Pharmacognosy Review*, 8(15), 1–7. doi:10.4103/0973-7847.125514
- Yin, L., Xiao, X., Georgikou, C., Luo, Y., Liu, L., Gladkich, J., ... Herr, I. (2019). Sulforaphane Induces miR135b-5p and Its Target Gene, RASAL2, thereby Inhibiting the Progression of Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy: Oncolytics*, 14, 74–81. doi:10.1016/j.omto.2019.03.011

- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & DePinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*, *30*(4), 355–385. doi:10.1101/gad.275776.115
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(5), 809–818. doi:10.1093/molbev/msh075
- Yoshida, K., Toden, S., Ravindranathan, P., Han, H., & Goel, A. (2017). Curcumin sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine by attenuating PRC2 subunit EZH2, and the lncRNA PVT1 expression. *Carcinogenesis*, *38*(10), 1036–1046. doi:10.1093/carcin/bgx065
- You, S. H., Kim, J.-S., & Kim, Y.-S. (2018). Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Two Human Breast Cancer Cell Lines by Dieckol Isolated from *Ecklonia cava*. *Journal of Breast Disease*, *6*(2), 39–45. doi:10.14449/jbd.2018.6.2.39
- Youns, M., & Hegazy, W. A. H. (2017). The Natural Flavonoid Fisetin Inhibits Cellular Proliferation of Hepatic, Colorectal, and Pancreatic Cancer Cells through Modulation of Multiple Signaling Pathways. *PLoS ONE*, *12*(1):e0169335, 18 pp. doi:10.1371/journal.pone.0169335
- Yue, Q., Gao, G., Zou, G., Yu, H., & Zheng, X. (2017). Natural Products as Adjunctive Treatment for Pancreatic Cancer: Recent Trends and Advancements. *BioMed Research International*, *2017*:8412508, 13 pp. doi:10.1155/2017/8412508
- Yuguchi, Y., Tran, V. T. T., Bui, L. M., Takebe, S., Suzuki, S., Nakajima, N., ... Thanh, T. T. T. (2016). Primary structure, conformation in aqueous solution, and intestinal immunomodulating activity of fucoidan from two brown seaweed species *Sargassum crassifolium* and *Padina australis*. *Carbohydrate Polymers*, *147*, 69–78. doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.101
- Yun, C. W., Yun, S., Lee, J. H., Han, Y.-S., Yoon, Y. M., An, D., & Lee, S. H. (2016). Silencing Prion Protein in HT29 Human Colorectal Cancer Cells Enhances Anticancer Response to Fucoidan. *Anticancer Research*, *36*(9), 4449–4458. doi:10.21873/anticancer.10989
- Zayed, A., Hahn, T., Finkelmeier, D., Burger-Kentischer, A., Rupp, S., Krämer, R., & Ulber, R. (2019). Phenomenological investigation of the cytotoxic activity of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus*. *Process Biochemistry*, *81*, 182–187. doi:10.1016/j.procbio.2019.03.026
- Zayed, A., Muffler, K., Hahn, T., Rupp, S., Finkelmeier, D., Burger-Kentischer, A., & Ulber, R. (2016). Physicochemical and Biological Characterization of Fucoidan from *Fucus vesiculosus* Purified by Dye Affinity Chromatography. *Marine Drugs*, *14*(4):79, 15 pp. doi:10.3390/md14040079
- Zenthoefer, M., Geisen, U., Hofmann-Peiker, K., Fuhrmann, M., Kerber, J., Kirchhöfer, R., ... Kalthoff, H. (2017). Isolation of polyphenols with anticancer activity from the Baltic Sea brown seaweed *Fucus vesiculosus* using bioassay-guided fractionation. *Journal of Applied Phycology*, *29*(4), 2021–2037. doi:10.1007/s10811-017-1080-z
- Zhang, G.-N., Liang, Y., Zhou, L.-J., Chen, S.-P., Chen, G., Zhang, T.-P., ... Zhao, Y.-P. (2011). Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, *313*(2), 137–144. doi:10.1016/j.canlet.2011.05.030
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., ... Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*:723515, 10 pp. doi:10.1155/2015/723515
- Zhang, J., Riby, J. E., Conde, L., Grizzle, W. E., Cui, X., & Skibola, C. F. (2016). A *Fucus vesiculosus* extract inhibits estrogen receptor activation and induces cell death in female cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*:151, 9 pp. doi:10.1186/s12906-016-1129-6
- Zhang, M., Guo, J., Hu, X., Zhao, S., Li, S., & Wang, J. (2019). An in vivo anti-tumor effect of eckol from marine brown algae by improving the immune response. *Food Funct*, *10*(7), 4361–4371. doi:10.1039/c9fo00865a
- Zhang, M., Zhou, W., Zhao, S., Li, S., Yan, D., & Wang, J. (2019). Eckol inhibits Reg3A-induced proliferation of human SW1990 pancreatic cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *18*(4), 2825–2832. doi:10.3892/etm.2019.7889
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A., & Barrow, C. J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, *18*, 445–450. doi:10.1007/s10811-006-9048-4
- Zhang, S., Liu, Q., Liu, Y., Qiao, H., & Liu, Y. (2012). Zerumbone, a Southeast Asian Ginger Sesquiterpene, Induced Apoptosis of Pancreatic Carcinoma Cells through p53 Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*:936030, 8 pp. doi:10.1155/2012/936030
- Zhang, W., Oda, T., Yu, Q., & Jin, J.-O. (2015). Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans. *Marine Drugs*, *13*(3), 1084–1104. doi:10.3390/md13031084

- Zhao, D., Kwon, S., Chun, Y., Gu, M., & Yang, H. (2017). Anti-Neuroinflammatory Effects of Fucoxanthin via Inhibition of Akt/NF- κ B and MAPKs/AP-1 Pathways and Activation of PKA/CREB Pathway in Lipopolysaccharide-Activated BV-2 Microglial Cells. *Neurochem Res*, 42(2), 667–677. doi:10.1007/s11064-016-2123-6
- Zhou, W., Kallifatidis, G., Baumann, B., Rausch, V., Mattern, J., Gladkich, J., ... Herr, I. (2010). Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. *International Journal of Oncology*, 37(3), 551–561. doi:10.3892/ijo_00000704
- Zhu, Y., & Bu, S. (2017). Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017:5787218, 13 pp. doi:10.1155/2017/5787218
- Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C. M., Hruban, R. H., & Konieczny, S. F. (2007). Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American journal of pathology*, 171(1), 263–273. doi:10.2353/ajpath.2007.061176
- Zhurishkina, E., Stepanov, S., Shvetsova, S., Kulminskaya, A., & Lapina, I. (2017). A Comparison of the Effect of Fucoxanthin from Alga *Fucus vesiculosus* and Its Fractions Obtained by Anion-Exchange Chromatography on HeLa G-63, Hep G2, and Chang Liver Cells. *Cell and Tissue Biology*, 11(3), 242–249. doi:10.1134/S1990519X17030117
- Zorofchian Moghadamtousi, S., Karimian, H., Khanabdali, R., Razavi, M., Firoozinia, M., Zandi, K., & Kadir, H. A. (2014). Anticancer and antitumor potential of fucoxanthin and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. *The Scientific World Journal*, 2014:768323, 10 pp. doi:10.1155/2014/768323

Internetquellen

- AACR - American Association for Cancer Research (2019). *AACR Cancer Progress Report 2019*. Philadelphia: American Association for Cancer Research ©2019, abgerufen am 10.12.2019 von <http://www.cancerprogressreport.org/>
- AlgaeBase - Guiry, M., & Guiry, G. (2017). *Fucus vesiculosus* Linnaeus. *AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway*. Abgerufen am 10. 07.2017 von <https://www.algaebase.org>
- ALGApplus (2018). Seaweed sustainable cultivation. *Algaplus foodmatterslive press kit*. Abgerufen am 30.06.2020 von <https://www.foodmatterslive.com/uploads/2018-08/algaplus-foodmatterslive-press-kit-1.pdf>
- CAU Kiel (2019). Aquaculture of *Fucus*. Abgerufen am 30.06.2020 von <https://www.biotechnologie.uni-kiel.de/de/forschung/physiologie-und-biotechnologie-der-pflanzlichen-zelle/fucus>
- FDA - U.S. Food and Drug Administration (2012). *Guidance for Industry - Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answer, June 2012*. Center for Veterinary Medicine, Office of Regulatory Affairs, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Devices and Radiological Health, Center for Biologics Evaluation and Research (Eds.), 10 pp. Abgerufen am 01.03.2020 von <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pyrogen-and-endotoxins-testing-questions-and-answers>
- Heberlein, C., & Jencio, H. (2016). Die Zeit wird knapp: ICH Q3D – „Guideline for Elemental Impurities“. *Chemingenieur Fachartikel, Newsletter Nr. 76*, November 2016, 22. Jahrgang, 1-4. Abgerufen am 29.05.2018 von <https://docplayer.org/57891244-Newsletter-nr-76-november-jahrgang-die-zeit-wird-knapp-the-business-designers-pharma-compliance-1-4-die-zeit-wird-knapp.html>
- Lonza (2011). USP Endotoxin Limits for Common Injectables. *Updated as of August 2011*. Lonza Walkersville, Inc. ©2012, 13 pp. Abgerufen am 8.12.2018 von http://biowel.com/pdf/LifeScience/Lonza/Endotoxin/Lonza_ProductDataSheets_USP_Endotoxin_Limits_for_Common_Inje.pdf
- Madden, J.I. (2012). Infinity reports update from Phase 2 study of Saridegib plus Gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Infinity Pharmaceuticals, Inc. Press Release, Jan. 27, 2012*. Abgerufen am 10.09.2018 von <http://investors.infi.com/news-releases/news-release-details/infinity-reports-update-phase-2-study-saridegib-plus-gemcitabine>

NASA (2011). NASA/GSFC/JPL-Caltech. *Aquarius Aug. 25 - Sept. 11, 2011*. NASA Content Administrator (Ed.)
Abgerufen am 07.04.2018 von
https://www.nasa.gov/mission_pages/aquarius/multimedia/gallery/pia14786.html

Spektrum (2000). *Spektrum Online-Lexikon der Geowissenschaften - Gezeiten*. Heidelberg: Spektrum
Akademischer Verlag. Abgerufen am 06.04.2018 von
<https://www.spektrum.de/lexikon/geowissenschaften/gezeiten/5894>

Waterhouse A (2013). Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. Manual of Waterhouse Lab.
Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis. Abgerufen am 15.05.2013 von
<http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>

Produktbeschreibungen und Protokolle

Associates of Cape Cod Incorporated (2011). *Limulus*-Amöbocyten-Lysat: PYROCHROME®- zum Nachweis und
zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden).
PN000856 Rev6. Produktbeschreibung

PAA Laboratories GmbH (2006). Accutase - The solution for cell detachment.
Produktbeschreibung

Roche Diagnostics GmbH (2011). Cell Proliferation Kit II (XTT), Version 17.
Produktbeschreibung und Protokoll

Rohm & Haas (2003). Amberlite® XAD 16 - Industrial Grade Polymeric Adsorbent. PDS 0170 A.
Produktbeschreibung

Bildquellen

Abb. 1.1: Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. Die Abbildung wurde
entnommen aus: Bardeesy N, DePinho RA (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews
Cancer* 2 (12): 897-909, S. 899. doi: 10.1038/nrc949

Abb. 2.1: Kartenausschnitt aus Google Maps ©2013. Abgerufen am 09.05.2013 von
<https://www.google.de/maps/@54.3912356,10.1797372,11z>

Abb. 2.2: Verwendung der leicht modifizierten Abbildung mit freundlicher Genehmigung des LLUR – Schleswig-
Holsteins Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (ehemals LANU), Dr. Rolf Karez
und der MariLim - Gesellschaft für Gewässeruntersuchung mbH, Schönkirchen, Dr. Thomas Meyer. Die
Abbildung wurde entnommen aus: Fürhapter et al. (2008). *Kartierung mariner Pflanzenbestände im
Flachwasser der Ostseeküste - Schwerpunkt Fucus und Zostera*. Landesamt für Natur und Umwelt des
Landes Schleswig-Holstein: 1-310, S. 101. ISBN: 978-3-937937-32-8

Abb. 2.3-2.8: Eigene Fotografien.

Abb. 2.9: Eigene Fotografie und der Erlenmeyerkolben ist ein frei verwendbares Clipart von Pixabay. Abgerufen
am 26.05.2017 von <https://pixabay.com/de/erlenmeyerkolben-kolben-leer-labor-309612/>

Abb. 3.1, 3.3.: Eigene Fotografien.

Abb. 3.15: Fotografie von Karsten Hofmann-Peiker, Planton GmbH Kiel, mit freundlicher Genehmigung
verwendet.

Anhang

A.1 Studien mit *Fucus vesiculosus*

Tabelle A.1: Anti-Krebs-Studien mit Extrakten bzw. Inhaltsstoffen aus *F. vesiculosus*, exklusive der der Dissertation zugrundeliegenden Veröffentlichungen der eigenen Arbeitsgruppe [Zenthoefer et al. 2017; Geisen et al. 2015] und der Forsetzungsstudien am GEOMAR-Zentrum für Marine Biotechnologie [Heavisides et al. 2018] und im Rahmen des FucoSan-Projekts [Bittkau et al. 2019]. Die Auflistung repräsentiert den größten Teil der verfügbaren Veröffentlichungen zum Thema, erhebt aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Auch wurden Kombinationsstudien [Burney et al. 2018; Hsu et al. 2018; Atashrazm, Lowenthal, Dickinson et al. 2016; Yun et al. 2016] und Studien hinsichtlich krebsvorbeugender [Parys et al. 2010] oder immunmodulatorischer Aktivitäten [Zhang, Oda et al. 2015] nicht miteinbezogen. Crude steht für *engl.* grober, unreiner Extrakt.

Publikation	Sammelstandort des Algenmaterials	getesteter Extrakt bzw. Inhaltsstoff	eingesetzte Krebs-Zelllinien/Maus	Effekte
Zhurishkina et al. 2020	Algen gekauft von Alganika LLC, St. Petersburg	Furoidan crude, selbst extrahiert nach Bilan et al. [2010], und teilweise depolymerisiertes Furoidan	Hep G2 (humanes Hepatoblastom)	Inhibition der Proliferation, Induktion von Apoptose und Autophagie
Gupta et al. 2020	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma (F5631)	MG63 (humanes Osteosarkom)	Inhibition von Adhäsion und Proliferation, Induktion von Zellzyklusarrest in G1- und subG1-Phase und Apoptose, Schädigung der Mitochondrien
Oliveira et al. 2019	unbekannt	Furoidan	Brustkrebs	<i>in vitro</i> : Inhibition der Röhrenbildung (Angiogenesehemmung) <i>in vivo</i> : Reduktion der Zahl der Blutgefäße, Reduktion der Tumorgroße
Zayed et al. 2019	unbekannt	selbstproduzierte Furoidan-Fraktionen: furoidan_1, furoidan_6, furoidan_PDD	MCF-7 (humanes Brustadenokarzinom), Caco-2 (humanes epitheliales kolorektales Adenokarzinom)	Inhibition der Zellviabilität (MCF-7)
Blaszczak et al. 2018	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma (F5631, St. Louis, MO, USA)	H103, FaDu, KB (HPV ⁺) (Kopf- und Hals-Plattenepithelzell-Karzinom)	Inhibition der Proliferation, Induktion von Zellzyklusarrest in S/G2-Phase (H103, FaDu) oder G1-Phase (KB) und Apoptose, Steigerung der ROS-Produktion in H103, Absenkung von ROS in KB (HPV ⁺) (ROS = reaktive Sauerstoffmoleküle)

Kim und Nam 2018	unbekannt	Furoidan (sc-255187), gekauft von Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)	HT-29 (humanes kolorektales Adenokarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Einfluss auf die Signalwege IRS-1/PI3K/AKT und Ras/Raf/ERK
Wang et al. 2018	unbekannt (da keine Chargennummer angegeben)	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich	B16 (murines Melanom)	Veränderung von Proteinexpression und Enzymaktivität
Dithmer et al. 2017	Vereinigtes Königreich (Direktnachfrage bei Sigma, USA)	Furoidan crude (F5631), gekauft von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Lot Nr. O28K3779	92.1, Mel270, OMM2.5, OMM2.3, OMM1 (humanes Aderhautmelanom)	teilweise Steigerung der Proliferation, Reduktion der Proliferation nur in Mel270, teilweise Inhibition der Migration
Hsu et al. 2017	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	A549, CL1-5 (humanes Lungenadenokarzinom) / LLC1-Zellen (murines Lewis Lungenkarzinom) injiziert in C57BL/6-Mäuse	<i>in vitro</i> : Apoptoseinduktion <i>in vivo</i> : Inhibition des Tumorwachstums, Apoptoseinduktion
Mathew et al. 2017	Neuschottland (Canada) und Bretagne (Frankreich) [laut Website https://www.marinova.com.au/maritech-fucus-vesiculosus-extract/ , abgerufen am 04.02.2018]	Furoidan, gekauft von Marinova Pty Ltd. (Cambridge TAS, Australien)	HeLa, SiHa (humanes Gebärmutterhalskarzinom), MCF-7 (adeno), ZR-75 (duktales) (humanes Brustkarzinom), TOV-112D, SKOV-3 GFP-Luc (humanes Eierstockadenokarzinom)/alle Krebszelllinien injiziert in Nacktmäuse	<i>in vitro</i> : keine signifikante Reduktion der Zellviabilität <i>in vivo</i> : Inhibition des Tumorwachstums bei HeLa- und TOV-112d-Mäusen
Rui et al. 2017	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	DU-145 (humanes Prostatakarzinom)/DU-145-Zellen injiziert in athymische Nacktmäuse	<i>in vitro</i> : Reduktion der Zellviabilität, Inhibition der Proliferation, Migration und Röhrenbildung <i>in vivo</i> : Inhibition des Tumorwachstums, Angiogenesehemmung
Shen et al. 2017	Ostsee	Furoidan, selbst extrahiert	FTC-133, TPC-1 (humanes Schilddrüsenkarzinom)	Inhibition der Proliferation, Apoptoseinduktion, Inhibition von Migration und Röhrenbildung (Angiogenesehemmung)
Zhurishkina et al.	Algen gekauft	Furoidan crude, selbst	HeLa G-63	Reduktion der

2017	von OOO Alganika (Russland), Sammelstandort: an der Grenze der Weißen- und der Barentssee [laut Website https://alganika.com/for_cosmet_ologists/ , abgerufen am 24.01.2018]	extrahiert nach Bilan et al. [2010] und Fraktionen davon	(humanes Gebärmutterhalskarzinom)	Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Atashrazm, Lowenthal, Woods et al. 2016	unbekannt	Fucoidan crude (F5631), gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	NB4, HL60, KG1a, K562 (humane akute myeloische Leukämie)/NB4-Zellen injiziert in BALB/c athymische nu/nu Mäuse	<i>in vitro</i> : teilweise Inhibition der Proliferation, Apoptoseinduktion <i>in vivo</i> : Verzögerung des Tumorstwachstums, Steigerung der Aktivität von NK-Zellen
Zhang et al. 2016	Algen gekauft von Maine Coast Sea Vegetables, Inc. (Franklin, ME, USA), Sammelstandort: Golf von Maine, Nord-Atlantik, USA [laut Website www.seaveg.com , abgerufen am 27.01.2018]	wässriger Extrakt aus getrockneter Alge	MDA-MB-231 (adeno), MCF-7 (adeno), T47D (duktales) (humanes Brustkarzinom), OVCAR-3, Caov-3 (humanes Eierstockadenokarzinom), HEC-1-B (adeno), RL95-2, AN3CA (adeno) (humanes Gebärmutterkarzinom), MES-SA (humanes Gebärmutter-sarkom)	Reduktion der Zellviabilität, Induktion von Apoptose und Autophagie
Han et al. 2015	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	HT-29	Reduktion der Zellviabilität, Inhibition von Migration
Kawaguchi et al. 2015	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	HLF (humanes Leberzellkarzinom)	Inhibition der Proliferation, Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose
Park et al. 2015	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	EJ (humanes Blasenkarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Induktion Zellzyklusarrest und Apoptose
Yang et al. 2015	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	SUDHL-4, OCI-LY8, NU-DUL-1, TMD8, U2932, DB (humanes B-Zell-	<i>in vitro</i> : Inhibition der Proliferation, Induktion von Zellzyklusarrest und

			Lymphom)/OCI-LY8 Zellen injiziert in NOD/SCID- Mäuse	Apoptose <i>in vivo</i> : Inhibition des Tumorwachstums
Chen et al. 2014	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	MDA-MB-231 (humanes Brustadenokarzinom), HCT116 (humanes Kolonkarzinom)	Inhibition der Proliferation, Apoptoseinduktion
Cho et al. 2014	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	5637, T-24 (humanes Blasenkarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Inhibition der Proliferation, Induktion von Zellzyklusarrest, Inhibition von Migration und Invasion
Lee, Choi et al. 2014	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	MC3 (humanes Mucoepidermoidkarzinom)	Inhibition der Proliferation, Apoptoseinduktion
Nishiguchi et al. 2014	Lot-Nr. 066K3786: Vereinigtes Königreich, für Lot-Nr. 081M7672 ist der Sammelstandort nicht dokumentiert, ältere Charge (Direktnachfrage bei Sigma, USA)	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Lot-Nr. 066K3786 und 081M7672, außerdem Methanolextrakte davon (mit anorganischen Salzen und Polyphenolen) davon	U937 (humane akute myeloische Leukämie)	<i>Methanolextrakt von Furoidan</i> : Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Banafa et al. 2013	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (USA)	MCF-7 (humanes Brustadenokarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose
Hsu et al. 2013	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Hi-Q oligofuoidan® von Hi-Q Marine Biotech International Ltd (Taiwan) - nicht angegeben, welches in den Tests eingesetzt wurde	MDA-MB-231, MCF-7 (humanes Brustadenokarzinom), 4T1 (murines Brustadenokarzinom)/4T1 injiziert in Balb/c-Mäuse	<i>in vitro</i> : Reduktion der Zellviabilität, Inhibition von Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT), Migration und Invasion <i>in vivo</i> : Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung
Park et al. 2013	unbekannt	Furoidan crude (F5631), gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	U937 (humane akute myeloische Leukämie)	Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Lee et al. 2012	unbekannt	Furoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	A549 (humanes Lungenadenokarzinom)	<i>ab 400 µg/ml</i> : Reduktion der Zellviabilität, <i>bis 200 µg/ml</i> :

				Inhibition von Migration und Invasion
Xue et al. 2012	unbekannt	Fucoidan crude (F5631), gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	4T1 (murines Brustadenokarzinom)/4T1 injiziert in Balb/c-Mäuse	<i>in vitro</i> : Reduktion der Zellviabilität, Apoptose-Induktion <i>in vivo</i> : Inhibition von Tumorwachstum und Angiogenese, Apoptoseinduktion
Ale et al. 2011a	unbekannt	Fucoidan crude (F5631), gekauft von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	LLC (murines Lewis Lungenkarzinom), B16 (murines Melanom)/C57BL/6J-Mäuse	<i>in vitro</i> : Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion, <i>in vivo</i> : Steigerung der Aktivität von NK-Zellen
Ale et al. 2011b	unbekannt	Fucoidan crude (F5631), gekauft von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	B16 (murines Melanom)	Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Park et al. 2011	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	AGS (humanes Magenadenokarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Induktion von Apoptose und Autophagie
Jin et al. 2010	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	HL-60, THP-1, NB4 (humane akute myeloische Leukämie)	Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Kim et al. 2010	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich	HT-29 (humanes Kolorektales Adenokarzinom), HCT116 (humanes Kolonkarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Hyun et al. 2009	unbekannt	Fucoidan crude, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	HCT-15 (humanes Kolonadenokarzinom)	Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Cumashi et al. 2007	nicht angegeben	Fucoidan, selbst extrahiert nach Usov et al. [1998]	MDA-MB-231 (humanes Brustadenokarzinom)	Inhibition der Zelladhäsion an Blutplättchen (relevant bei Metastasierung)
Aisa et al. 2005	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	HS-Sultan (humanes Burkitt Lymphom)	Reduktion der Zellviabilität, Apoptoseinduktion
Koyanagi et al. 2003	unbekannt	Fucoidan, gekauft von Sigma, wurde weiter aufgereinigt und z.T. mit Sulfatgruppen angereichert	HUVEC (Normalzellen)/ Sarkoma 180 Zellen (murines Sarkom) implantiert in ICR Maus, LLC (murines Lewis Lungenkarzinom), B16 (murines Melanom) injiziert in ICR Maus	<i>in vitro</i> : Angiogenesehemmung <i>in vivo</i> : Angiogenesehemmung, Inhibition des Tumorwachstums

A.2 Fraktionen der XAD16-Grobfraktionierung

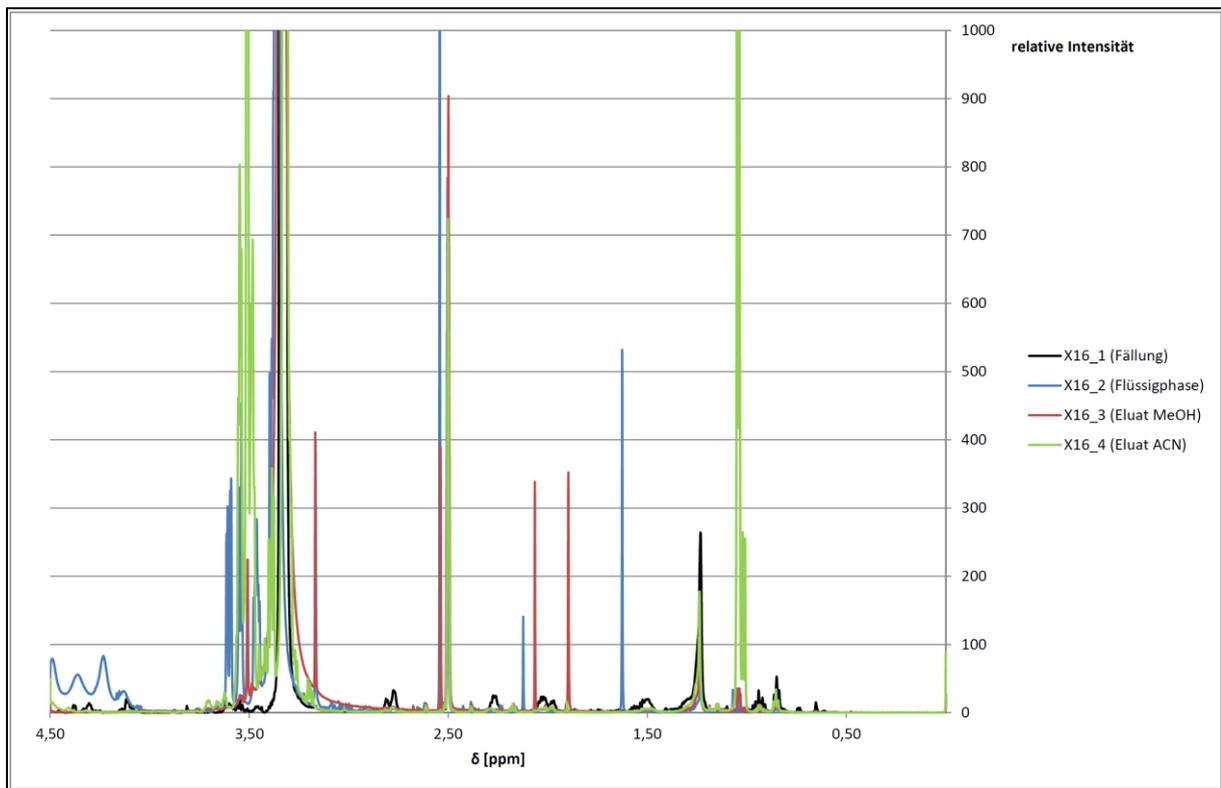


Abbildung A.1: Ausschnitt 2 der ¹H-NMR-Spektren der Fraktionen der XAD16-Festphasenextraktion. Die Fraktionen wurden in jeweils gleicher Konzentration mit c = 10 mg/ml in DMSO D6 + TMS gemessen.

A.3 Fraktionen der Bindungsstudie

Tabelle A.2: Gegenüberstellung der eluierten Massen der Fraktionen der Bindungsstudie und deren Aktivitäten gegenüber PancTU1-Zellen im Standard-Viabilitäts-Assay. Fraktionen, die mit der Sep-Pak® C18-Kartusche nachbearbeitet worden sind, wurden hier nicht miteinbezogen.

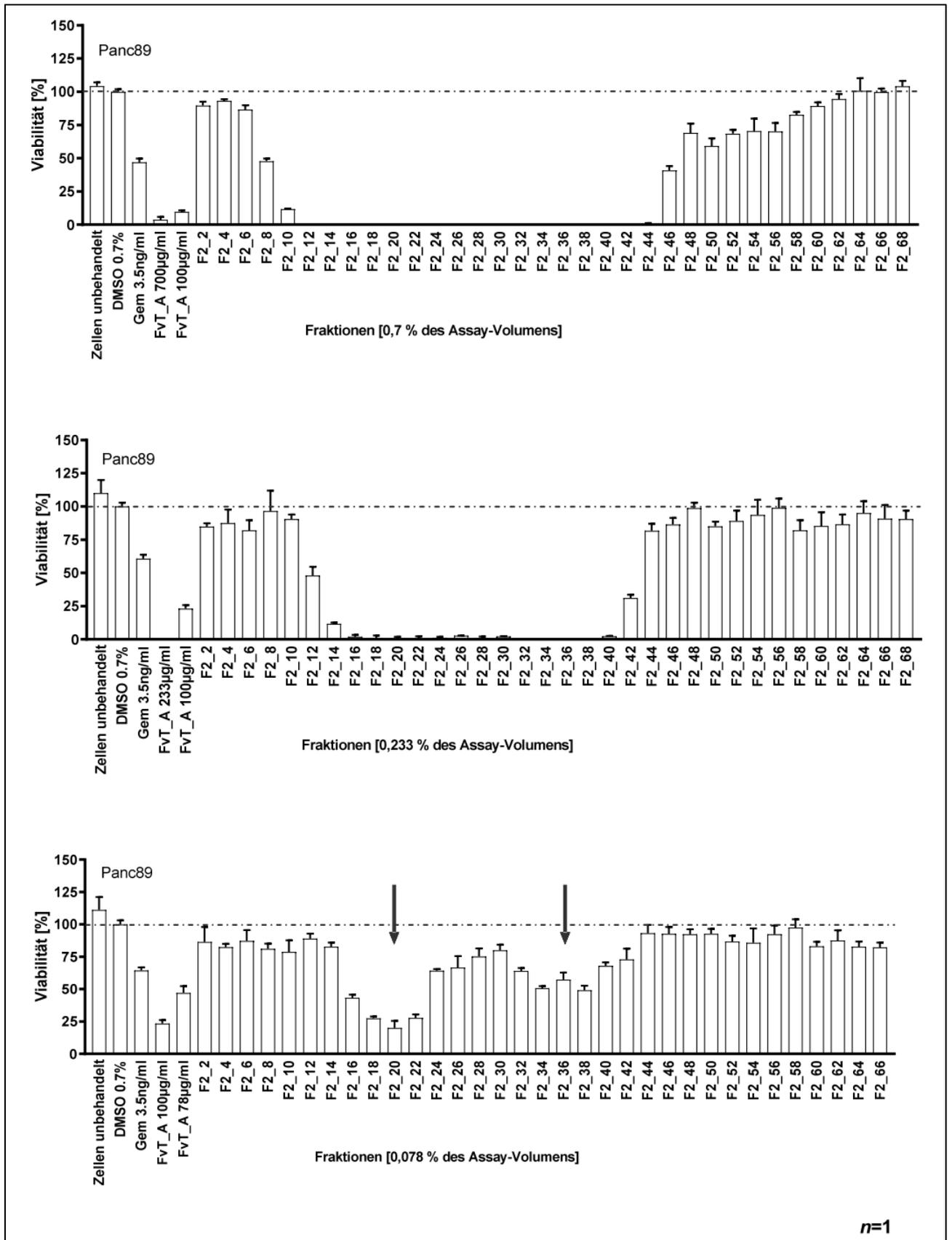
		größte eluierte Masse ← → kleinste eluierte Masse																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
stärkste Aktivität ↑	1	X7HP_2																			
	2				X1180_2																
	3						Ph_2														
	4							C18P_2													
	5														C4_3						

A.4 Aktivitäten der nachproduzierten Fraktionen im Standard-Viabilitäts-Assay und Identifizierung der Aktivitätspeak-Fraktionen

Die Fraktionen der fünf Wiederholungsläufe der Aufreinigung nach 3.2.3 wurden in einheitlichen Verdünnungen hinsichtlich ihrer Aktivitäten im Standard-Viabilitäts-Assay getestet (Abb. A.2 - A.7).

Die ursprünglichen Aktivitätspeak-Fraktionen F15/F16 und F36/F37 wurden in den Wiederholungsläufen in Kombinationen mit den erhaltenen, charakteristischen ^1H -NMR-Spektren (Abb. 3.21 bis 3.25 in Kapitel 3.2.6 und Abb. A.8 - A.11) wiederaufgefunden und eindeutig identifiziert (Abb. A.2 - A.7, Pfeile). Die beobachteten ähnlichen Elutionszeiten der ursprünglichen und neuen Aktivitätspeak-Fraktionen bestätigten die Ergebnisse (siehe Tabelle A.3).

Abbildung A.2: Aktivitäten der Fraktionen der 1. Nachproduktion gegenüber Panc89-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Aktivitäts-Peaks des ursprünglichen Fraktionierungslaufs wurden wieder aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F2_20 und Peak 2 bei den Fraktionen F2_34-38 (Pfeile). Jede zweite Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in drei unterschiedlichen Verdünnungen und in jeder Verdünnungsstufe mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin (Gem, 2,5 ng/ml, ungefähre IC_{50} -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen sowie in der wirksamen Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$).



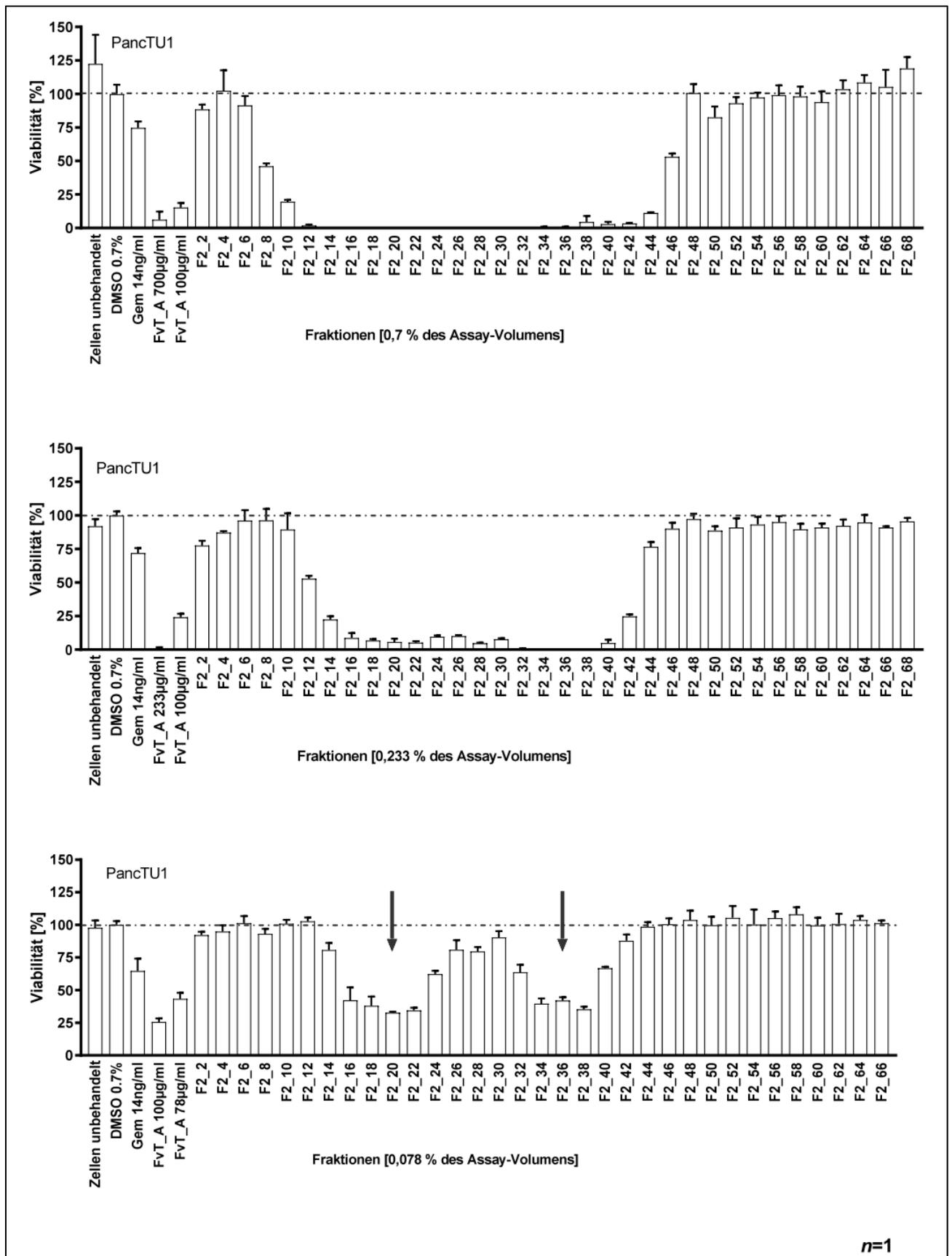


Abbildung A.3: Aktivitäten der Fraktionen der 1. Nachproduktion gegenüber PancTU1-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Aktivitäts-Peaks des ursprünglichen Fraktionierungslaufs wurden wieder aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F2_20 und Peak 2 bei den Fraktionen F2_34-38 (Pfeile). Jede zweite Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in drei unterschiedlichen Verdünnungen und in jeder Verdünnungsstufe

n=1

mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin (Gem, 2,5 ng/ml, ungefähre IC_{50} -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen sowie in der wirksamen Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$).

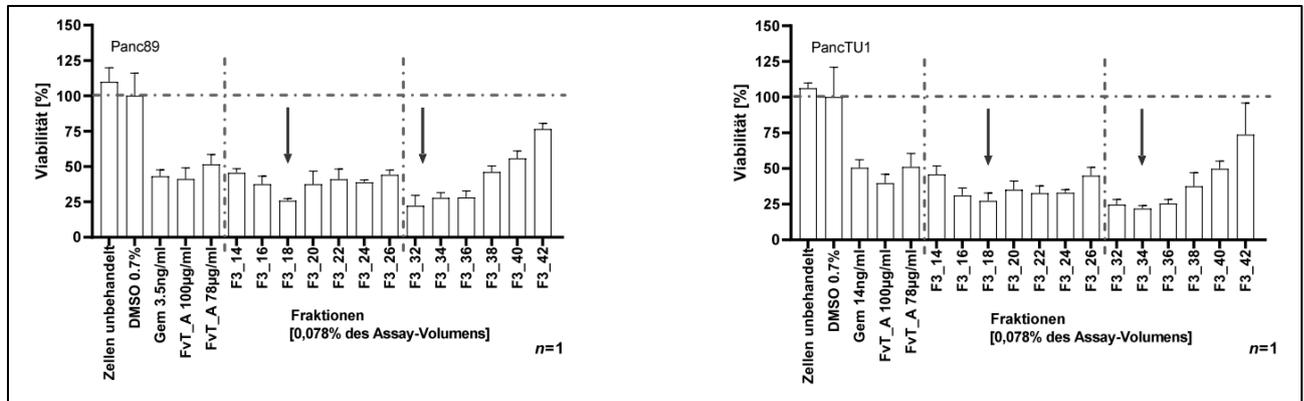


Abbildung A.4: Aktivitäten der Fraktionen der 2. Nachproduktion gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Aktivitäts-Peaks des ursprünglichen Fraktionierungslaufs wurden wieder aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F3_18 und Peak 2 um Fraktion F3_34 (Pfeile). Jede zweite Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in einer 1:9-Verdünnung und mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin ($c \approx IC_{50}$ -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen sowie in der bisher wirksamen Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$). Die eingesetzten Konzentrationen der Peakfraktionen waren: F3_18: 14,9 $\mu\text{g/ml}$, F3_34: 36,4 $\mu\text{g/ml}$.

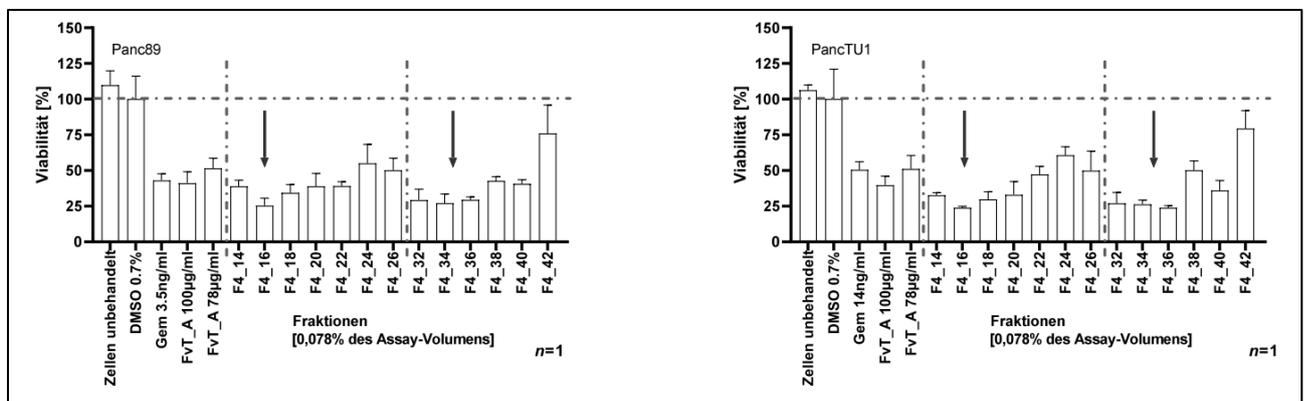


Abbildung A.5: Aktivitäten der Fraktionen der 3. Nachproduktion gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Aktivitäts-Peaks des ursprünglichen Fraktionierungslaufs wurden wieder aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F4_16 und Peak 2 um Fraktion F4_34 (Pfeile). Jede zweite Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in einer 1:9-Verdünnung und mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin ($c \approx IC_{50}$ -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen sowie in der bisher wirksamen Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$). Die eingesetzten Konzentrationen der Peakfraktionen waren: F4_16: 16,5 $\mu\text{g/ml}$, F3_34: 38,0 $\mu\text{g/ml}$.

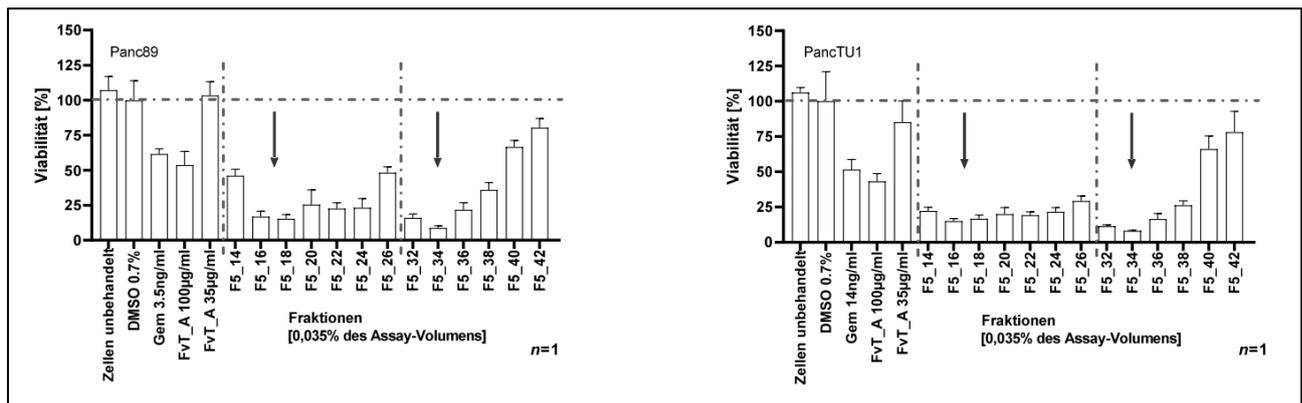


Abbildung A.6: Aktivitäten der Fraktionen der 4. Nachproduktion gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Aktivitäts-Peaks des ursprünglichen Fraktionierungslaufs wurden wieder aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F5_18 und Peak 2 um Fraktion F5_34 (Pfeile). Jede zweite Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in einer 1:20-Verdünnung und mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin ($c \approx IC_{50}$ -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen sowie in der bisher wirksamen Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$). Die eingesetzten Konzentrationen der Peakfraktionen waren: F5_18: 26,6 $\mu\text{g/ml}$, F5_34: 83,6 $\mu\text{g/ml}$.

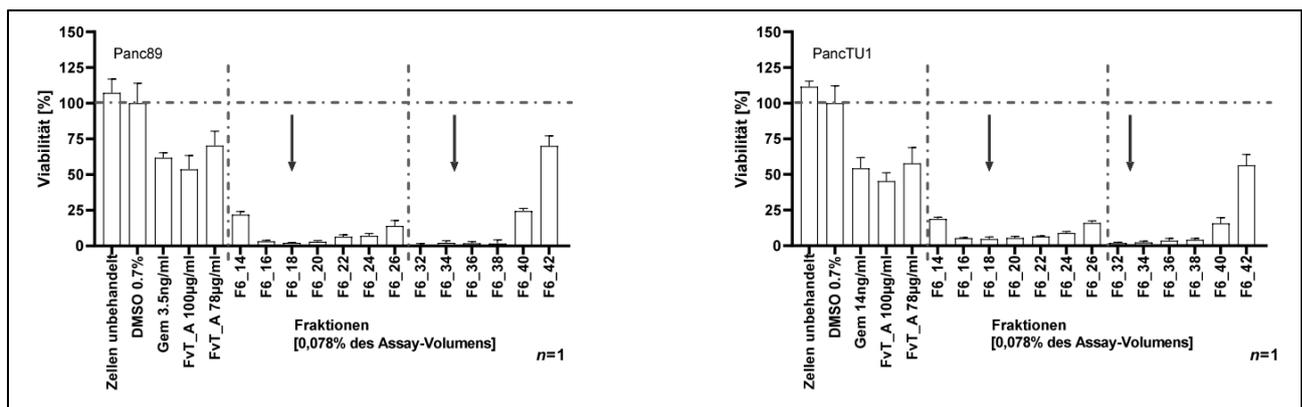


Abbildung A.7: Aktivitäten der Fraktionen der 5. Nachproduktion gegenüber Panc89- und PancTU1-Zellen, ermittelt im Standard-Viabilitäts-Assay. Die Aktivitäts-Peaks des ursprünglichen Fraktionierungslaufs wurden wieder aufgefunden: Peak 1 um Fraktion F6_18 und Peak 2 um Fraktion F6_34 (Pfeile). Jede zweite Fraktion wurde mit jeweils gleichem Volumen, in einer 1:9-Verdünnung und mit demselben finalen Volumen von 0,7 % DMSO im Assay getestet. Gemcitabin ($c \approx IC_{50}$ -Wert) und FvT_A (in gleicher Verdünnung wie die Fraktionen sowie in der bisher wirksamen Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle DMSO 0,7 % und als Mittelwerte \pm SD von fünf technischen Replikaten ($n = 1$). Die eingesetzten Konzentrationen der Peakfraktionen waren: F6_18: 49,8 $\mu\text{g/ml}$, F6_34: 84,0 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle A.3: Fraktionen der Aktivitäts-Peaks der reproduzierten Fraktionierungsläufe 2 - 6 und Auflistung der Bestandteile der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion).

Aktivitäts-Peak 1				Aktivitäts-Peak 2	
Zuordnung zur Fraktion des ursprünglichen Fraktionierungslaufs (hochgestellt ist die Angabe des neuen Fraktionierungslaufs)	Fraktionsnummer (\triangleq Elutionszeit, 9 s je Fraktion) im nachproduzierten Fraktionierungslauf	gepoolte Fraktion F15/F16 (Reproduktion) bestehend aus je 210 μ l der angegebenen Fraktionen	c [mg/ml] nach einheitlichem Lösen in je 250 μ l DMSO D6	Zuordnung zur Fraktion des ursprünglichen Fraktionierungslaufs (hochgestellt ist die Angabe des neuen Fraktionierungslaufs)	Fraktionsnummer (\triangleq Elutionszeit) im nachproduzierten Fraktionierungslauf
F15 ²	F2_20			F36 ²	F2_34
F16 ²	F2_21			F37 ²	F2_35
F15 ³	F3_17	F3_17	18,4	F36 ³	F3_34
F16 ³	F3_18	F3_18	18	F37 ³	F3_35
		F3_19	18		
F15 ⁴	F4_16	F4_16	21,2	F36 ⁴	F4_34
F16 ⁴	F4_17	F4_17	20	F37 ⁴	F4_35
		F4_18	21,2		
F15 ⁵	F5_17	F5_17	68,4	F36 ⁵	F5_34
F16 ⁵	F5_18	F5_18	76	F37 ⁵	F5_35
		F5_19	74		
F15 ⁶	F6_17	F6_17	61,6	F36 ⁶	F6_34
F16 ⁶	F6_18	F6_18	64	F37 ⁶	F6_35
		F6_19	51,2		
			MW		
			42,667		

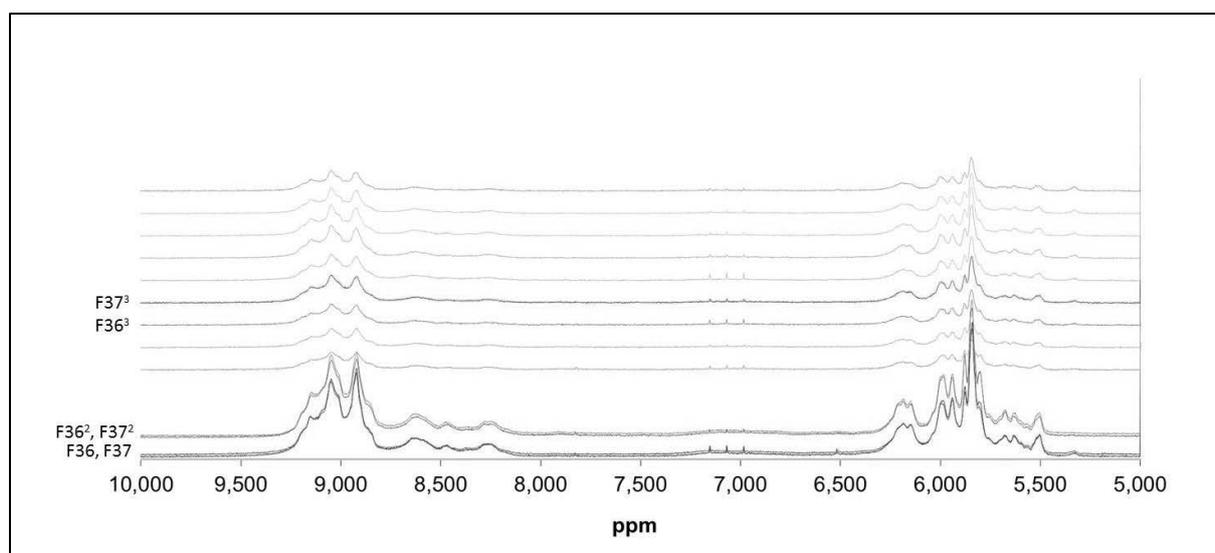


Abbildung A.8: Ausschnitt der ¹H-NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F36, F37 und ihrer Replikate F36², F37² und F36³, F37³ sowie deren benachbarter Fraktionen.

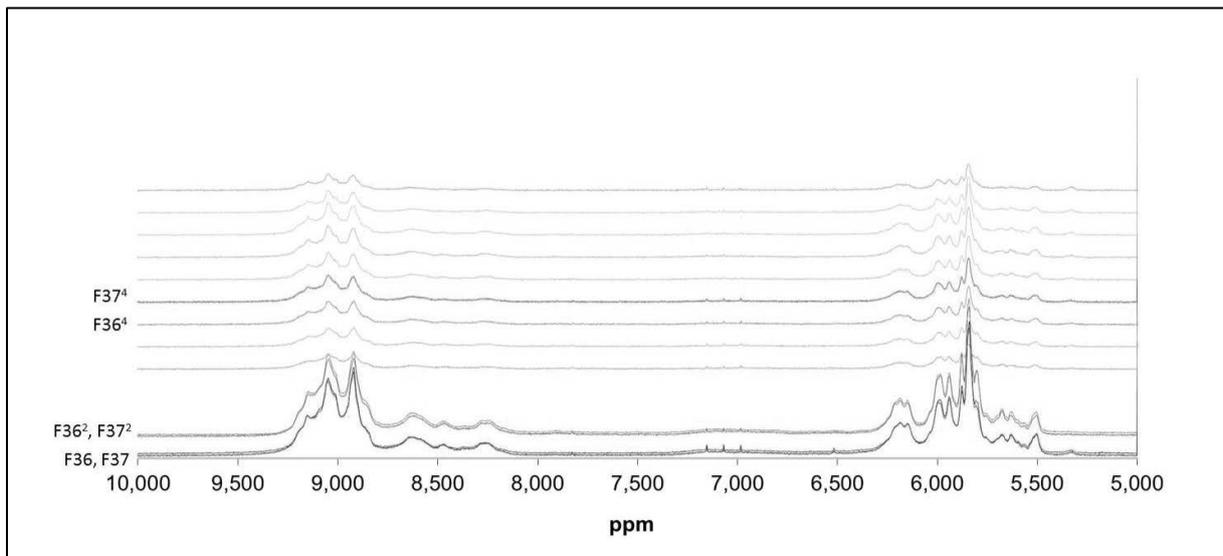


Abbildung A.9: Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F36, F37 und ihrer Replikate F36², F37² und F36⁴, F37⁴ sowie deren benachbarter Fraktionen.

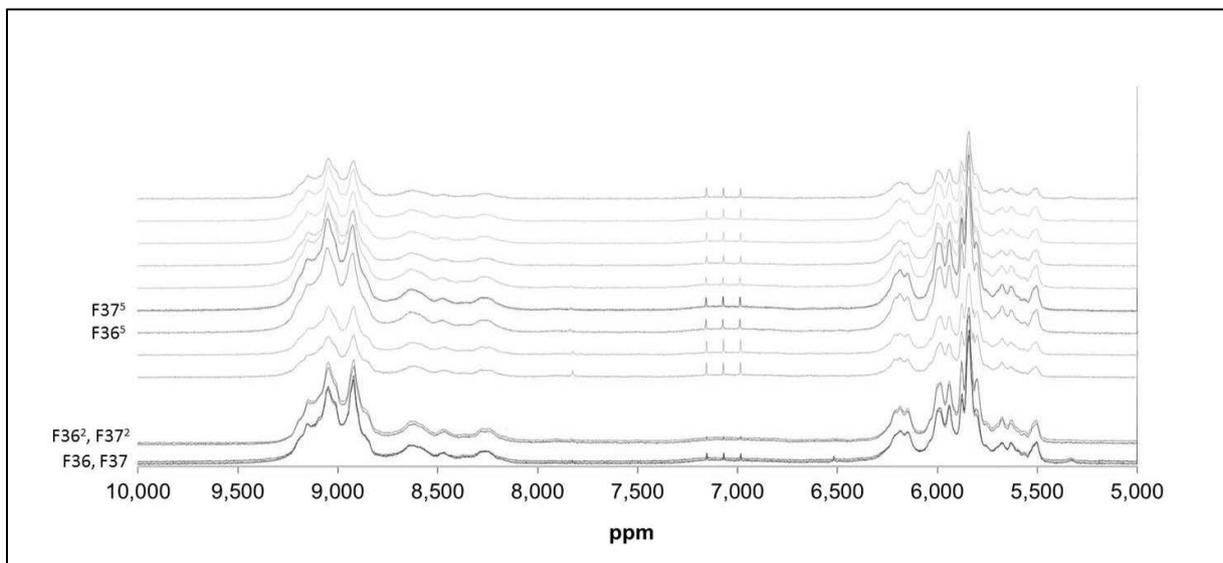


Abbildung A.10: Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F36, F37 und ihrer Replikate F36², F37² und F36⁵, F37⁵ sowie deren benachbarter Fraktionen.

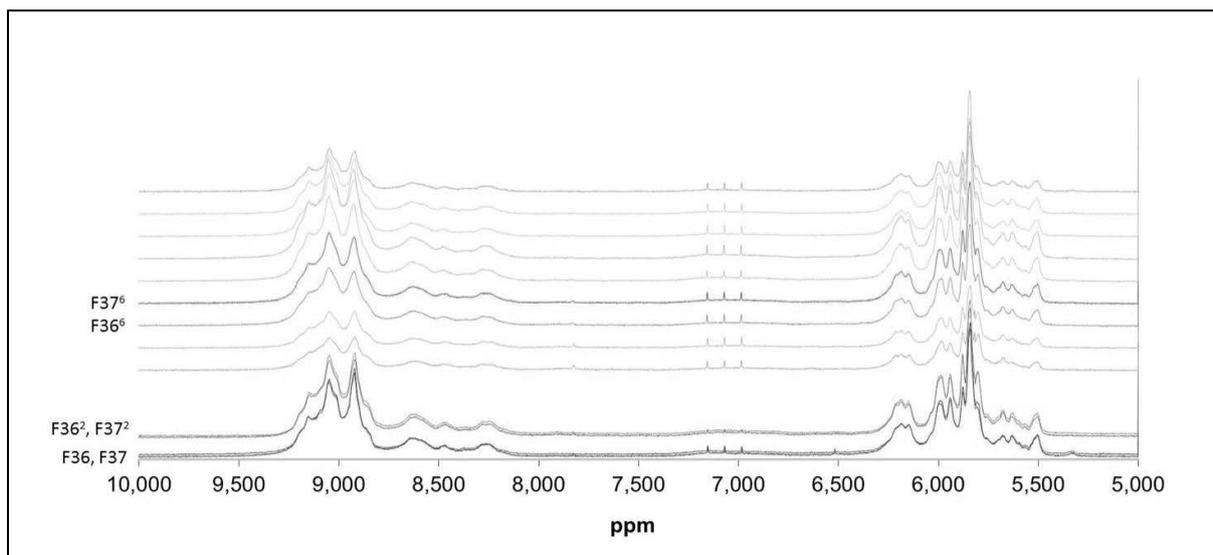


Abbildung A.11: Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F36, F37 und ihrer Replikate F36², F37² und F36⁶, F37⁶ sowie deren benachbarter Fraktionen.

A.5 Gehalt an Endotoxinen in F15/F16

Biologisches Mess- und Analyzelabor GbR



Laborbericht

Auftraggeber:	CRM, Tiessenkai 12, 24159 Kiel-Holtenau		
Ihr Auftragsdatum:	03.04.2013	Probeneingang/-nahme	05.04.2013
Ihre Auftragsnr.:		Analysedatum:	10.04.2013
BMA-Auftragsnr.:	AU130403-07	Berichtsdatum:	10.04.2013
BMA-Probenr.:	130405-06/1-2	Berichtsnr.:	BE130403-07/1
Berichtserstellung:	S. Wollenberg		Seite 1 von 2

Prüfgegenstand / Prüfmaterial

KF1 1:213,35 verdünnt in Aqua dest. steril, DMSO-Gehalt: 0,47%, Endkonz. Extrakt nun: 200 µg/ml, Menge: 5 ml
KF1 1:426,7 verdünnt in Aqua dest. steril, DMSO-Gehalt: 0,23%, Endkonz. Extrakt nun: 100 µg/ml, Menge: 5 ml
 (Die Probe(n) wurde(n) vom Auftraggeber zugeschickt)

Untersuchung

Quantitative Bestimmung bakterieller Endotoxine

1. Prüfverfahren

Bestimmung der Endotoxinkonzentration

Messung der Endotoxinkonzentration: Die Proben wurden mittels des chromogen-kinetischen Limulustests (LAL) analysiert. Zur Kontrolle wurde jede Probe unter Zugabe einer definierten Menge Standardendotoxin (Interferenzprobe (PPC) – Spike) gemessen.

Der verwendete Endotoxin-Test ist nach Methode D, Ph. Eur. 2.6.14, Supplement 2001, zugelassen.

Dieser Bericht darf nur komplett vervielfältigt werden. Auszugsweise Vervielfältigungen bedürfen der schriftlichen Genehmigung der BMA-Labor GbR.



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-PL-18029-01-00

Anschrift:
BMA-Labor GbR
Technologiezentrum Ruhr
Universitätsstraße 142
D-44799 Bochum

Kommunikation:
Tel.: 0234 / 978 30 - 0
Fax: 0234 / 978 30 - 29
Mail: info@bma-labor.de
http://www.bma-labor.de

Gesellschafter:
Dr. rer. nat. Ute Stephan
Dr. rer. nat. Klaus Klus
USt-IdNr.: DE202600482

Postbank Frankfurt
BLZ 500 100 60
Kto.-Nr.: 117 640 607
IBAN: DE76500100600117640607
SWIFT/BIC: PBNKDEFF

Auftragsnr.: AU130403-07

Berichtsnr.: BE130403-07/1

CRM

Seite 2 von 2

2. Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse der Messungen und Analysen beziehen sich ausschließlich auf die untersuchte(n) Probe(n).

Probe / Probenidentifikation	Spike-Recovery ¹⁾ [%]	Spez. Nachweisgrenze [EU/ml]	Endotoxin-Konzentration [EU / ml]
KF1 1:213,35 verdünnt in Aqua dest. steril 130405-06/1	141	0,005	0,11
KF1 1:426,7 verdünnt in Aqua dest. steril 130405-06/2	89	0,005	0,006

Nachweisgrenze: 0,005 EU / ml, Interferenzprobe (Spike): 5 EU / ml, Korrelationskoeffizient der Standardkurve: $\geq 0,990$

¹⁾ Die Gültigkeit eines Probenmesswertes wird anhand der Wiederfindungsrate (Spike-Recovery) in der entsprechenden Interferenzprobe (PPC) beurteilt. Der Messwert ist gültig, wenn die Wiederfindungsrate 50 bis 200 % beträgt.

Dr. Ute Stephan
Technische Leitung

Stephanie Wollenberg (geb. Putz)
Analytik und Labororganisation

A.6 Gehalt an Schwermetallen in F15/F16 und im Rohextrakt FvT_A



UCL Umwelt Control Labor GmbH · Köpenicker Str. 59 · 24111 Kiel

CRM Coatal Research and Management
- Frau Marion Zenthoefler -
Tiessenkai 12
24159 Kiel-Holtenau

Ansprechpartner: Kai Windeler
Telefon: 04316964110
Telefax: 0431698787
E-Mail: kai.windeler@ucl-labor.de

Prüfbericht - Nr.: 13-13099-001/1

Prüfgegenstand: Flüssigkeit
Auftraggeber / KD-Nr.: CRM Coatal Research and Management, Tiessenkai 12, 24159 Kiel-Holtenau / 56236
Projektbezeichnung: Schwermetalluntersuchung an Algenextrakt
Probenahme am / durch: - / Auftraggeber
Probeneingang am / durch: 05.04.2013 / Paketdienst
Prüfzeitraum: 05.04.2013 - 22.04.2013

Parameter	Probenbezeichnung		Algenextrakt KF1	Methode
	Probe-Nr.	Einheit		
			13-13099-001	
Analyse der Originalprobe				
Phosphor gesamt	mg/l	< 0,01		DIN EN ISO 11885;KI
Schwefel gesamt	mg/l	875		DIN EN ISO 11885;KI
Aluminium	µg/l	13,3		DIN EN ISO 11885;KI
Antimon	µg/l	< 3		DIN EN ISO 11885;KI
Arsen	µg/l	< 5		DIN EN ISO 11885;KI
Barium	µg/l	9,71		DIN EN ISO 11885;KI
Beryllium	µg/l	< 5		DIN EN ISO 11885;KI
Blei	µg/l	< 5		DIN EN ISO 11885;KI
Bor	µg/l	21,6		DIN EN ISO 11885;KI
Cadmium	µg/l	< 0,4		DIN EN ISO 11885;KI
Calcium	mg/l	0,0797		DIN EN ISO 11885;KI
Chrom gesamt	µg/l	< 1		DIN EN ISO 11885;KI
Eisen	µg/l	< 10		DIN EN ISO 11885;KI
Kalium	mg/l	< 0,05		DIN EN ISO 11885;KI
Cobalt	µg/l	< 5		DIN EN ISO 11885;KI
Kupfer	µg/l	9,93		DIN EN ISO 11885;KI
Magnesium	mg/l	< 0,1		DIN EN ISO 11885;KI
Mangan	µg/l	< 10		DIN EN ISO 11885;KI
Molybdän	µg/l	< 5		DIN EN ISO 11885;KI
Natrium	mg/l	< 0,1		DIN EN ISO 11885;KI
Nickel	µg/l	2,19		DIN EN ISO 11885;KI
Quecksilber	µg/l	< 0,1		DIN EN 1483;KI
Selen	µg/l	< 5		DIN EN ISO 11885;KI
Silber	µg/l	< 1		DIN EN ISO 11885;KI

20130422-6605064

UCL Umwelt Control Labor GmbH · Josef-Rethmann-Str. 5 · 44536 Lünen · Telefon: 0 23 06 / 24 09-0 · Telefax: 0 23 06 / 24 09-10 · E-Mail: info@ucl-labor.de
St.-Nr.: 316/5957/0038 · USt-ID-Nr.: DE 811145308 · Commerzbank Münster · BLZ 400 400 28 · Konto 4000154 · HRB 17247 · Amtsgericht Dortmund
Geschäftsführer: Jürgen Cornelissen, Oliver Koenen, Martin Langkamp



Durch die DAkkS nach DIN EN ISO/IEC 17025 akkreditiertes Prüflaboratorium mit der Erfüllung der Anforderungen der Verwaltungsvereinbarung BAM / OFD Hannover. Die Akkreditierung gilt für die in der Urkunde aufgeführten Prüfverfahren.
Die Veröffentlichung und Vervielfältigung unserer Prüfberichte sowie deren Verwendung zu Werbezwecken bedürfen- auch auszugsweise - unserer schriftlichen Genehmigung.



Seite 2 von 2 zum Prüfbericht Nr. 13-13099-001/1

20130422-6605064

Parameter	Probenbezeichnung	Algenextrakt KF1	Methode
	Probe-Nr. Einheit	13-13099-001	
Silicium	µg/l	42,5	DIN EN ISO 11885;KI
Strontium	µg/l	< 3	DIN EN ISO 11885;KI
Tellur	µg/l	< 10	DIN EN ISO 11885;KI
Thallium	µg/l	< 1	DIN EN ISO 11885;KI
Vanadium	µg/l	< 5	DIN EN ISO 11885;KI
Zink	µg/l	13,8	DIN EN ISO 11885;KI
Zinn	µg/l	< 5	DIN EN ISO 11885;KI

n.n. = Kleiner Bestimmungsgrenze n.b. = nicht bestimmbar * = nicht akkreditiert FV = Fremdvergabe UA=Unterauftragvergabe += durchgeführt
 Standortkennung (Der Norm nachgestellte Buchstabenkombination): H=Hannover, KI=Kiel, L=Lünen

Kiel, den 23.04.2013

Dipl.-Ing. Kai Windeler (Kundenbetreuer)



UCL Umwelt Control Labor GmbH · Köpenicker Str. 59 · 24111 Kiel

CRM Coatal Research and Management
- Frau Marion Zenthoefer -
Tiessenkai 12
24159 Kiel-Holtenau

Ansprechpartner: Kai Windeler
Telefon: 04316964110
Telefax: 0431698787
E-Mail: kai.windeler@ucl-labor.de

Prüfbericht - Nr.: 13-10427-001/1

Prüfgegenstand: Flüssigkeit
Auftraggeber / KD-Nr.: CRM Coatal Research and Management, Tiessenkai 12, 24159 Kiel-Holtenau / 56236
Auftrags-Nr. / Datum: -/18.03.2013
Projektbezeichnung: Schwermetalluntersuchung an Algenextrakt
Probenahme am / durch: - / Auftraggeber
Probeneingang am / durch: 18.03.2013 / Kurier GO!
Prüfzeitraum: 18.03.2013 - 25.03.2013

Parameter	Probenbezeichnung		Algenextrakt	Methode
	Probe-Nr.	Einheit		
			13-10427-001	
Analyse der Originalprobe				
Phosphor gesamt	mg/l		0,0708	DIN EN ISO 11885,KI
Schwefel gesamt	mg/l		1980	DIN EN ISO 11885,KI
Aluminium	µg/l		< 1	DIN EN ISO 11885,KI
Antimon	µg/l		< 3	DIN EN ISO 11885,KI
Arsen	µg/l		17,5	DIN EN ISO 11885,KI
Barium	µg/l		1,24	DIN EN ISO 11885,KI
Beryllium	µg/l		< 5	DIN EN ISO 11885,KI
Blei	µg/l		< 5	DIN EN ISO 11885,KI
Bor	µg/l		169	DIN EN ISO 11885,KI
Cadmium	µg/l		< 0,4	DIN EN ISO 11885,KI
Calcium	mg/l		0,156	DIN EN ISO 11885,KI
Chrom gesamt	µg/l		< 1	DIN EN ISO 11885,KI
Eisen	µg/l		11600	DIN EN ISO 11885,KI
Kalium	mg/l		5,70	DIN EN ISO 11885,KI
Cobalt	µg/l		< 5	DIN EN ISO 11885,KI
Kupfer	µg/l		< 3	DIN EN ISO 11885,KI
Magnesium	mg/l		0,854	DIN EN ISO 11885,KI
Mangan	µg/l		10,1	DIN EN ISO 11885,KI
Molybdän	µg/l		< 5	DIN EN ISO 11885,KI
Natrium	mg/l		11,5	DIN EN ISO 11885,KI
Nickel	µg/l		< 1	DIN EN ISO 11885,KI
Quecksilber	µg/l		< 0,1	DIN EN 1483,KI
Selen	µg/l		5,02	DIN EN ISO 11885,KI

20130325-6491402

UCL Umwelt Control Labor GmbH · Josef-Rethmann-Str. 5 · 44536 Lünen · Telefon: 0 23 06 / 24 09-0 · Telefax: 0 23 06 / 24 09-10 · E-Mail: info@ucl-labor.de
St.-Nr.: 316/5957/0038 · USt-ID-Nr.: DE 811145308 · Commerzbank Münster · BLZ 400 400 28 · Konto 4000154 · HRB 17247 · Amtsgericht Dortmund
Geschäftsführer: Jürgen Cornelissen, Oliver Koenen, Martin Langkamp

Durch die DAKS nach DIN EN ISO/IEC 17025 akkreditiertes Prüflaboratorium mit der Erfüllung der Anforderungen der Verwaltungsvereinbarung BAM / OFD Hannover. Die Akkreditierung gilt für die in der Urkunde aufgeführten Prüfverfahren.
Die Veröffentlichung und Vervielfältigung unserer Prüfberichte sowie deren Verwendung zu Werbezwecken bedürfen- auch auszugsweise - unserer schriftlichen Genehmigung.





Seite 2 von 2 zum Prüfbericht Nr. 13-10427-001/1

20130325-6491402

Parameter	Probenbezeichnung		Algenextrakt	Methode
	Probe-Nr.	Einheit		
			13-10427-001	
Silber		µg/l	< 1	DIN EN ISO 11885;KI
Silicium		µg/l	569	DIN EN ISO 11885;KI
Strontium		µg/l	< 3	DIN EN ISO 11885;KI
Tellur		µg/l	< 10	DIN EN ISO 11885;KI
Thallium		µg/l	< 1	DIN EN ISO 11885;KI
Vanadium		µg/l	< 5	DIN EN ISO 11885;KI
Zink		µg/l	18,2	DIN EN ISO 11885;KI
Zinn		µg/l	< 5	DIN EN ISO 11885;KI

n.n. = kleiner Bestimmungsgrenze n.b. = nicht bestimmbar * = nicht akkreditiert FV = Fremdvergabe UA=Unterauftragvergabe += durchgeführt
 Standortkennung (Der Norm nachgestellte Buchstabenkombination): H=Hannover, KI=Kiel, L=Lüben

Kiel, den 25.03.2013

Dipl.-Chem. Dr. Lars Eckholtz (Projektleiter)

A.7 Experimente zur Strukturaufklärung

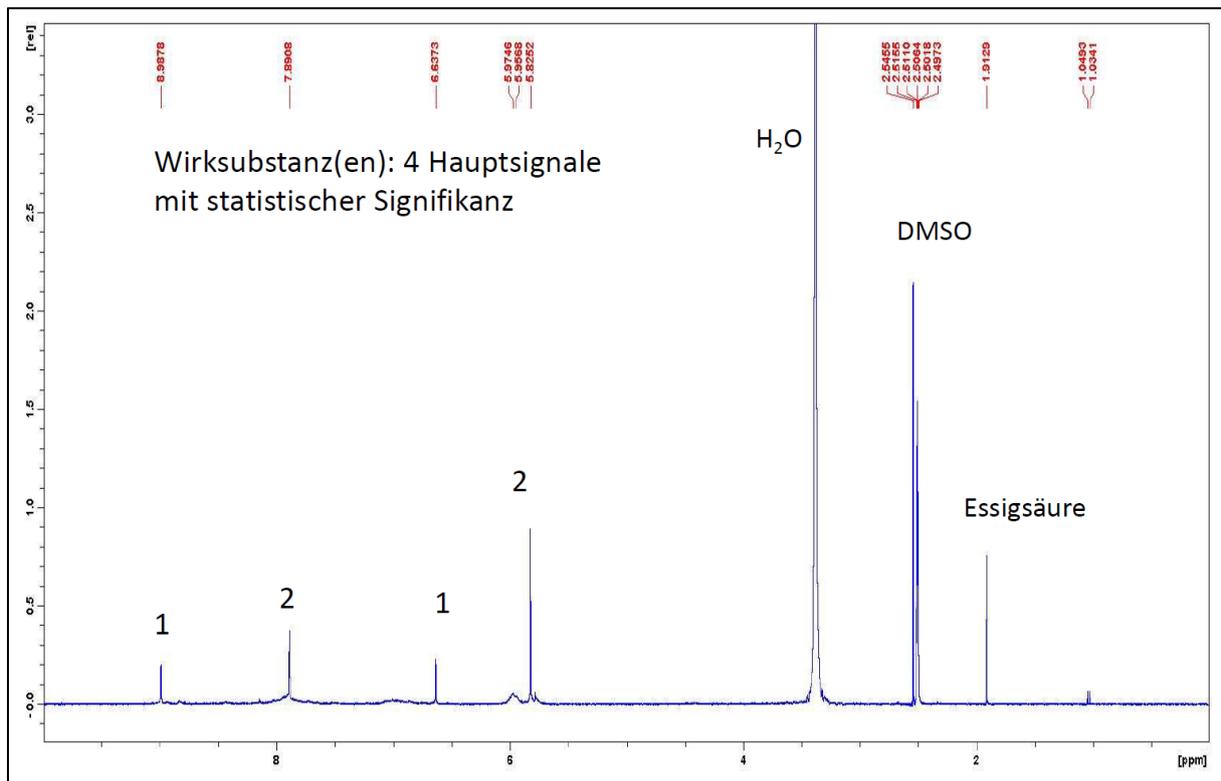


Abbildung A.12: ¹H-NMR-Spektren (gemessen in DMSO D6) der Fraktionen F15 und F16. Die Spektren zeigen neben den Lösungsmittelsignalen vier scharfe Signale (δ_{H}) im Bereich aromatischer Verschiebung, die statistisch signifikant auftreten und signifikant mit der Viabilitäts-inhibierenden Aktivität der Fraktionen korrelieren: 1) 8,99 ppm (s), 2) 7,89 ppm (s), 3) 6,64 ppm (s), 4) 5,83 ppm (s). Im Bereich von 5,5 - 9,0 ppm sind weitere breite Signale vorhanden, die aber aufgrund der niedrigen Intensität als Verunreinigung angesehen werden.

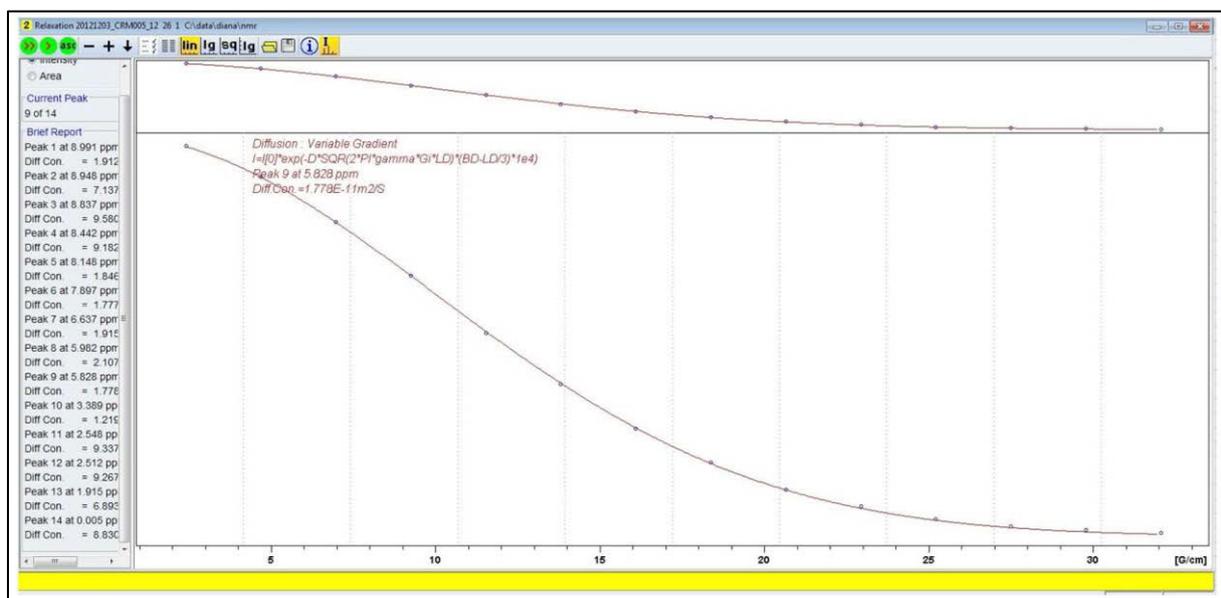


Abbildung A.13: Diffusionskurve der DOSY-NMR, hier beispielhaft dargestellt für den Peak δ_{H} 5,83 ppm der Fraktion F15/F16.

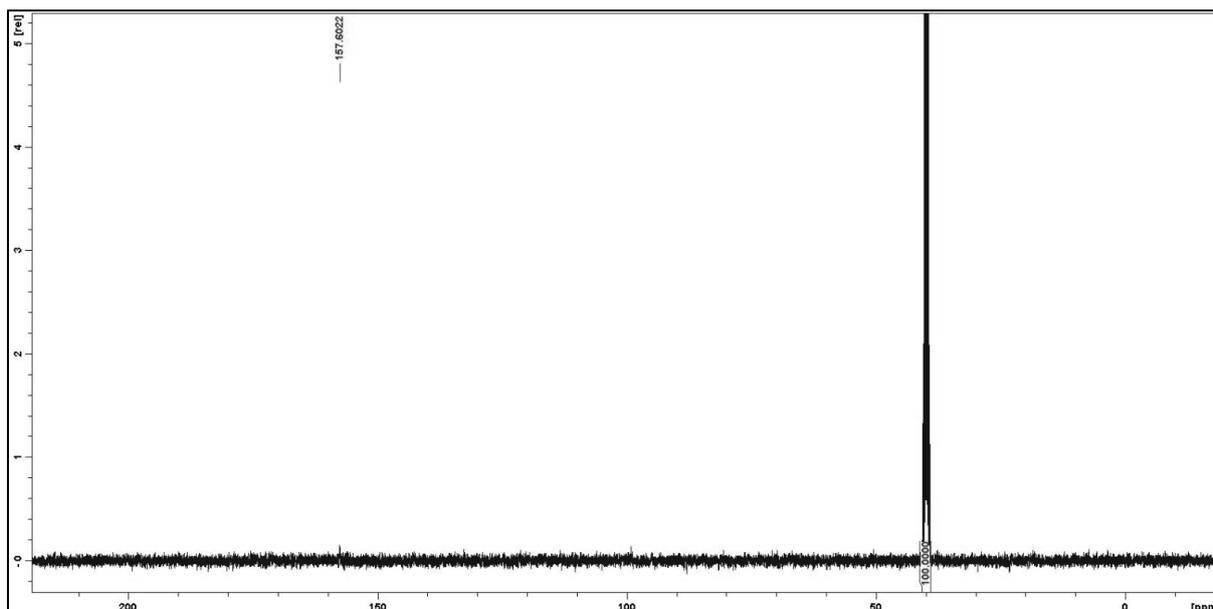


Abbildung A.14: ^{13}C -NMR-Spektrum von F15/F16 (gemessen in DMSO D6). Das Spektrum zeigt neben dem Lösungsmittelpeak bei 39,52 ppm (DMSO) keine weiteren Signale. Dieses Ergebnis deutet auf ein ausschließliches Vorhandensein von quartären C-Atomen, welche die geringste Empfindlichkeit haben.

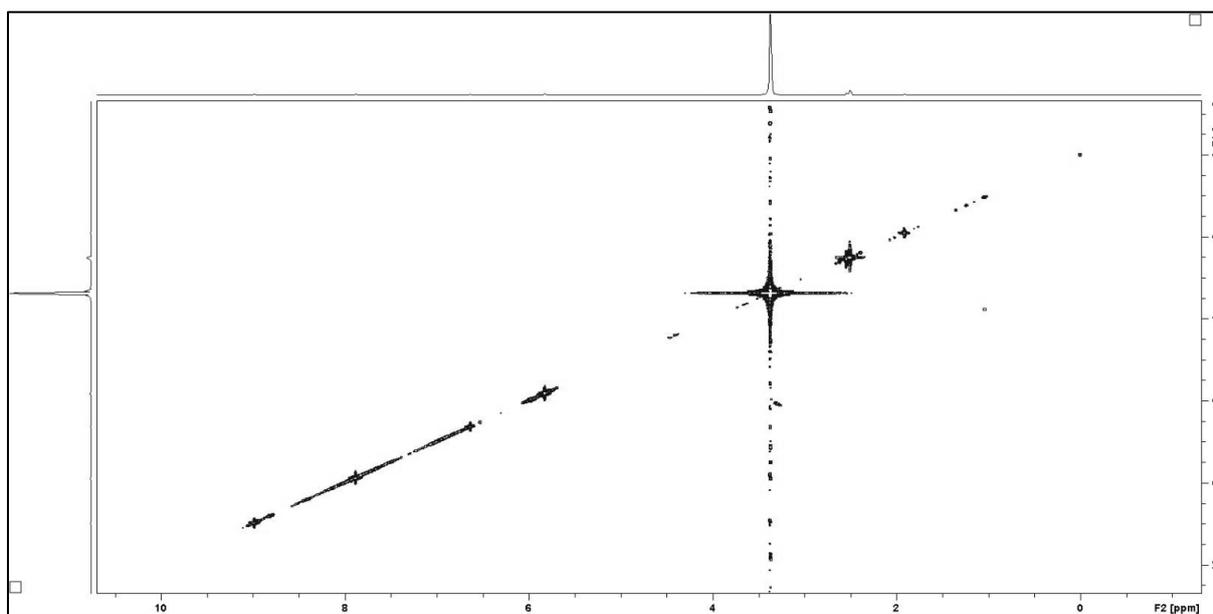


Abbildung A.15: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von F15/F16. Das Spektrum zeigt keine signifikanten Kreuzsignale zwischen den ^1H -Signalen im Bereich von 5,83 - 8,99 ppm.

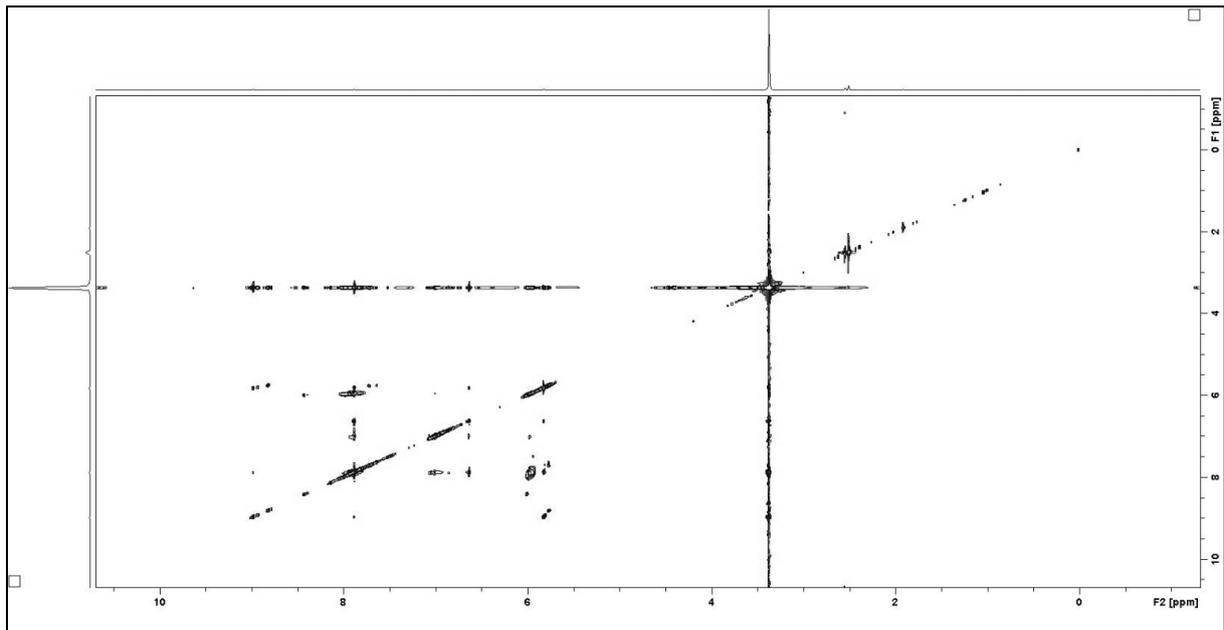


Abbildung A.16: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von F15/F16. Die vier Hauptsignale im Bereich von 5,83 - 8,99 ppm zeigen jeweils Kreuzsignale zueinander.

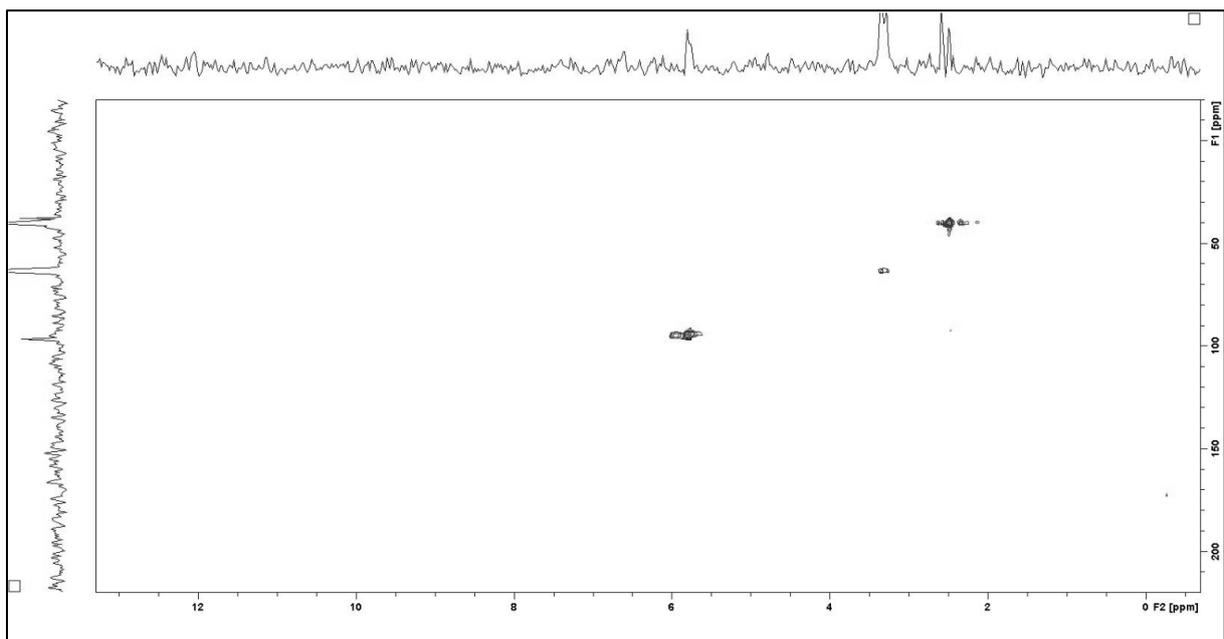


Abbildung A.17: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von F15/F16. Das Spektrum zeigt keine signifikanten Kreuzsignale im Bereich von > 5,83 - 8,99 ppm. Dies deutet auf Abwesenheit von direkt an C gebundene Protonen hin.

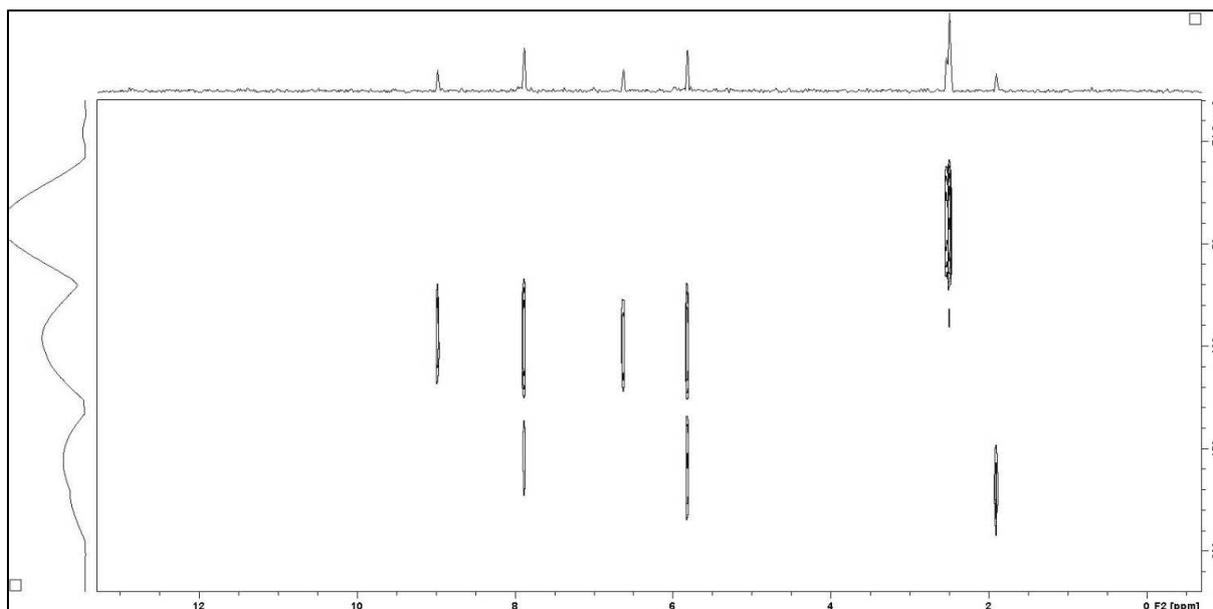


Abbildung A.18: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von F15/F16. Das Spektrum zeigt Kreuzsignale im Bereich von 5,83 bis 8,99 ppm: 5,83; 7,89; 8,99 ppm zeigen Kreuzsignale zu 94,1 ppm (I-substituiertes C-Atom, kein F, Cl, Br, kein phenolisches C-Atom), 5,83; 6,64; 7,89 ppm zeigen Kreuzsignale zu 98,6 ppm (I-substituiertes C-Atom, kein F, Cl, Br, kein phenolisches C-Atom), 5,83 ppm zeigt Kreuzsignal zu 157,6 ppm (phenolisches C-Atom, kein zum Halogen benachbartes C-Atom), 6,64 ppm zeigt Kreuzsignal zu 155,2 ppm (phenolisches C-Atom, kein zum Halogen benachbartes C-Atom), 7,89 ppm zeigt Kreuzsignal zu 157,1 ppm (phenolisches C-Atom, kein zum Halogen benachbartes C-Atom), 8,99 ppm zeigt Kreuzsignal zu 158,0 ppm (phenolisches C-Atom, kein zum Halogen benachbartes C-Atom).

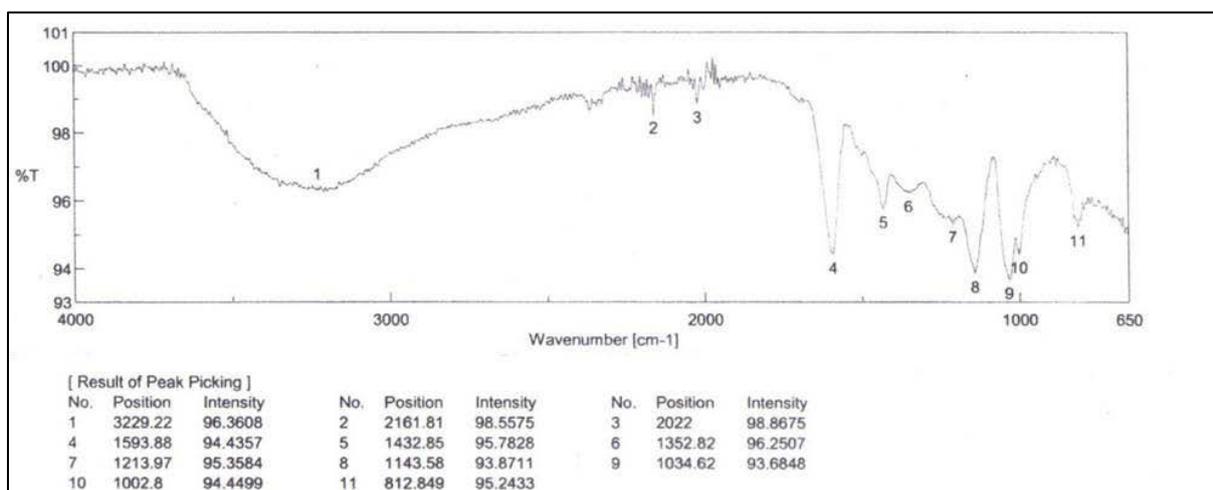


Abbildung A.19: IR-Spektrum von F16.

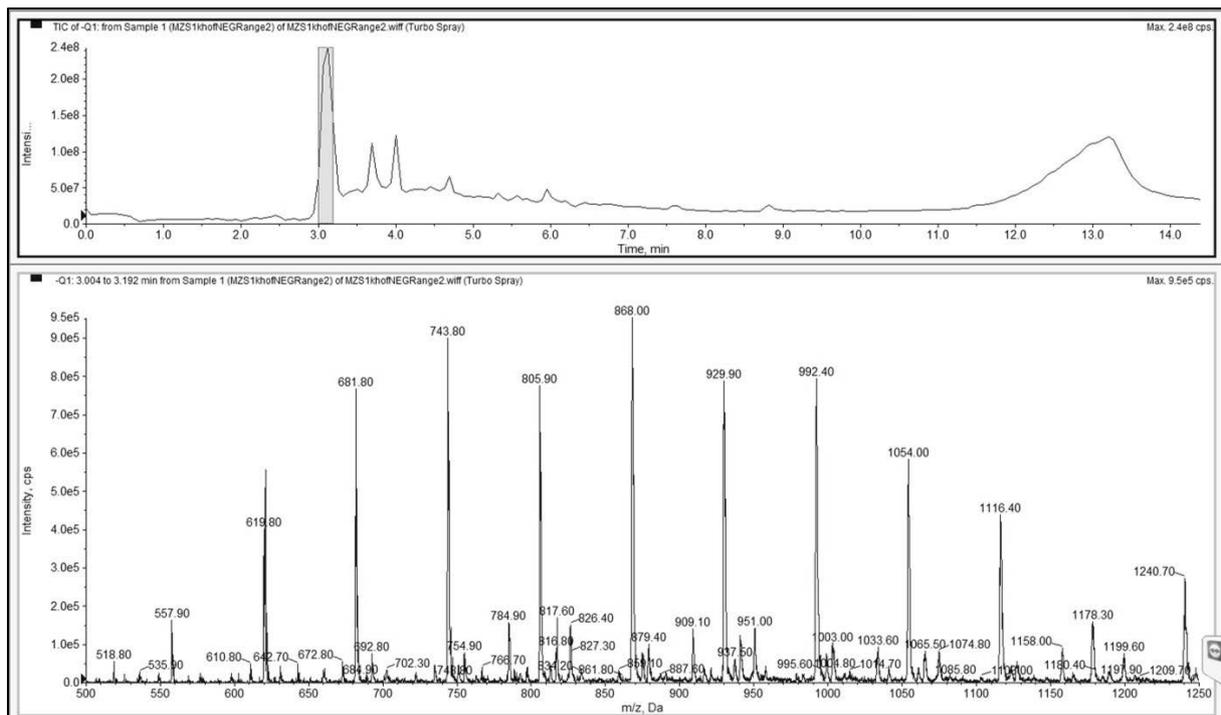


Abbildung A.20: Hochaufgelöstes UV-Spektrum der gepoolten Fraktion F15/F16 (Reproduktion) und zugehöriges Massenspektrum des ausgewählten Peaks bei RT 3,1 min als repräsentatives Beispiel weiterführender Experimente, um ein aussagekräftiges Massenspektrum für die aktiven Substanzen zu erhalten. Es wurden zahlreiche Hauptsignale erhalten, die sich jeweils in m/z 62 unterschieden. Die hohe Zahl an Hintergrundsignalen gestaltete die Auswertung und Dateninterpretation weiterhin schwierig. Methode: Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) gefolgt von einer Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde auf einem QTRAP 5500 System von AB SCIEX durchgeführt. Für die LC wurde eine NUCLEODUR Sphinx RP-Säule (250 mm * 2 mm, 3 μ m) von MN eingesetzt und folgender Gradient bei einer Flussrate von 0,3 ml/min bei 40 °C angewendet: I = 0 % B bis 100 % B in 10,6 min, isokrat für 2 min; II = 100 % B bis 0 % B in 0 min, isokrat für 2,5 min, unter Einsatz der Lösungsmittel (A) H₂O (Aqua bidest.) + 1 % Methanol (MeOH, Roth) + 0,1 % Ameisensäure (HCOOH, Roth) + 10 mM Ammoniumformiat (HCOONH₄, Roth) und (B) MeOH + 0,1 % HCOOH + 10 mM HCOONH₄. Es wurden Massenspektren im Modus der negativen Ionisation von $m/z = 100 - 500$ und $m/z = 500 - 1250$ aufgenommen, unter Anwendung des Messmodus Q1 (survey scan). Die Elektrospray-Ionisation wurde bei 5500 V und 150 °C durchgeführt (N₂-Fluss = 10 l/min, declustering potential (DP) = 90 V, entrance potential (EP) = 10 V). Die Messung wurde freundlicherweise von Dr. Karsten Hofmann von der Planton GmbH, Kiel, durchgeführt und die Ergebnisse wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

A.8 RP-Chromatographie

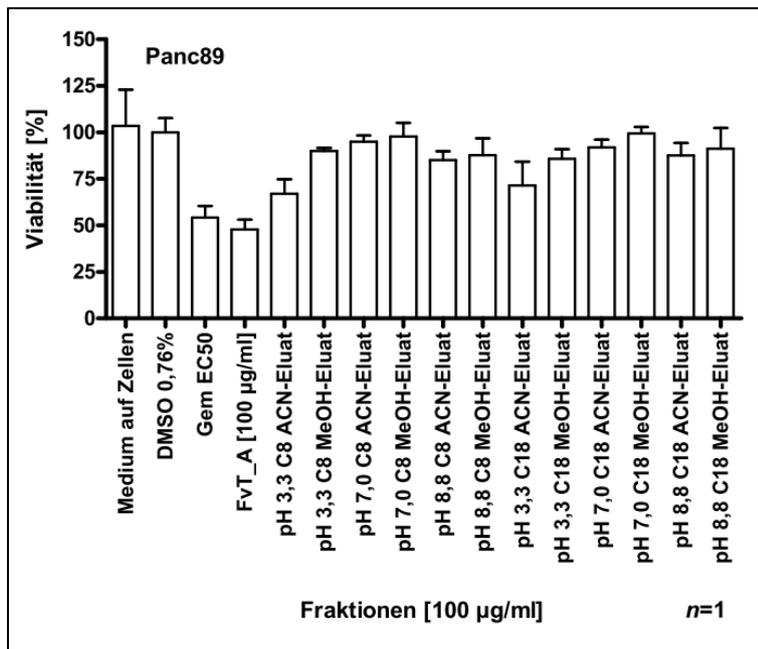


Abbildung A.21: Aktivitäten der durch RP-Grobfraktionierung bei verschiedenen pH-Werten an C8- bzw. C18-Silica-Sorbentien und Elution mit ACN bzw. MeOH erhaltenen Fraktionen gegenüber Panc89-Zellen im Vergleich zum Rohextrakt FvT_A. Die Fraktionen und der Rohextrakt wurden einheitlich mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im XTT-Viabilitäts-Assay getestet. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (hier: 0,76 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD fünf technischer Replikate ($n=1$).

Zur Fraktionierung wurden $3 \times 2 \text{ ml}$ FvT_A in einem Na_2HPO_4 -Puffersystem (50 mM) 1:10 verdünnt und auf die pH-Werte 3,3; 7,0 und 8,5 eingestellt. Nach einer Verweildauer von 1h bei RT zur Finalisierung der erfahrungsgemäß auftretenden Fällung wurden die Überstände vorsichtig abgenommen, in 2 ml-Eppendorf-Caps überführt und zur Feinabtrennung des Präzipitats in einer Eppendorf Minifuge 15 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen, die Präzipitate wurden verworfen. Die Überstände wurden jeweils zu gleichen Volumina in je zwei 15 ml-Röhrchen überführt. Je Zentrifugenröhrchen wurden 0,5 g C8-Polygoprep- bzw. C18-Polygoprep-Material (MN, siehe Tabelle 2.2) hinzugefügt. Die Batch-Ansätze wurden 30 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Überstände abgesaugt, und es wurde mit dem jeweiligen Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Substanzen erfolgte mit $2 \times 5 \text{ ml}$ ACN gefolgt von $1 \times 5 \text{ ml}$ MeOH. Die Fraktionen wurden im Rotations-Vakuumkonzentrator getrocknet und in $250 \mu\text{l}$ DMSO D6 gelöst.

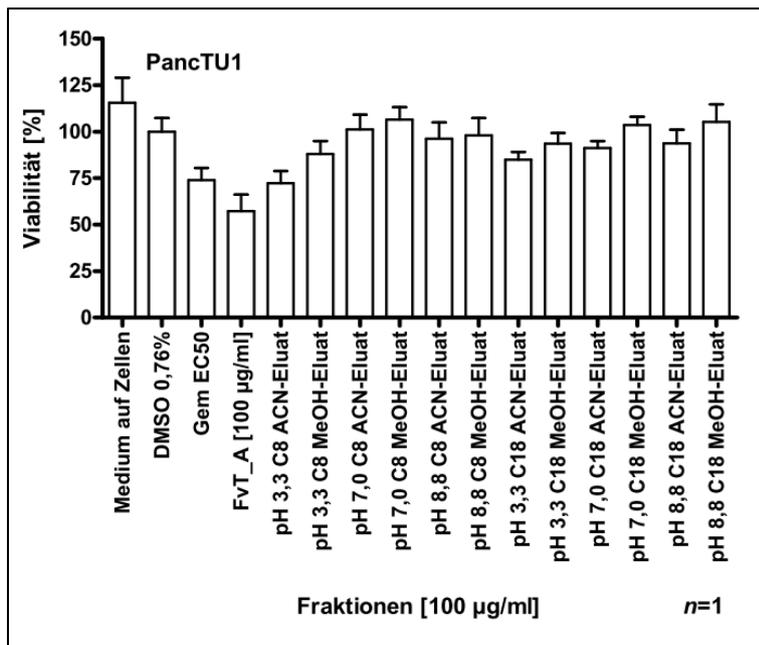


Abbildung A.22: Aktivitäten der durch RP-Grobfractionierung bei verschiedenen pH-Werten an C8- bzw. C18-Silica-Sorbentien und Elution mit ACN bzw. MeOH erhaltenen Fraktionen gegenüber Panc89-Zellen im Vergleich zum Rohextrakt FvT_A. Die Fraktionen und der Rohextrakt wurden einheitlich mit $c = 100 \mu\text{g/ml}$ im XTT-Viabilitäts-Assay getestet. Die Werte sind angegeben in % relativ zur Negativkontrolle (hier: 0,76 % DMSO) und als Mittelwerte \pm SD fünf technischer Replikate ($n=1$).