

**Glutaminylzyklase (QC)-inhibierende Verbindungen aus  
Mikroalgen – neue Leitstrukturen für den Einsatz in der  
Therapie der Alzheimer Erkrankung**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl. Ing. (FH) Stephanie Hielscher-Michael

geb. am 21.06.1978 in Wippra

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2013 in der Arbeitsgruppe Biochemie/ Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt in Köthen (Frau Prof. Dr. Carola Griehl), im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie (Herr Prof. Dr. Ludger Wessjohann) und der Probiodrug AG (Herr Prof. Hans-Ulrich Demuth jetzt Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI, Außenstelle Halle für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung) im Rahmen eines kooperativen Promotionsverfahrens mit der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg (Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch, Arbeitsgruppe Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Institut für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I).

Die Algenkultivierungen wurden im Algenbiotechnikum der Hochschule Anhalt in Köthen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Carola Griehl durchgeführt. Die Arbeiten zur Identifizierung, Charakterisierung sowie Isolierung der QC-inhibierenden Verbindungen erfolgten am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann. Die Testungen im QC-Assay wurden in der Probiodrug AG unter Betreuung von Herrn Prof. Hans-Ulrich Demuth jetzt Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI durchgeführt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Naturwissenschaftliche Fakultät I-  
Biowissenschaften, Institut Pharmazie, Halle/S.
2. Prof. Dr. Ludger Wessjohann  
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie; Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, Halle/S.
3. Prof. Dr. Carola Griehl  
Hochschule Anhalt; Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik,  
Köthen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 24.01.2017 in Halle

*Gewidmet  
meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungen .....	IV
1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary .....	3
3. Einleitung und Zielstellung .....	5
4. Stand des Wissens .....	7
4.1. Algen als Quelle bioaktiver Verbindungen .....	7
4.2. Alzheimer Erkrankung (AD) .....	11
4.2.1. Epidemiologie und Risikofaktoren .....	11
4.2.2. Symptomatik und Verlauf.....	12
4.2.3. Neuropathologische Charakteristika .....	12
4.2.4. Pathogenese .....	14
4.2.4.1. APP-Prozessierung und A $\beta$ -Peptide.....	15
4.2.4.2. Amyloid Kaskaden Hypothese .....	18
4.2.5. Derzeitige Therapieoptionen.....	19
4.2.6. Perspektivische Therapieansätze (AD Targets) .....	21
4.2.6.1. Therapieansatz: Hemmung der QC .....	30
5. Ergebnisse & Diskussion .....	35
5.1. Kultivierung der Mikroalgen .....	35
5.2. Extraktion und Extraktbearbeitung.....	37
5.3. Screening der Algenextrakte auf QC-inhibierende Eigenschaften .....	39
5.3.1. Parameterbestimmung für den QC-Assay.....	40
5.3.1.1. Michaelis-Menten Konstante $K_m$ .....	40
5.3.1.2. Einfluss der Lösungsmittel .....	40
5.3.2. QC-inhibierende Wirkungen der Algenextrakte .....	41
5.3.2.1. Untersuchung der konzentrationsabhängigen QC-Inhibierung .....	42
5.4. Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten .....	42
5.4.1. Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten mittels bioaktivitäts-geleiteter Isolierung .....	43
5.4.2. Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten mittels AcorA .....	49
5.4.2.1. Massenspektrometrische Untersuchungen .....	50
5.4.2.2. Korrelationsanalyse (AcorA) .....	52
5.4.2.3. Strukturelle Charakterisierung der identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Metaboliten .....	64
5.4.3. Untersuchungen der identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Metaboliten mittels Molecular Modeling.....	75
5.4.4. Aktivitätsnachweis der identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Metaboliten.....	78

5.4.5.	Isolierung der QC-aktiven Metaboliten (Sulfolipide) .....	79
5.5.	Charakterisierung weiterer Algenmetabolite .....	83
5.6.	Diskussion der erzielten Ergebnisse und durchgeführten Arbeiten .....	93
5.6.1.	Sulfolipide – neue QC-inhibierende Verbindungen aus Mikroalgen .....	93
5.6.2.	Identifizierung und Charakterisierung der QC inhibierenden Sulfolipide .....	96
6.	Material und Methoden .....	102
6.1.	Verwendete Geräte und Chemikalien .....	102
6.2.	Kultivierung der Mikroalgen .....	104
6.2.1.	Verwendete Mikroalgenspezies .....	104
6.2.2.	Verwendete Medien und Kultivierungsbedingungen .....	104
6.2.3.	Kultivierung im Labormaßstab (Vorkultur/Inokulum) .....	105
6.2.4.	Kultivierung im Technikumsmaßstab .....	105
6.2.5.	Prozessbegleitende Analytik .....	106
6.2.5.1.	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration .....	106
6.2.5.2.	Bestimmung Zellzahl .....	106
6.2.5.3.	Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate .....	106
6.2.6.	Ernte der Biomasse .....	106
6.3.	Zellaufschluss und Extraktion .....	107
6.3.1.	Dreistufige Extraktion .....	107
6.3.2.	Einstufige Extraktion .....	107
6.4.	Extraktaufarbeitung / Probenvorbereitung .....	108
6.4.1.	Chlorophyll-Entfernung .....	108
6.4.1.1.	Chlorophyllfällung modifiziert nach Greilinger und Gross .....	108
6.4.1.2.	Chlorophyll-Eliminierung mittels SA-Kartuschen .....	108
6.4.2.	Festphasenextraktion (SPE) .....	108
6.5.	Enzymbasierter Glutaminylzyklase-Assay .....	109
6.5.1.	Eingesetzte Enzyme .....	109
6.5.2.	Bestimmung der Enzym-Aktivitäten .....	110
6.5.3.	Ermittlung des kinetischen Parameters $K_m$ .....	110
6.5.4.	Aktivitätstoleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln .....	110
6.5.5.	Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte .....	111
6.5.6.	QC-Assay Testsystem .....	111
6.6.	Massenspektrometrie .....	111
6.6.1.	UPLC-ESI-Ion trap $MS^n$ .....	111
6.6.2.	ESI-FTICR MS .....	113
6.6.3.	ESI-API-MS .....	113
6.7.	Datenanalyse .....	113
6.7.1.	Peakpicking und Alignment .....	113
6.7.2.	Korrelationsanalyse (AcorA) .....	113

6.8.	Isolierung und Aufreinigung .....	114
6.8.1.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	114
6.8.2.	Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	114
6.8.3.	Dünnschichtchromatographie (DC).....	115
6.8.3.1.	Sprühreagenz Vanilin-Schwefelsäure.....	115
6.8.3.2.	Sprühreagenz Orcinol .....	115
6.8.4.	Aufreinigung der Sulfolipide .....	115
6.8.4.1.	Aufreinigung mittels NH <sub>2</sub> -Kartuschen .....	115
6.8.4.2.	Folch Wash (Entsalzung).....	116
6.9.	Molekular Modelling .....	116
6.10.	UV/Vis Spektroskopie .....	116
7.	Literaturverzeichnis .....	117
8.	Abbildungs – und Tabellenverzeichnis .....	135
9.	Anhang .....	139
	Danksagung .....	156
	Lebenslauf .....	157
	Publikationsverzeichnis .....	159
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i> .....	160

## Abkürzungen

AD	Alzheimer Erkrankung (Alzheimer's disease)
AchE (-I)	Acetylcholinesterase (-Inhibitor)
ACN	Acetonitril
a.i.	arbitrary intensities
AcorA	Aktivitäts-Korrelations-Analyse (Activity correlation analysis)
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
anal.	analytisch
APP	Amyloid Precursor Protein
AU	Absorptionseinheit (absorption unit)
BACE	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme
BChE (I)	Butyrylcholinesterase (-Inhibitor)
β-CTF	β-C-terminal fragment
bidest.	bidestilliert
ber.	berechnet
BTM	Biotrockenmasse
CF	Citratfällung
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (collisional induced dissociation)
DBE	Doppelbindungsäquivalente (double bond equivalents)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM <sup>^</sup>	Dichlormethan
DDIT	data dependent ion tree
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Enzyme Commission (of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB)
EI	Elektronenstoß Ionisierung
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
EPA	Eicosapentaensäure
ESI	Elektrospray Ionisierung
EtOH	Ethanol
FTICR	Fouriertransformation Ionenzyklotronresonanz
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
HE	Hilfsenzym
hisoQC	Isoenzym der humanen Glutaminylylase
hQC	humane Glutaminylylase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HR	Hochauflösung (high resolution)
i.A.	im Ansatz
IC <sub>50</sub>	Konzentration bei 50% Hemmaktivität (inhibitory concentration)

Isoprop.	Isopropanol
k.A.	keine Angabe
kB	kilobasen
kDa	kilo Dalton
K <sub>m</sub>	Michaelis - Menten – Konstante
<i>m</i>	Multipllett
M	Molarität (mol/l)
<i>m/z</i>	Masse/Ladung Verhältnis
MeOH	Methanol
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MS	Massenspektrometrie
NCE	normalisierte Kollisionsenergie (normalised collisional energy)
NFT	Neurofibrillary tangles
OD	Optische Dichte
QC	Glutaminylyklase
pE	Pyroglutamylrest
PBR	Photobioreaktor
PDA	Photodiodenarray-Detektor
pGAP	Pyroglutamat-Aminopeptidase
pH	lat. pondus hydrogenii
Pyr-AMC	Pyroglutaminsäure-7-amino-4-methylcoumarin
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Retentionszeit
SAG	Stammsammlung von Algenkulturen Göttingen
SiOH	Kieselgel
SP	stationäre Phase
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SV	Säulenvolumen
SQDG	Sulfoquinosyldiacylglyceride
SQG	1-O-(6-Deoxy-6-sulfo glucopyranosyl)-glycerol
SQMG	Sulfoquinosylmonoacylglyceride
TPSA	Topological Polar Surface Area
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivität: 1U = 1 µmol/min)
UPLC	Ultra Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (auch UHPLC)
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WP	Wachstumsphase

## 1. Zusammenfassung

Glutaminylykolasen (QC) (EC 2.3.2.5) konnten in verschiedenen Arbeiten pathophysiologisch mit verschiedenen Krankheiten unter anderem auch mit Morbus Alzheimer (AD) in Verbindung gebracht werden. QC spielt dabei eine zentrale Rolle bei der Entstehung von neurotoxischen pE-A $\beta$ -Peptidfragmenten, den Hauptbestandteilen der senilen Plaques. Die Inhibierung der QC stellt somit einen kausalen Behandlungsansatz dar. Bei der Identifizierung neuer therapeutischer Leitstrukturen k6nnen neben strukturbasierten, computergestutzten Wirkstoffentwicklungen auch Naturstoffe eine Quelle f6ur QC-inhibierende Verbindungen darstellen. Eine bisher fast noch unber6uhrt Rohstoffquelle f6ur pharmakologisch interessante Verbindungen stellen Algen dar. Sie besitzen die F6ahigkeit eine gro6e Vielfalt bioaktiver Inhaltsstoffe auch mit Enzym inhibierenden und neuroprotektiven Eigenschaften zu synthetisieren. Von den gesch6atzten 400.000 bis 500.000 Algenarten wurden bisher nur etwa 43.000 Arten klassifiziert sowie davon nur ein Bruchteil chemisch untersucht.

**Ziel** der Arbeit war es neue Glutaminylykolasen (QC)-inhibierende Verbindungen aus Algen, f6ur den Einsatz in der Behandlung der Alzheimer Erkrankung zu identifizieren, charakterisieren und zu isolieren.

In den ersten Arbeitsabschnitten wurden verschiedene Algenspezies (Chlorophyta und Eustigmatophyta) kultiviert und die Algeninhaltsstoffe aus den Biomassen extrahiert. Anschließend erfolgte ein Screening aller Algenextrakte im QC-Assay. 27 der 72 getesteten Extrakte zeigten eine QC-inhibierende Wirkung. Die methanolischen Extrakte stellten dabei die aktivste Extraktklasse dar.

Eine bioaktivit6atsgeleitete Isolierung der QC-inhibierenden Verbindung mit unterschiedlichsten chromatographischen Methoden war nicht zielf6uhrend, so dass eine alternative Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung der aktivit6atsrelevanten Verbindungen angewendet werden musste. Hierbei stellte der Ansatz der „Reverse Metabolomics“ eine erfolgversprechende Methode dar. Diese Methodik kombiniert Strategien der klassischen Naturstoffisolierung und Metabolomics Methoden. Es erfolgt hierbei eine Korrelation von massenspektroskopischen Daten mit Testergebnissen aus biologischen Assays mit Hilfe von chemoinformatischen Methoden (Aktivit6ats-Korrelations-Analyse, **activity correlation analysis**, AcorA). Unter Anwendung von AcorA erfolgte die Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten ausgehend von den chlorophyllfreien methanolischen Extrakten. Neben der Bestimmung der biologischen Aktivit6at (QC-Inhibierung) wurde eine massenspektrometrische Analyse der Extrakte durchgef6uhrt. Die massenspektrometrischen Analysen erfolgten mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> und ESI-FTICR-MS sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus. Die Korrelationsanalyse der beiden massenspektrometrischen Metabolitenprofil-Datens6atze (UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS) zeigten 6ubereinstimmende, signifikante Korrelationen gleicher Peakcluster von 6 Verbindungen.

In nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die im positiven (**19 – 21**) und die im negativen Ionenmodus korrelierenden Verbindungen (**22 – 24**) strukturell charakterisiert.

Bei den im positiven Ionenmodus korrelierenden Verbindungen (**19 – 21**) handelt es mit großer Wahrscheinlichkeit um Porphyrinderivate, wobei die Verbindung **21** als Phaeophytin identifiziert werden konnte.

Die im negativen Ionenmodus korrelierenden Verbindungen wurden als 1-O-palmitoyl-2-O-linolenyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**22**), 1-O-linolyl-2-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**23**) sowie 1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**24**) identifiziert. Diese Verbindungen stellen Vertreter der Sulfolipide, sogenannte SQDG's, dar. Bei den Analysen der massenspektrometrischen Daten fielen zwei weitere Verbindungen auf, die das gleiche Fragmentierungsverhalten zeigten. Anhand der massenspektrometrischen Daten konnte Verbindung **25** als 1-O-palmitoyl-3-O-(6'-sulfo- $\alpha$ -quinovopyranosyl)-glycerol und Verbindung **26** als 1-O-(6-Deoxy-6-sulfoglucopyranosyl)-glycerol identifiziert werden. Sie sind ebenfalls Sulfolipide.

Mittels Molecular Modeling erfolgte eine erste Untersuchung der Sulfolipide hinsichtlich ihres Potentials zur Hemmung der humanen QC. Die Docking Studien zeigten, dass diese Verbindungen, in verschiedenen Konformationen am Zn-Atom koordinieren sowie H-Brückenbindungen mit funktionell wichtigen Aminosäuren im aktiven Zentrum der QC knüpfen konnten. Für die Porphyrinderivate (**20 – 21**) konnten keine Konformationen ermittelt werden, in der die Verbindungen mit dem Zn-Atom oder funktionell wichtigen Aminosäuren der QC Wechselwirkungen eingehen konnten. Porphyrinderivate stellen somit keine potentiellen Inhibitoren der QC dar, was ebenfalls durch eine Testung der Referenzsubstanz Phaeophytin a im QC-Assay bestätigt werden konnte.

Für die Sulfolipide dagegen wurde im QC-Assay ein Aktivitätsnachweis erbracht. Für eine kommerziell erhältliche Standardsubstanz konnte eine Inhibierung der QC von 77 % und ein IC<sub>50</sub> – Wert von 10,9  $\mu$ M ermittelt werden.

In einem letzten Arbeitsabschnitt erfolgte die Isolierung der Sulfolipide aus Algen, um ihre inhibierende Aktivität gegenüber der QC zu bestätigen. Hierfür wurden Sulfolipide aus einem methanolischen Extrakt von *Sc. acuminatus* mittels einer NH<sub>2</sub>-Festphasenextraktionsmethode (SPE) isoliert. Sie zeigten ähnlich wie die Standardsubstanz eine Inhibierung von 86 % bzw. 82 % in den beiden getesteten Konzentrationen von 0,25 mg/mL bzw. 0,025 mg/mL gegenüber der QC.

Erstmals konnten somit QC-Inhibitoren aus Algen identifiziert, charakterisiert und isoliert werden. Ebenso konnte erstmals für Sulfolipide aus Algen eine QC-inhibierende Wirkung nachgewiesen werden.

## 2. Summary

Glutaminyl cyclase (QC, EC 2.3.2.5) could be associated with pathophysiological processes and represent targets for various diseases including Alzheimer's disease (AD). This QC plays a key role in the formation of neurotoxic pE-A $\beta$  peptide fragments, the main constituents of senile plaques. Therefore QC inhibition represents a causal treatment approach of AD. When identifying new therapeutic lead compounds in addition to structure-based drug developments, natural products can be a possible source of QC inhibiting compounds. Therefore Algae represent a potential almost untouched resource and research source in search of new pharmacologically interesting compounds. They are known for the ability to synthesize complex and highly diverse compounds with specific enzyme inhibitions and neuroactive properties. Only about 43000 of the 500000 estimated species are classified and thereof a small amount is characterized chemically.

**The aim of this study** therefore was the identification, characterization and isolation of new glutaminyl cyclase (QC) inhibiting compounds from algae with potential for the treatment and prophylaxis of Alzheimer's disease.

At first it was necessary to cultivate different algae species (Chlorophyta and Eustigmatophyta) in a 100 L tubular photobioreactor and extract the algae ingredients from the biomasses. This was followed by the screening of the algae extracts in QC assay. Here 27 of the 72 tested extracts inhibited the QC.

A bioassay guided isolation of QC inhibiting compound with different chromatographic methods were not effective, so an alternative strategy for identifying and characterizing of the activity relevant compounds needed to be applied. In this connection the approach of the "Reverse metabolomics" was a promising method. Thereby metabolomics methods are combined with strategies of natural product isolation. The methodology is based on the correlation of mass spectrometry data with bioactivity data from biological assays using cheminformatics methods (activity-correlation analysis, AcorA). So, the identification of QC inhibiting metabolites was carried out from the chlorophyll-free methanolic extracts using AcorA.

Activity-correlation analyse (AcorA) were carried out by a direct correlation of the mass spectrometry metabolite profiles of the UPLC-ESI-MS or ESI-FTICR-MS data of algae with the inhibition value of the QC of each extract in triplicate and coincident significant for six compounds. Further mass spectrometric investigations allowed for the structural characterization of the correlating compounds **19** – **21** (in positive ion mode) and the correlating compounds **22** – **24** (in negative ion mode). Compounds **19** – **21** (positive ion mode) are porphyrin derivatives, where as compound **21** was identified as phaeophytin. In the negative ion mode, the compounds **22** – **24** could be identified as 1-O-palmitoyl-2-O-linolenyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glucopyrano-syl)-glycerol (**22**), 1-O-linoyl-2-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glucopyranosyl)-glycerol (**23**) and 1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glyco-pyranosyl)-glycerol (**24**). These compounds are sulfolipids (SQDG).

By the mass spectrometric analysis of the data were further two compounds with the same fragmentation behavior detected. Based on the mass spectrometric data the compound **25** was identified as 1-O-palmitoyl-3-O(6 -sulfo- $\alpha$ -quinovopyranosyl)-glycerol and the compound

**26** was identified as 1-O-(6-deoxy-6-sulfoglucopyranosyl)-glycerol. They may also be allocated on the class of sulfolipids.

By molecular modeling was carried out a preliminary study of the compounds **20** - **26** about the possibility of QC inhibition. The docking studies showed that the sulfolipids (compounds **22** - **26**), coordinate in different conformations at the zinc atom and respond with hydrogen bond to functionally important amino acids in the active site of the QC. For the porphyrin derivatives, however, no conformations were identified, in which the compounds with the zinc atom or functionally important amino acids of the QC could enter into interactions. Porphyrin derivatives do not represent potential inhibitors of the QC, which also could be confirmed by testing the reference substance phaeophytin a in the QC assay. However, for the sulfolipids the inhibition of the QC was demonstrated by using a SQDG standard in the QC Assay and thus confirmed the ability of these compounds to be a QC inhibitor. A commercialized standard substance inhibited the QC about 77 % and had a determined IC<sub>50</sub> value of 10.9 μM.

Furthermore sulfolipids were isolated from algae to confirm their inhibitory activity against the QC. Therefore sulfolipids were isolated from a methanolic extract of *Sc. acuminatus* by using a solid phase extraction method (SPE) with NH<sub>2</sub> cartridge. They showed a similar QC inhibition like the standard substance with 86 % and 82 % in the two tested concentrations of 0.25 mg/mL and 0.025 mg/mL.

Thus, for the first time could QC inhibitors from algae identified, characterized and isolated. Likewise, for the first time could inhibitory effect of sulfolipids from algae against QC is demonstrated.

### 3. Einleitung und Zielstellung

Die Alzheimer Krankheit, eine neurodegenerative Erkrankung, ist die im Alter am häufigsten auftretende Form der Demenz. Sie wurde erstmals im Jahr 1906 von dem Psychiater Alois Alzheimer beschrieben [1]. Gekennzeichnet ist die Alzheimer Krankheit durch das Absterben von Neuronen sowie der Degeneration von Synapsen. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten bilden sich insbesondere in den Regionen des Hippocampus und des Neocortex „amyloide Plaques“ sowie „neurofibrilläre Tangles“. Da diese Bereiche des Gehirns vor allem für die höheren mentalen Fähigkeiten, wie z.B. Sprache und Erinnerung verantwortlich sind, kommt es im Verlauf der Krankheit zu Gedächtnisverlust, Verwirrtheit sowie Desorientierung, wobei die Symptome mit dem Verlust von Gehirnsubstanz einhergehen. Die Alzheimer Krankheit ist bisher nicht heilbar („unmet medical need“); die Erkrankten sterben durchschnittlich zwischen 5 bis 10 Jahre nach Ausbruch der Krankheit.

Weltweit sind über 24 Millionen, meist ältere Menschen, an Alzheimer erkrankt. Allein in Deutschland sind etwa 7 bis 10 % der über 65 Jährigen und ca. 40 % der über 80 Jährigen, was einer Zahl von ca. 2 Millionen Menschen entspricht, von Alzheimer betroffen. Aufgrund des weltweit fortschreitenden demographischen Wandels wird sich die Zahl der an Demenz erkrankenden Menschen nach Schätzungen in den nächsten Jahrzehnten bis zum Jahr 2050 auf 131,5 Millionen erhöhen und eine der größten medizinischen Herausforderungen der Zukunft darstellen [2].

Die bisher zugelassenen Antidementiva zeigen jedoch neben teilweise nur geringen Effekten auf die demenzielle Symptomatik, bei bestehenden Kontraindikationen und Nebenwirkungen nur eine geringe oder keine krankheitsmodulierende Wirksamkeit [3]. Es wird daher immer erforderlicher, geeignete Wirkstoffe zu finden und kausale Behandlungsstrategien zu entwickeln, die in pathologische Mechanismen eingreifen, bevor es zu einer massiven Neurodegeneration und ausgeprägten Symptomen kommt [4, 5].

Eine der gegenwärtig verfolgten kausalen Behandlungsstrategien stellt das Target Glutaminylzyklase (QC) dar. In verschiedenen Arbeiten konnte die humane Glutaminylzyklase (hQC) pathophysiologisch mit verschiedenen Krankheiten unter anderem auch mit Morbus Alzheimer (AD) in Verbindung gebracht werden [4,6,7].

Bei der Identifizierung neuer therapeutischer Leitstrukturen können neben der strukturbasierenden Wirkstoff-Entwicklung auch Naturstoffe eine Quelle für QC-inhibierende Verbindungen darstellen. Da Algen die Fähigkeit besitzen, eine große Vielfalt bioaktiver Inhaltsstoffe zu synthetisieren und bisher von den geschätzten 400.000 bis 500.000 Algenarten nur etwa 43.000 Arten klassifiziert sowie davon nur ein Bruchteil chemisch untersucht worden sind, ist anzunehmen das Algen ein enormes Potential für neue pharmakologisch interessante Verbindungen bergen. Die Tatsache, dass Algen komplexe und hochdiverse Verbindungen mit spezifischen Enzymhemmungen und neuroaktiven Eigenschaften synthetisieren [8–12], lässt annehmen, dass Algen auch bei der Suche neuer Leitstrukturen für die Therapie der Alzheimer Erkrankung eine mögliche Rohstoff- und Forschungsquelle darstellen.

**Ziel** der Arbeit war es daher, neue Glutaminylzyklase (QC)-inhibierende Verbindungen aus Mikroalgen für den Einsatz in der Behandlung der Alzheimer Erkrankung zu identifizieren, zu charakterisieren und zu isolieren.

## 4. Stand des Wissens

### 4.1. Algen als Quelle bioaktiver Verbindungen

Algen sind phototrophe Organismen, welche ubiquitär verbreitet sind und somit die unterschiedlichsten Lebensräume besiedeln. Sie weisen eine hohe Biodiversität mit entsprechend vielfältigen Stoffwechselwegen auf. Sie bilden eine Organismengruppe des Pflanzenreichs unterteilt in verschiedene Abteilungen und grenzen sich von den Landpflanzen dahingehend ab, da sie keine hoch entwickelten Organe wie Wurzeln, Sprosse und Blätter besitzen [13].

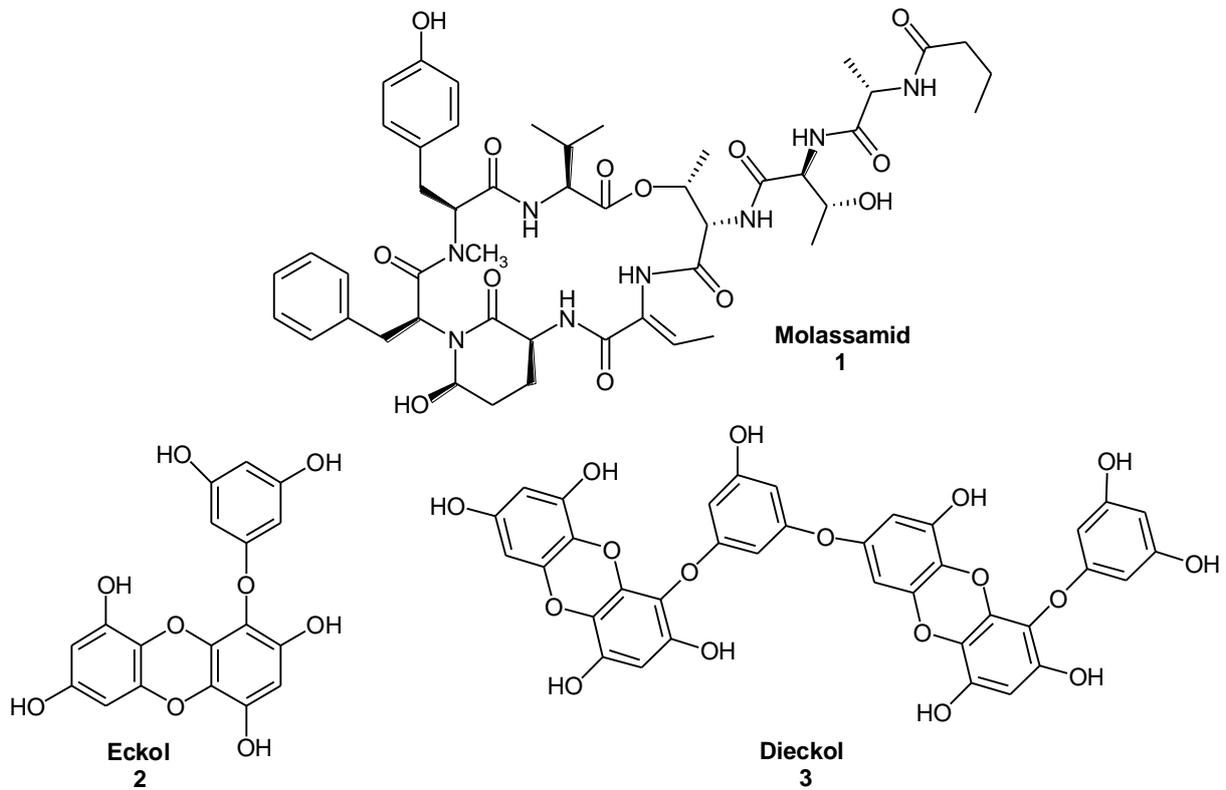
Algen zeigen oft einzigartige metabolische und physiologische Fähigkeiten. Sie sind in der Lage hoch diverse Metaboliten mit verschiedensten Bioaktivitäten zu synthetisieren. Die bioaktiven Verbindungen sind u.a. Fettsäuren, Steroide, Carotinoide, Phycocolloide, halogenierte Verbindungen und Polyketide aber auch Amide, Alkaloide, Glykolipide, Acrylsäuren, Phenole, Terpene, Peptide, Sulfatierte Polysaccharide, Acrolylcholine,  $\beta$ -Diketone und Isonitril enthaltende Indolalkaloide [12,14–16]. Neben antimikrobiell, antifungal, antikanzerogen, zytotoxisch, antineoplastisch sowie antiviral aktiven Sekundärmetaboliten konnten ebenso Verbindungen mit neuroaktiven und Enzym inhibierenden Eigenschaften aus Algen isoliert werden [8–12,17,18]. Da immer mehr Enzyme pathophysiologischen Prozessen zugeordnet werden können und damit Targets vieler Erkrankungen darstellen, erlangen Enzyminhibitoren, z.B. auch Naturstoffe aus Algen, zunehmend an Bedeutung.

Die ersten Cysteinprotease-Inhibitoren aus Algen wurden bereits vor 15 Jahren von Ishihara *et al.* beschrieben [19,20]. Weiterhin konnten für *Chlorella* sp. potente Inhibierungen der humanen Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) CD45 und PTP1C mit  $IC_{50}$ -Werten von 0,678  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nachgewiesen werden. Auch zeigten Extrakte eine inhibierende Aktivität auf die humanen Metalloproteinasen (MMP) und humanen Caspasen, mit nachfolgenden  $IC_{50}$ -Werten: MMP-1 (127  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), MMP-3 (185  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), MMP-7 (18,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), MMP-9 (237  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Caspase 1 (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Caspase 3 (203  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Caspase 6 (301  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Caspase 7 (291  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und Caspase 8 (261  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), welche *in vivo* bestätigt werden konnten [21].

**Molassamid**, ein Dolastatin 13 Analogon, welches aus der Alge *Dichothrix utahensis* isoliert wurde, zeigt eine Inhibierung der Serinproteasen Elastase und Chymotrypsin mit  $IC_{50}$ -Werten von 0,032 und 0,234  $\mu\text{M}$ . Eine Hemmung der Trypsin-Aktivität konnte auch bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  an Molassamid nicht beobachtet werden. Die Serinproteasen gehören zur Klasse der Peptidasen und sind an wichtigen biochemischen Prozessen, wie der Verdauung und der Hämostase, beteiligt. Im humanen Organismus werden sie durch Serpine in ihrer katalytischen Aktivität reguliert. Ein Fehlen dieser Inhibitoren führt zu Thrombosen oder zur Bildung von Lungenemphysemen [22].

Eine Inhibierung der collagen-degradierenden Metalloproteinase-1, die in Hautalterungsprozesse involviert ist, konnte für zwei aus *Ecklonia stolonifera* isolierte Substanzen ermittelt werden. Mittels Reporter-Gen-Assay wurde ein inhibitorischer Effekt von 43 % ( $IC_{50}$  20  $\mu\text{M}$ )

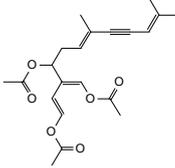
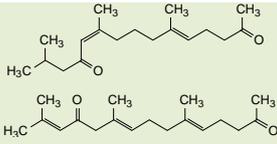
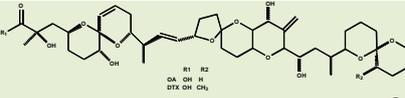
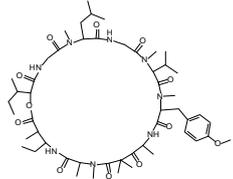
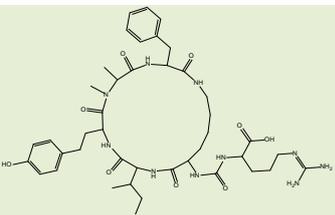
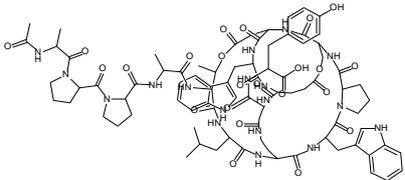
und 57 % für die aus den Methanol-Extrakten isolierten Phlorotannine **Eckol** (2) und **Dieckol** (3) detektiert [23].



**Abb. 1:** Strukturformeln des Depsipeptid Serinprotease-Inhibitor Molassamid (1) und der Verbindungen Eckol (2) und Dieckol (3)

Darüber hinaus sind weitere enzyminhibierende Verbindungen aus Algen bzw. enzyminhibierende Wirkungen von Algenextrakten in der Literatur beschrieben, die in Tabelle 1 dargestellt sind und das Potential der Algen, Enzyminhibitoren zu bilden, zeigen [16].

Tab. 1: Enzyminhibierende Verbindungen aus Algen

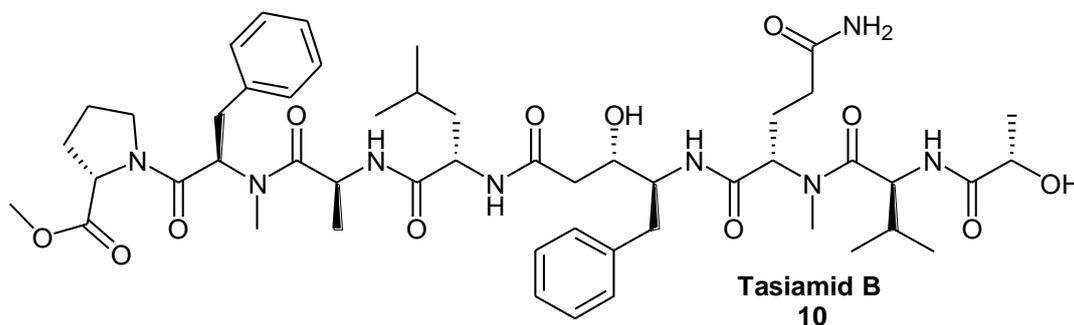
Alge	Extrakt / Verbindung	Inhibierung von	Referenz
<i>Rhodomela confervoides</i> , <i>Gracilaria textorii</i>	Organischer Extrakt	$\alpha$ -Glycosidase	[24]
<i>Caulerpa prolifera</i>	Caulerpenyne 	Phospholipase A <sub>2</sub>	[25]
<i>Sargassum sagamianum</i>	Farnesylaceton-Derivate 	Cholinesterase	[26]
<i>Ascophyllum nodosu</i> , <i>Fucus serratus</i>	Polyphenole	$\alpha$ -Amylase, Trypsin, Lipase	[27]
<i>Dinophysis</i> spp. <i>Prorocentrum</i> spp.	Dinophysistoxine / Okadasäure 	Serin- und Threonin-phosphatase	[28]
<i>Lyngbya confervoides</i>	Lyngbyastatin 	Serinproteasen Elastase	[29]
<i>Anabaena</i> spp.	Anabaenopeptins 	Serinproteasen	[30]
<i>Microcystis</i> sp.	Cyanopeptolins Microviridin A Microviridin B-C Microviridin D-F Microviridin G-H Microviridin I Microviridin J 	Chymotrypsin Tyrosinase Elastase Elastase, Chymotrypsin Elastase Elastase, Chymotrypsin, Trypsin Serin Protease	[31] [32]
<i>Fucus evanescens</i> <i>Pelvetia babingtonii</i>	Organischer Extrakt	Dehydrogenase von <i>Trypanosoma cruzi</i> (Erreger der Chagas-Krankheit)	[33]

In den letzten Jahren wurden Algen besonders im Hinblick auf neue Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibitoren untersucht. Hierbei zeigte sich, dass viele Algen signifikante AChE-inhibierende Eigenschaften aufweisen. In nachfolgender Tabelle 2 ist eine Auswahl AChE-inhibierender Extrakte bzw. Verbindungen aufgeführt.

**Tab. 2:** Acetylcholinesterase inhibierende Aktivitäten ausgewählter mariner Algen

Algen	Extrakte/Verbindung	IC <sub>50</sub>	Referenz
<i>Caulerpa racemosa</i>	MeOH Extrakt	5.5 mg/mL <sup>-1</sup>	[34]
<i>Codium capitatum</i>	MeOH Extrakt	7.8 mg/mL <sup>-1</sup>	[34]
<i>Ulva fasciata</i>	MeOH Extrakt	4.8 mg/mL <sup>-1</sup>	[34]
<i>Halimeda cuneata</i>	MeOH Extrakt	5.7 mg/mL <sup>-1</sup>	[34]
<i>Dictyota humifusa</i>	MeOH Extrakt	4.8 mg/mL <sup>-1</sup>	[34]
<i>Hypnea valentiae</i>	MeOH Extrakt	2.6 mg/mL <sup>-1</sup>	[35]
<i>Padina gymnospora</i>	MeOH Extrakt	3.5 mg/mL <sup>-1</sup>	[35]
<i>Ulva reticulata</i>	MeOH Extrakt	10 mg/mL <sup>-1</sup>	[35]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	4-Hydroperoxy-24-vinylcholesterol	389.1 µM	[36]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Eckstolonol	42.66 µM	[36]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Eckol	20.56 µM	[36]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Phlorofucofluoroeckol-A	4.89 µM	[36]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Dieckol	17.11 µM	[36]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	2-Phloroeckol	38.13 µM	[36]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	7-Phloroeckol	21.11 µM	[36]
<i>Ishige okamurae</i>	6,6'-Bieckol	46.42 µM	[37]

Eine besonders aktive Substanzklasse stellen hierbei die Phlorotannine dar. Die aus *E. stolonifera* isolierten Verbindungen Eckol (**2**), Dieckol (**3**), 2-Phloroeckol und 7-Phloroeckol weisen eine konzentrationsabhängige Inhibierung der AChE auf. Weiterhin inhibieren Eckstolonol und Phlorofucofuroeckol-A sowohl die AChE als auch die BChE (Butyrylcholinesterase) [Yoon *et al.*, 2009]. Eine weitere gekoppelte Inhibierung der AChE und der BChE konnte bei *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata* detektiert werden [36].

**Abb. 2:** Strukturformel des linearen Depsipeptids Tasiamid (**10**)

Weiterhin zeigten Phlorotannine aus *Eisenia bicyclis* eine Inhibierung des BACE-1 (*beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme*), welches in der Amyloid Precursor Protein (APP) Prozessierung eine wichtige Rolle spielt und eines der möglichen Targets in der AD Therapie darstellt [38].

Eine BACE-1 inhibierende Aktivität konnte ebenfalls bei dem cyanobakteriellen linearen Depsipeptid Tasiamid B (**10**) nachgewiesen werden [12].

## 4.2. Alzheimer Erkrankung (AD)

Die Alzheimer Erkrankung (AD) ist die im Alter am häufigsten auftretende Form der Demenz, die sich durch eine typische Neuropathologie sowie Pathogenese auszeichnet.

Die Mehrzahl der AD Erkrankungen tritt sporadisch auf; nur etwa 5-10 % aller Fälle sind familiären Ursprungs (FAD) und werden autosomal dominant vererbt [39]. Hierbei lässt sich die Familial Alzheimer Disease (FAD) auf Mutationen oder Polymorphismen des Präsenilin-1-Gens auf Chromosom 14, des Präsenilin-2-Gens auf Chromosom 1 oder des APP-Gens auf Chromosom 21 zurückführen [40]. Die FAD ist durch einen Krankheitsausbruch im mittleren (40–50 Jahre) oder frühen (20–30 Jahre) Lebensalter gekennzeichnet. Histopathologisch kann sie nicht von der sporadisch auftretenden AD unterschieden werden [41,42].

### 4.2.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Die Alzheimer Erkrankung ist mit 50 bis 70 % die häufigste Demenzform, gefolgt von der Lewy-Körperchen Demenz (LBD, engl. Lewy body dementia) und den vaskulären Demenzen [43,44].

Einen gesicherten epidemiologischen Risikofaktor stellt das Vorhandensein des ApoE4-Allels des Apolipoprotein-E (ApoE) auf Chromosom 19 dar. Hierbei erhöht das ApoE4-Allel das Risiko an AD zu erkranken für Heterozygote um ca. das Dreifache und für Homozygote um ca. das 15-fache [45].

Des Weiteren gilt es als gesichert, dass Punktmutationen (SNPs) in den Genen des „Presenilin 1“ und „Presenilin 2“, welche Bestandteile der  $\gamma$ -Sekretase sind, sowie SNPs des APPs (Chromosom 21) ebenfalls das Risiko für die Entwicklung einer AD erhöhen [46].

Neben dem Altern als wichtigsten bekannten nicht-genetischen Risikofaktor für AD, stellen weitere Faktoren wie z.B. Kopfverletzungen, niedrige Bildungsniveaus, Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Homocysteinämie, Diabetes mellitus und Fettleibigkeit, fördernde, aber nicht hinreichende Faktoren für die AD dar. Die Kombination eines vorhandenen ApoE4-Allels mit einem oder mehreren dieser lebensbedingten Risikofaktoren können eine weitere Risikoerhöhung für AD darstellen [47].

Weltweit sind ca. 46,8 Mio. Menschen an Demenz erkrankt. Diese Zahl wird sich voraussichtlich bis auf 74,7 Mio. in 2030 und bis auf 131,5 Mio. zum Jahr 2050 erhöhen [2,48]. In Deutschland sind ca. 2 Mio. Menschen an einer Demenz, darunter etwa 650.000 an AD, erkrankt. Die jährliche Zahl der Neuerkrankungen wird auf ca. 250.000 geschätzt. Nach Berechnungen des Statistischen Bundesamtes wird bei den über 65 Jährigen in den nächsten 30 Jahren die Zahl der Erkrankten um ca. 7 Mio. zunehmen [49]. Ursächlich sind zum einen das Bevölkerungswachstum und zum anderen das demografische Altern [50].

Angesichts dieser Zahlen und der steigenden Gesundheitskosten wird deutlich, dass diese Erkrankung ein gesundheitspolitisches und sozialmedizinisches Problem höchster Priorität darstellt [43]. Die weltweiten Kosten, die von Demenz-Erkrankungen ausgehen, sind von 604 Milliarden US\$ im Jahr 2010 auf 818 Milliarden US\$ im Jahr 2015 gestiegen, was einem Plus von 35,4 % entspricht. Die aktuelle Schätzung von 818 Milliarden US\$ entspricht 1,09 % des globalen Bruttoinlandsprodukts. Demenz hat somit eine große wirtschaftliche

Bedeutung und wird bis zum Jahr 2018 zu einer „Billionen-Dollar-Krankheit“. Es wird nur wenige Gesundheitssysteme geben die in der Lage sein werden, dies zu bewältigen [47].

#### **4.2.2. Symptomatik und Verlauf**

Die AD ist durch einen langsamen, chronisch progredienten Verlauf gekennzeichnet [44]. Sie kann klinisch anhand des Ausmaßes der kognitiven Defizite in ein frühes, ein mittleres und ein spätes Stadium eingeteilt werden.

Als Prodromalphase wird die sogenannte leichte kognitive Beeinträchtigung (MCI, engl. mild cognitive impairment) bezeichnet und kann individuell unterschiedlich lange andauern. Die MCI bezeichnet eine erworbene Störung der Merkfähigkeit, der Aufmerksamkeit oder des Denkvermögens, die über die normale altersabhängige Leistungsabnahme hinausgeht, aber noch nicht das Ausmaß einer Demenz erreicht. Hierbei sind die Erkrankten in der Ausübung ihrer Alltagstätigkeiten (ADL, engl. activity of daily living) noch nicht eingeschränkt [51].

Die Erkrankung zeichnet sich durch ein fortschreitendes, irreversibles Absterben von Nervenzellen und Synapsen im Gehirn aus. Durch diesen Nervenzell- und Synapsenverlust kommt es zu einer hippokampalen und kortikal betonten Hirnatrophie [52–55].

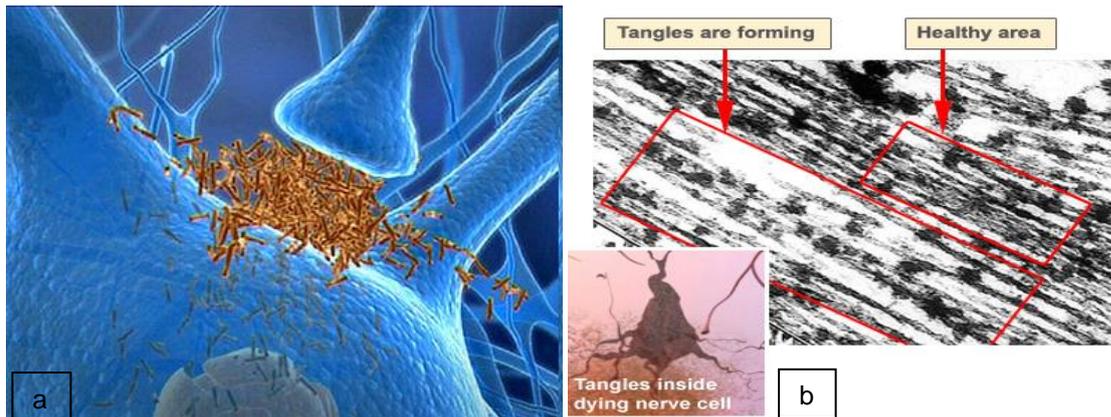
Besonders in den Hirnarealen des zerebralen Cortex und des limbischen Systems führt der Zellverlust symptomatisch zu einer sukzessiven Abnahme der Gedächtnis- und Orientierungsleistung sowie zu Beeinträchtigungen des Denk- und Urteilsvermögens. Die stetige Verschlechterung der kognitiven Leistung bis hin zum Wahrnehmungsverlust führt zu Apathie und teilweise zum gänzlichen Verlust der Kontrolle über die eigenen Körperfunktionen [56,57].

Während der Erkrankung treten Störungen des räumlich visuellen Denkens, von Exekutivfunktionen, der Orientierung, eine Agnosie, eine Aphasie und eine Apraxie bei lang erhaltener Persönlichkeit, außerdem nicht kognitive Veränderungen wie Depressionen, Antriebsmangel, Angst, psychomotorische Unruhe oder Beeinträchtigung der Wahrnehmung auf. Auch Verhaltensstörungen und psychotische Symptome, wie Halluzinationen und Wahnvorstellungen können eintreten [39,58]. Das Bewusstsein ist dabei ungestört [59].

In späten Stadien kann es zur nahezu vollständigen Einbuße der kommunikativen und motorischen Fähigkeiten kommen, so dass ein selbständiges Ausführen der ADL unmöglich wird und die Erkrankten pflegebedürftig werden [60].

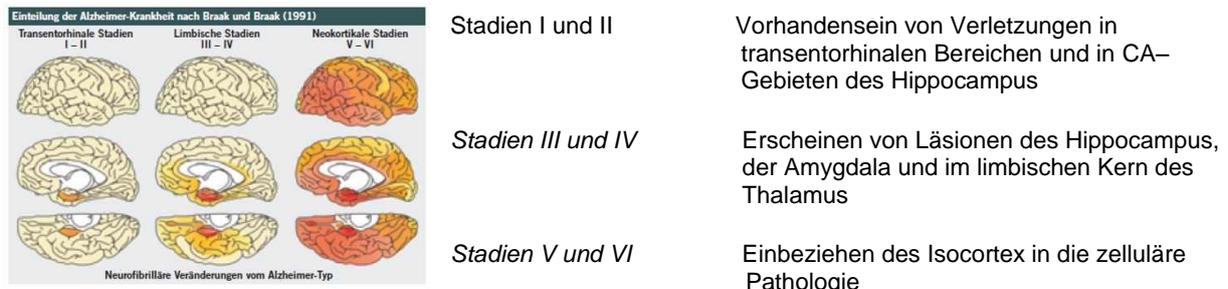
#### **4.2.3. Neuropathologische Charakteristika**

Bereits Alois Alzheimer beobachtete zwei pathologische Läsionen, deren Vorkommen mit allen Formen von AD assoziiert werden können. Im Gehirn von AD Patienten kommt es zur Bildung von amyloiden Plaques und neurofibrillären Faserbündeln (NFT), die die pathologischen Charakteristika dieser Erkrankung darstellen (Abb. 3) [43]. Sie befinden sich in den Regionen des Hippocampus und des Neocortex, Bereiche die für die höheren mentalen Fähigkeiten wie z.B. Sprache und Erinnerung zuständig sind.



**Abb. 3:** (a) amyloide Plaques außerhalb einer Nervenzelle [61]; (b) neurofibrilläre Faserbündel innerhalb einer Nervenzelle [62]

Braak und Braak zeigten, dass die Entstehung und Ablagerung von NFTs im Krankheitsverlauf bestimmten räumlichen und zeitlichen Mustern folgen. Anhand der Lokalisation und des Ausmaßes der NFTs lassen sich sechs Stadien (s. Abb. 4) differenzieren, die dabei mit den klinischen Symptomen korrelieren [63,64].



**Abb. 4:** Einteilung der Alzheimer-Krankheit nach [61] S.91

### Amyloide Plaques

Die amyloiden Plaques bestehen aus aggregierten A $\beta$ -Peptiden. Allgemein werden Plaques in senile (neuritische) und diffuse (nicht-neuritische) Plaques unterteilt. Diese Plaques besitzen unterschiedliche Formen. So weisen die senilen Amyloidplaques einen dichten Kern sowie eine diffuse Korona auf und sie kommen hauptsächlich in der grauen Hirnsubstanz vor. Darüber hinaus kommt es in der Umgebung seniler Plaques zu einer reaktiven Zunahme von Astrozyten und Mikroglia sowie zu dystrophen Neuriten, was eine größere pathogene Bedeutung im Vergleich zu diffusen Plaques anzeigt [42]. Weiterhin kennzeichnet eine umgebene Entzündungsreaktion, welche durch aktivierte Glia und eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren charakterisiert ist, diese Plaques [65]. In Bezug auf den Krankheitsverlauf bei AD gibt es verschiedenste Hypothesen. So besagt z.B. eine Hypothese, dass die senilen Plaques selbst neurotoxisch wirken, oder das in löslichen Fraktionen vorliegende A $\beta$ -Peptid die Langzeitpotenzierung (LTP) hemmt und als Folge Gedächtnisstörungen verursacht [66].

Senile Amyloidplaques sind extrazelluläre Ablagerungen, die wie auch ihre intrazellulären Vorläuferformen mit Neuronenverlust in Verbindung gebracht werden [67–69].

Die diffusen Plaques sind wesentlich häufiger als die senilen und kommen auch in Gehirnarealen vor, welche normalerweise keine Läsionen während der Alzheimerschen Erkrankung aufweisen. Sie weisen einen wenig dichtgepackten Phänotyp auf und kommen auch in der Gehirnmasse von klinisch gesunden Menschen vor, stellen also kein eindeutiges Merkmal

der Alzheimer'schen Erkrankung dar. Von den diffusen Amyloidplaques wird angenommen, dass diese möglicherweise der Aggregationsursprung für die senilen Plaques sind [42,70].

#### **Neurofibrilläre Faserbündel (NFT)**

Die NFTs stellen intrazelluläre Produkte der Neuronen dar. Sie bestehen aus dem Tau-Protein und treten sowohl bei der AD als auch bei anderen neuronalen Erkrankungen auf.

Bei dem Tau-Protein handelt es sich um ein niedermolekulares Phosphoprotein, welches erstmals 1975 charakterisiert wurde [71] und im gesunden Hirngewebe die Mikrotubuli stabilisiert [72]. Die Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau wird hierbei durch den Phosphorylierungsgrad reguliert. Während im gesunden Gehirngewebe ein Phosphorylierungsgrad von 2-3 Mol Phosphat pro Mol Tau auftritt, liegt dieses Protein im erkrankten Hirngewebe im hyperphosphorylierten Zustand mit einem Phosphorylierungsgrad von 6-8 Mol Phosphat pro Mol Tau vor [73,74]. Es kann somit nicht mehr an die Mikrotubuli binden, sondern akkumuliert und bildet ca. 10 nm lange Filamente. Diese Filamente lagern sich zu wasserunlöslichen Helices zusammen und werden als neurofibrilläre Faserbündel bezeichnet. Die Phosphorylierung kann von einer Reihe von Protein-Kinasen erfolgen. So führt z.B. die zyklinsabhängige Kinase 5 (CDK-5) zur Hyperphosphorylierung, wobei es infolge einer Fehlregulierung zur proteolytischen Abspaltung des Fragments p25 der Kinase kommt. Dadurch erhält die Kinase eine konstitutive Aktivität, so dass das Tau-Protein hyperphosphoryliert wird [75].

Ohne die stabilisierende Funktion des Tau-Proteins desintegrieren die Mikrotubuli in ihre Untereinheiten. In Folge dessen kommt es zum Absterben der Neuronen durch Nährstoffmangel und somit zu neurologischen Beschwerden.

#### **4.2.4. Pathogenese**

Die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung ist multifaktoriell bedingt und wird wahrscheinlich durch co-pathologische Wechselwirkungen verschiedener Faktoren wie APP/A $\beta$ , ApoE4, Tau,  $\alpha$ -Synuclein, TDP-43, Alter und andere Risikofaktoren (wie z.B. Diabetes mellitus, Entzündungen, Kopfverletzungen) hervorgerufen. Die Art der Verknüpfung der verschiedenen Faktoren, die zum letztendlichen Neuronenverlust führt, ist bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt [47].

Die Aggregation und Akkumulation von A $\beta$  im Gehirn resultiert aus einer erhöhten Produktion von A $\beta$ , einem verminderten Abbau durch A $\beta$ -degradierende Enzyme oder einem reduzierten Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke. A $\beta$ -Oligomere beeinträchtigen die synaptischen Funktionen sowie die damit verbundenen Signalwege, ändern die neuronalen Aktivitäten und die Freisetzung von neurotoxischen Mediatoren aus Gliazellen.

Fibrilläre Amyloid-Plaques verzerren neuronale Prozesse. Das Lipid-Transportprotein ApoE4 beeinträchtigt die A $\beta$ -Clearance und fördert somit die A $\beta$ -Ablagerungen. Innerhalb von gestressten Neuronen exprimiert, wird ApoE4 in einem viel größeren Ausmaß als apoE3 in neurotoxische Fragmente gespalten, die das Zytoskelett stören und die Mitochondrienfunktion beeinträchtigen. Tau, das normalerweise am häufigsten in Axonen vorkommt, ist in dem Perikaryon und den Dendriten fehllokalisiert und bildet Einschlüsse, die als NFT bezeichnet werden. Auch  $\alpha$ -Synuclein kann selbst zu pathogenen Oligomeren zusammenla-

gern und größere Aggregate (Lewy-Körperchen) bilden. Sowohl Tau als auch  $\alpha$ -Synuclein können in den extrazellären Raum freigesetzt werden, wo sie sich auf andere Zellen verteilen können. Vaskuläre Anomalien beeinträchtigen die Versorgung mit Nährstoffen und den Abtransport von Stoffwechselnebenprodukten, führen zu Mikroinfarkten und fördern die Aktivierung von Gliazellen [47].

Eine zentrale Rolle spielt das A $\beta$ -Peptid sowie seine Prozessierung aus dem APP.

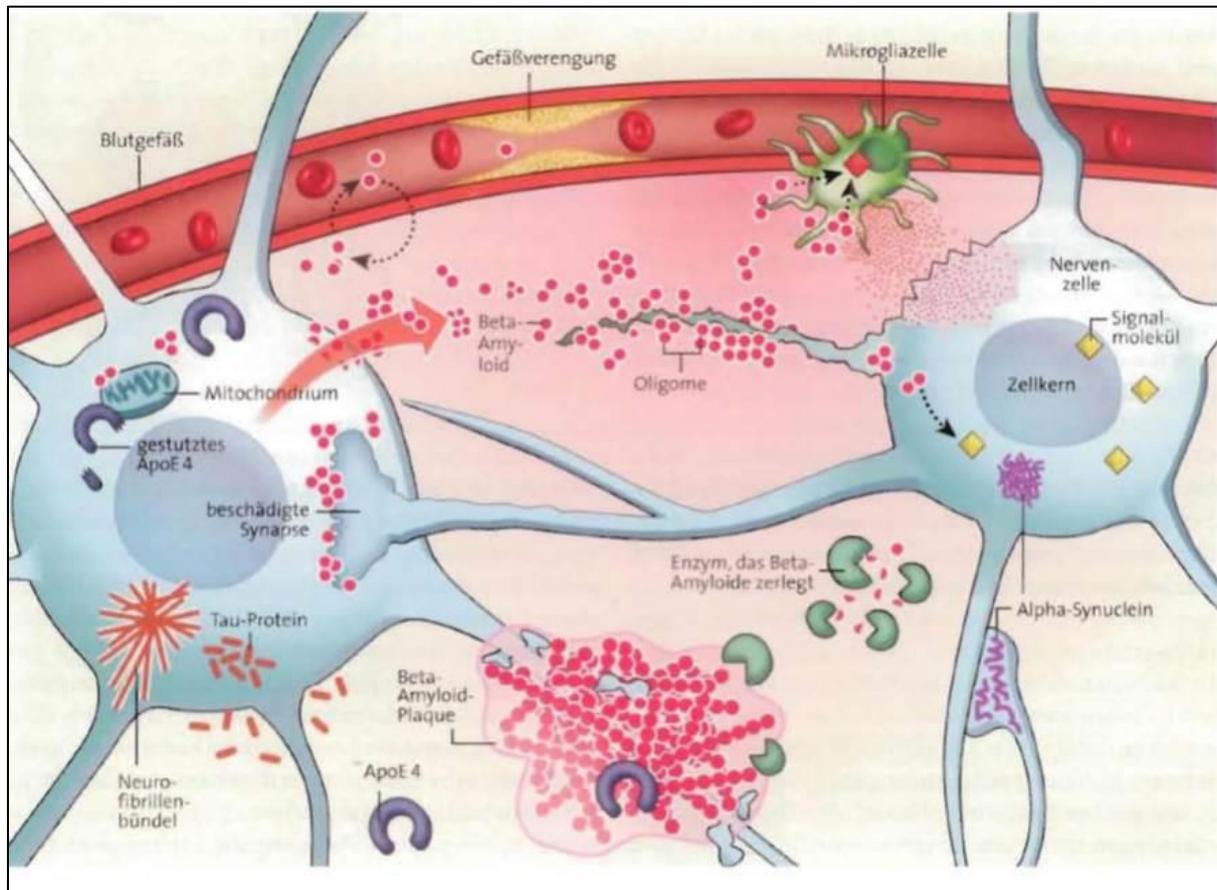


Abb. 5: Multifaktorielle Basis der AD Pathogenese [Quelle: [76] Seite 9]

#### 4.2.4.1. APP-Prozessierung und A $\beta$ -Peptide

Die A $\beta$ -Peptide sind die Hauptbestandteile der amyloiden Plaques und gehen aus der enzymatischen Spaltung des APP hervor.

Sowohl in von Alzheimer betroffenen als auch in gesunden Gehirnen entsteht A $\beta$  aus dem APP, einem integralen Membran-Vorläuferprotein. APP wird ubiquitär im Körper exprimiert, wobei der höchste Expressionsgrad im menschlichen Gehirn sowie in den Nieren und dem Herz gefunden worden [77]. Es besitzt eine große extrazelluläre Domäne (Ektodomäne oder N-terminale Domäne) und im Vergleich dazu eher eine kurze intrazelluläre Domäne (Endodomäne oder C-terminale Domäne) sowie eine Transmembranregion (TMR) mit einem einfachen,  $\alpha$ -helikalen Membrandurchgang. APP ist beim Menschen auf dem Chromosom 21 lokalisiert und besitzt mindestens 18 Exons, welche für 3,3 bis 3,5 kb RNA-Transkripte kodieren [78–81]. Durch alternatives mRNA-Spleißen der Exons können eine Reihe von Isoformen gebildet werden, wobei bevorzugt die APP-Spleißformen mit 770, 751 und 695 Aminosäuren

exprimiert werden [82]. Die Expression der verschiedenen Spleiß-Varianten kann zelltypabhängig variieren, so stellt z.B. die APP-Spleißform mit 695 Aminosäuren die dominante Isoform in menschlichen Neuronen des zentralen Nervensystems dar [83].

APP konnte bisher mit einer Vielzahl an physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht werden. Neben einer Funktion als Zelloberflächenrezeptor [79], wurde eine Bedeutung als Rezeptor für das A $\beta$ -Peptid [84,85] festgestellt. Weiterhin kann APP für die Zell-Zell-Interaktion z.B. bei der APP-vermittelten Adhäsion von Neuronen und Gliazellen während der Gehirnentwicklung bedeutsam sein [86] und in neuronalen Prozessen auch regulatorisch wirken. So wird APP insgesamt mit Neuritenwachstum, dendritischer Verzweigung, Synptogenese, neuronaler Erregbarkeit und synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht [87]. Zudem ist APP als Frachtrezeptor beim axonalen Vesikeltransport involviert [88–91].

Die APP-Prozessierung kann auf zwei Wegen erfolgen, zum einen auf dem amyloidenen und zum anderen auf dem nicht-amyloidenen Weg (Abb. 6).

Beim **nicht-amyloidenen Weg** erfolgt die sequenzielle Spaltung des APP's durch die  $\alpha$ - und nachfolgend durch die  $\gamma$ -Sekretase, wodurch die Bildung von A $\beta$ -Peptiden verhindert wird. Die **amyloide Prozessierung** dagegen erfolgt unter der sequenziellen Spaltung des APP's durch die  $\beta$ - und nachfolgend durch die  $\gamma$ -Sekretase, wodurch A $\beta$ -Peptide gebildet werden. Beide APP-Prozessierungen können auch in gesunden Nervenzellen, teilweise parallel, ablaufen [92].

Des Weiteren kann die APP-Prozessierung nicht nur ausschließlich an der äußeren Zellmembran, sondern auch im endoplasmatischen Retikulum, also intrazellulär, stattfinden [93].

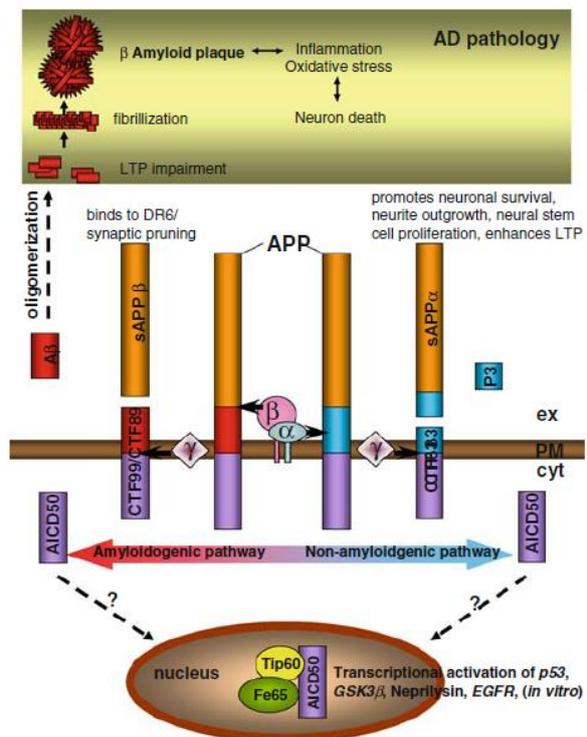


Abb. 6: APP-Prozessierung [[96] Seite 2]

Der **nicht-amyloide Weg** erfolgt bei gesunden Menschen zu einem Anteil von ca. 90 %. Hierbei wird das APP zunächst von der  $\alpha$ -Sekretase, einer membrangebundenen Metalloprotease, geschnitten. Hieraus resultiert ein lösliches sAPP $\alpha$ - und ein membrangebundenes C 83-Fragment. Bei anschließender Spaltung des C 83-Fragments durch die  $\gamma$ -Sekretase, einer membrangebundenen Aspartylprotease, wird das nicht zur Aggregation neigende Peptid p3 freigesetzt und ein intrazelluläres APP-intrazelluläre-Domäne-(AICD)-Fragment entsteht [66,94]. A $\beta$  kann auf diesem Weg nicht entstehen [95,96].

Der **amyloide Weg** ist in der Pathogenese von AD von entscheidender Bedeutung, da durch ihn das toxische A $\beta$ -Peptid entsteht und freigesetzt wird.

Hierbei schneidet anstelle der  $\alpha$ -Sekretase die membranständige  $\beta$ -Sekretase (*site APP-cleaving enzyme* oder BACE-1) APP nahe der extrazellulären Membranseite zwischen den

Aminosäureresten M596 und D597 [97–99]. Es entsteht zunächst das lösliche extrazelluläre sAPP $\beta$ -Fragment („soluble“ APP $\beta$ ) und das in der Membran verbleibende C 99-terminale Fragment ( $\beta$ -CTF oder C 99-Fragment), das nach dem Abspalten der Ektodomäne, ein Prozess der auch als „ectodomain shedding“ bezeichnet wird, als Substrat für die  $\gamma$ -Sekretase zur Verfügung steht. Nach Entfernen der Ektodomäne kann die  $\gamma$ -Sekretase das C 99-terminale Fragment erkennen und innerhalb der Membran schrittweise prozessieren. Durch die Spaltung der  $\gamma$ -Sekretase werden A $\beta$ -Peptide generiert und in den extrazellulären Raum abgegeben [92,96]. Hierbei entsteht am häufigsten ein 40 Aminosäure großes A $\beta$ -Peptid. Jedoch kommt es in 5-10 % zur Bildung von 42 Aminosäuren umfassenden A $\beta$ -Peptiden, welche die Hauptkomponente der amyloiden Plaques darstellen. Auch wenn sich die Länge der beiden A $\beta$ -Peptide A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$  nur um zwei Aminosäuren unterscheidet, sind die chemischen Eigenschaften verändert. Durch die beiden zusätzlichen Aminosäuren Ile und Ala erhöht sich die Lipophilie des A $\beta_{42}$ -Peptides und zeigt *in vitro* eine deutlich höhere Aggregationsbereitschaft zu Oligomeren und Plaques [100,101]. Auch sind diese Peptide resistenter gegenüber einem proteolytischen Abbau [102]. Normalerweise sind die A $\beta_{42}$ -Peptide als  $\alpha$ -Helix gewunden und liegen als Monomere vor, jedoch kommt es in Folge einer Proteinfehlfaltung zur Ausbildung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur. Diese Konformationsänderung fördert weiterhin eine Aggregation der Peptide und somit die extrazelluläre Bildung der Plaques [41,102].

Weiterhin zeigten zahlreiche biochemische Studien, dass A $\beta$ -Peptide aus AD-Gehirnen post-translational durch Isomerisierungen, Racemisierungen oder zu Pyroglutamat modifiziert sein können. So beschrieben Mori *et al.*, dass 15 – 20 % der gesamten A $\beta$ -Peptide einen Pyroglutamatrest am N-Terminus tragen [103,104].

Die Bildung von Pyroglutamat (pGlu)-modifizierten A $\beta$ -Peptiden (A $\beta_{x(pE)-42}$ ) ist ein mehrstufiger Prozess. Nach der Spaltung von APP durch das  $\beta$ -site APP-cleaving Enzyme (BACE1) und die  $\gamma$ -Sekretase wird A $\beta_{1-40/42}$  frei gesetzt. Das Glutamat am N-Terminus der A $\beta$ -Peptide wird dann von der Glutaminylylzyklase (QC) zu Pyroglutamat (pE) zyklisiert, so dass A $\beta_{3(pE)-40/42}$  und A $\beta_{11(pE)-40/42}$  Peptide entstehen können [104].

Diese pE-Modifikation von A $\beta$  zu A $\beta_{pE3}$  führt zu veränderten biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften, insbesondere Änderung des Aggregationsverhaltens und der Stabilität. Die Bildung des Lactamringes und der Ladungsverlust führen zu einer höheren Hydrophobie und damit zu einer höheren Stabilität und Aggregationsneigung. Darüber hinaus erhöht die Bildung des N-terminalen Pyroglutamats, das resistent gegen den Abbau durch Peptidasen ist, die Stabilität des Peptids weiter. Die pGlu-modifizierten A $\beta$ -Peptide besitzen somit eine geringere Löslichkeit und sind resistenter gegenüber katabolischen Prozessen. Sie aggregieren 200-mal besser und sind 10-mal stabiler gegenüber einem proteolytischen Abbau [105–107].

Das A $\beta_{pE3}$ -Peptid wurde in mehreren Studien als diagnostischer und therapeutischer Ansatzpunkt für AD identifiziert [104,106,108–111].

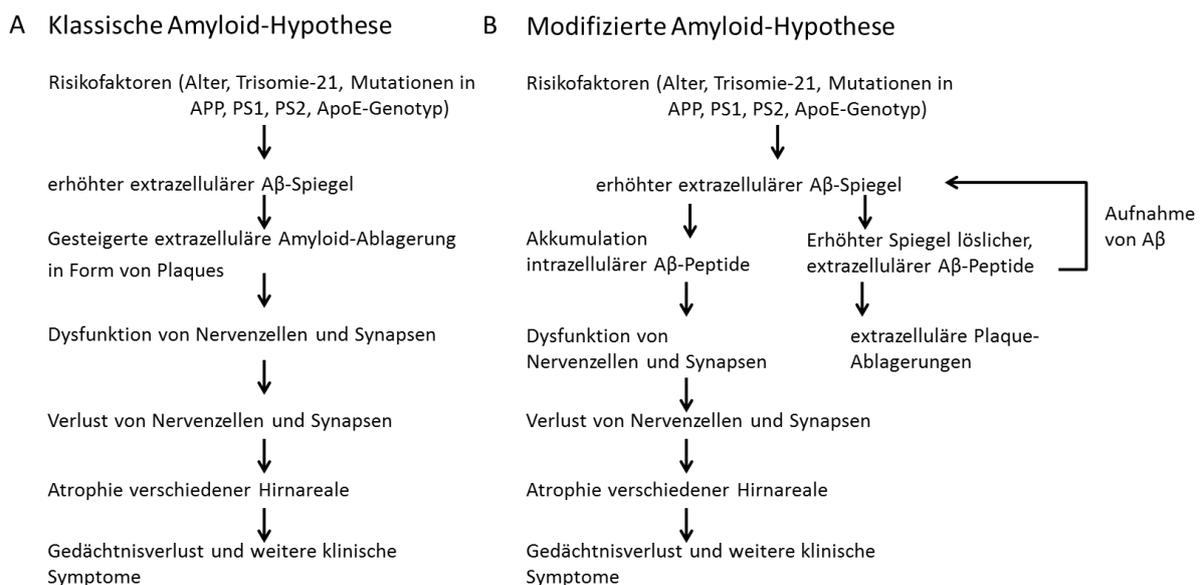
A $\beta_{pE3}$ -Oligomere können sich intraneuronal und perivaskulär im Gehirn ablagern. Weiterhin ist der A $\beta_{pE3}$ -Spiegel im Blutplasma von AD-Patienten signifikant niedriger als bei Gesunden. Es wird angenommen, dass A $\beta_{pE3}$ -Oligomere, neben ihrer eigenen Neurotoxizität, die Entstehung von A $\beta$ -Plaques begünstigen. Der niedrigere Plasmaspiegel bei AD wird mit einer

zerebralen Amyloid-Angiopathie und einer daraus resultierenden gestörten Eliminierung begründet [111].

#### 4.2.4.2. Amyloid Kaskaden Hypothese

Das vorherrschende Modell zur Pathogenese der AD stellt die „Amyloid Kaskaden Hypothese“ dar. Sie wurde 1991 von Hardy und Allsop [112] formuliert und gilt bis heute in modifizierter Form als grundlegender molekularer Mechanismus der AD, obwohl zunehmend auch andere Prozesse als relevant erachtet werden. Sie besagt, dass durch die fortschreitende Akkumulation von A $\beta$  eine Kaskade initiiert wird, die letztlich zu Neurodegeneration, Hirnatrophie und somit zu Demenz führt. Die erhöhte Freisetzung oder der verringerte Abbau von A $\beta$  führt zu deren Akkumulation. Aufgrund der folgenden A $\beta$ -Oligomerisierung beziehungsweise der Plaquebildung kommt es zu Neuroinflammation, Schädigung von Synapsen und einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, was wiederum zur Bildung von NFT's führt. Sowohl die durch A $\beta$  ausgelöste Neuroinflammation als auch die direkte Synapsenschädigung sowie die NFT-Bildung werden als ursächlich für neuronale Fehlfunktionen und die daraus resultierende Neurodegeneration bei AD angesehen [112–115]. Während Hardy und Higgins 1992 [115] noch annahmen, dass die A $\beta$ -Plaques die einzige neurotoxische Spezies darstellen, gilt es mittlerweile als erwiesen, dass A $\beta$ -Oligomere ebenfalls neurotoxisch sind und einen größeren Anteil an der Neurodegeneration bei AD haben [113,116].

Im Laufe der Jahre führten neu gewonnene Erkenntnisse zur Überarbeitung der Amyloid Hypothese (Abb. 7), da es sich gezeigt hatte, dass die Anzahl extrazellulärer A $\beta$ -Plaques schlecht mit dem Neuronenverlust [117] sowie mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten korrelierte [118]. Intrazelluläre A $\beta$ -Peptide, vor allem A $\beta_{42}$ , rückten in den Fokus und stellten einen zentralen Punkt der Alzheimer-Pathologie dar [119–121]. Nach dieser Hypothese stehen nicht mehr alle A $\beta$ -Peptide in Form seniler Plaques im Fokus, sondern auch die A $\beta$ -Oligomere, die auch schon in früheren Studien eine starke Korrelation mit der neurologischen Symptomatik aufwiesen [42,118,122–126].



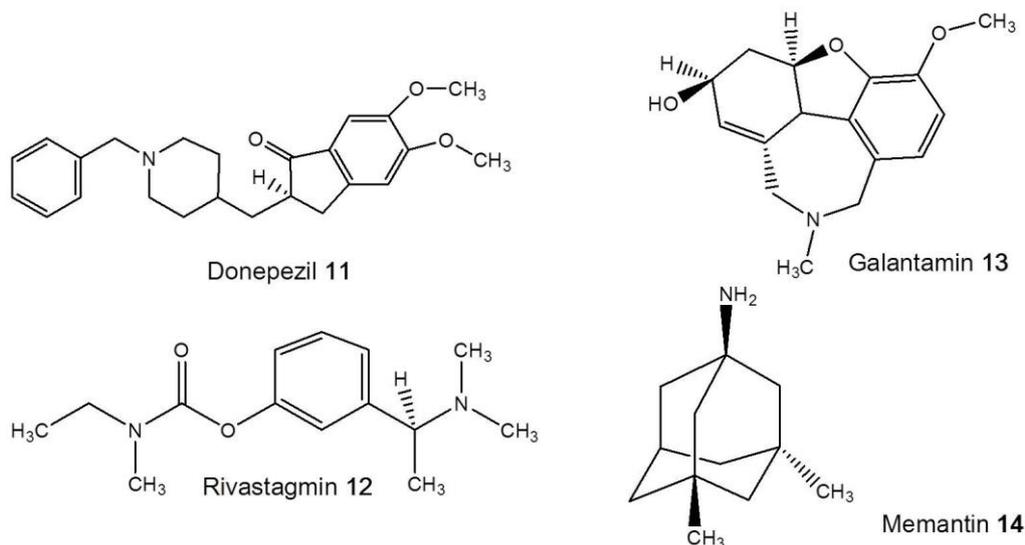
**Abb. 7:** Klassische und modifizierte Amyloid-Hypothese [[127] Seite 78]

#### 4.2.5. Derzeitige Therapieoptionen

In der Therapie der Alzheimer Erkrankung stehen bis dato lediglich symptomatische Therapieoptionen zur Verfügung.

Die bisher zugelassenen Wirkstoffe zur symptomatischen Behandlung von AD (s. Abb.8) führen ohne wesentliche Beeinflussung des zugrundeliegenden Krankheitsprogresses zu einer Besserung der kognitiven Symptomatik [128]. Diese bisher zugelassenen Antidementiva zielen allein auf das veränderte Neurotransmittergleichgewicht ab. Zur derzeitigen Behandlung stehen 3 Wirkstoffe aus der Klasse der Acetylcholinesterase-Inhibitoren (Donepezil (11), Rivastigmin (12) und Galantamin (13)) für die Behandlung der leichten bis mittelschweren AD zur Verfügung sowie der *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonist Memantin (14) zur Behandlung der mittelschweren und schweren AD (Abb.8). Tacrin (Cognex®) als frühester Vertreter der Acetylcholinesterase-Inhibitoren wurde aufgrund seiner hohen Lebertoxizität vom Markt genommen.

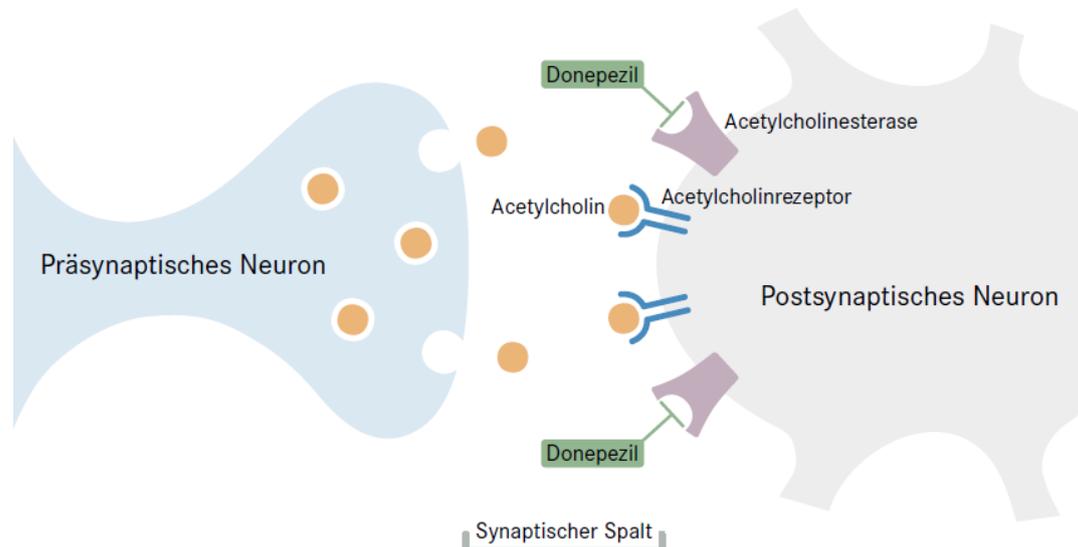
Diese Wirkstoffe führen lediglich zu Verbesserungen der kognitiven Fähigkeiten bei Patienten im frühen Stadium, bei teilweise starken Nebenwirkungen [129].



**Abb. 8:** Zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung von AD

Memantin (14), wurde im Jahr 2003 weltweit zugelassen und ist ein Antagonist des *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors. Durch die Blockierung dieses Rezeptors wird eine postsynaptische Dauerstimulation verhindert, welche durch die pathologisch gesteigerte Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt der postsynaptischen Nervenzelle entsteht. Dies reduziert Störungen der Sinneswahrnehmung und Gedächtnisleistung sowie kognitive Defizite und ein Neuronenzerfall im Sinne einer Exzitotoxizität kann verhindert werden. Insgesamt ist die Datenlage zur Wirksamkeit für Memantin schlechter als für AChE-Inhibitoren. Die durchgeführten Studien zeigten, dass es zu geringfügigen Verbesserungen von Alltagsfähigkeiten und der kognitiven Leistungsfähigkeit sowie zu einer reduzierten Pflegeabhängigkeit kommt [44]. Die Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-I) unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Selektivität für AChE. Hierbei weist Donepezil die höchste Spezifität für AChE auf [130]. Aufgrund der guten Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke ist die Konzentration von Donepezil im zentralen Nervensystem vermutlich höher als im Blut. Diese Eigen-

schaft zusammen mit der Enzymspezifität von Donepezil machen diesen zu einem zentral wirksamen AchE-Inhibitor [131]. Hierbei führt die Hemmung des enzymatischen Abbaus durch Donepezil zu einem Anstieg von ACh, wodurch es zu einer Aktivierung der cholinergen Rezeptoren kommt (Abb. 9).



Quelle: nach <http://abdellab.sutherland.ac.uk> (University of Sutherland, UK)

**Abb. 9:** Wirkmechanismus des AchE-Inhibitors Donepezil im synaptischen Spalt [132]

Infolge der cholinergen Hypothese ist die Rezeptoraktivierung für die Verbesserung der AD Symptomatik von Bedeutung [133,134]. Zur Gewährleistung des Wirkmechanismus darf Donepezil aber weder an nikotinischen noch an muskarinischen Rezeptoren eine antagonistische oder agonistische Wirkung aufweisen. Dies konnte in mehreren Studien bestätigt werden [135–138]. Für den AchE-I Donepezil konnte weiterhin eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden [139,140].

Neben den zugelassenen Antidementiva werden bei AD auch pflanzliche Arzneimittel eingesetzt. Hierbei kommen vor allem Phytopharmaka mit antidepressiven, antiinflammatorischen, antioxidativen und antipsychotischen Wirkungen zum Einsatz, da in fortgeschrittenen Stadien auch psychische Veränderungen zunehmen.

Seit vielen Jahren wird der *Ginkgo biloba* Extrakt EGb 761 zur Demenzbehandlung eingesetzt, wobei seine symptomatische Wirkung in den frühen Stadien der AD in vielen klinischen Studien belegt wurde. In Deutschland sind mehrere Phytopharmaka, die EGb 761 (Tagesdosis 240 mg) enthalten, für die Therapie der Demenz zugelassen und auch von den gesetzlichen Krankenkassen anerkannt. Sie sind deutlich nebenwirkungsärmer und preiswerter als AchE-Inhibitoren und Memantin. Ein besonders guter Therapienutzen konnte bei Patienten, die psychische Begleitsymptome wie emotionale Labilität, Anspannung oder Unruhe aufweisen, erzielt werden. Zwar reduziert EGb 761 nicht die A $\beta$ -Konzentration, dennoch verzögert der Extrakt die Progression der Symptome und wirkt antioxidativ. Ebenso konnte eine präventive Wirkung von EGb 761 beim altersabhängigen kognitiven Abbau nachgewiesen werden [141].

Weiterhin stellen Johanniskrautextrakte ein weiteres Phytopharmaka zur Behandlung oder Prävention von neurodegenerativen Erkrankungen dar. In Studien konnte unter anderem

gezeigt werden, dass es zu einer Verringerung der Plaquesgrößen beiträgt. Da diese Extrakte bereits weltweit bei milden Depressionen eingesetzt werden, sind sie hinsichtlich ihres Nebenwirkungspotentials gut untersucht [142].

#### **4.2.6. Perspektivische Therapieansätze (AD Targets)**

Zukünftig werden Wirkstoffe und Therapieverfahren, die auf die Pathophysiologie neurodegenerativer Prozesse abzielen, eine große Rolle spielen. Derzeit befinden sich zahlreiche dieser „disease-modifying agents“ mit unterschiedlichen neurochemischen Ansatzpunkten in verschiedenen Phasen der präklinischen und klinischen Entwicklung [46]. Anders als die bisherigen Antidementiva sollen diese Wirkstoffe und Therapieansätze die AD heilen bzw. deren Fortschreiten wesentlich verzögern oder zum Stillstand bringen.

Wie bereits beschrieben, gibt es für die Alzheimer-Pathologie charakteristische Strukturen, zum einem A $\beta$ -Peptide, welche zu den extrazellulären Plaques aggregieren und hyperphosphorylierte Tau-Proteine, welche intrazellulär die neurofibrillären Bündel (NFT) akkumulieren. Demzufolge stehen diese Charakteristika im Fokus perspektivischer Therapieansätze. Daher wird versucht, die Sekretion, die Modifikation, die Aggregation, den Abbau von und die Immunität gegenüber A $\beta$ -Peptiden, sowie die Phosphorylierung von Tau zu beeinflussen [21,46,106,111,143–146]. Weiterhin stehen aber auch anti-inflammatorische Therapieansätze, Neurotransmitter-Modulatoren und spezifische Membrantransporterproteine (ABC-Transporter) [147,148] sowie Apoptose-Inhibitoren und andere neuroprotektive Agenzien (z.B. Neotrofin) [149] im Fokus der perspektivischen Therapieansätze. Darüber hinaus werden aber auch Antioxidantien [150], Metallchelator-Bildner (z.B. Clioquinol) [151], Endokannabinoidoide [152], lipidsenkende Statine (z.B. Simvastatin) [153], Hormonersatz-Therapie mittels Östrogenen (z.B. Raloxifen) [154] sowie Nervenwachstumsfaktoren (Nerve growth factor, NGF) [155] als mögliche Ansätze untersucht.

Eine Auswahl der derzeitig untersuchten perspektivischen Behandlungsstrategien und Wirkstoffe mit pathophysiologischen Ansätzen sind in nachfolgender Tab. 3 zusammen gestellt.

Die auf A $\beta$  abzielenden Therapieansätze stehen im Hauptfokus bei der Suche nach kausalen Wirkstoffen und Behandlungsstrategien der Alzheimer Erkrankung.

**Tab. 3:** Perspektivischen Behandlungsstrategien und Wirkstoffe [Quellen über die angegebenen hinaus [46,146,156,157]]

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
A $\beta$	Hemmung der Amyloid-Bildung	$\alpha$ -Sekretase Aktivatoren	Bryostatin1	k.A.	[158]
			EHT 0202 [ExonHit Therapeutics]	II/IIa/IIb	[159]
			Acitretin (Soriatane, Neotigason, RO 101670) [Actavis, Allergan plc]	II (2013 abgeschlossen)	
		$\beta$ -Sekretase Inhibitor	Calpeptin	III	[160]
			Semagacestat [Eli Lilly & Co.]	III (2011 abgeschlossen)	[161]
		$\gamma$ - Sekretase Inhibitor	Flurizan (Tarenflurbil, r-flurbiprofen, MPC-7869) [Myriad Genetics & Laboratories]	III (2008 abgeschlossen, Untersuchungen zum Medikament eingestellt)	[162]
			BMS-708163 [Bristol-Myers Squibb]	II/IIa/IIb (11/2012 abgebrochen)	
			EVP-0962 [EnVivo Pharmaceuticals]	II (2013 abgeschlossen)	
		$\gamma$ -Sekretase Modulatoren (GSM)	NIC5-15 (Pinitol, D-Pinitol) [Humanetics Pharmaceuticals Corporation]	II (2013 abgeschlossen)	[163]
			CHF 5074 [CereSpir™ Incorporated, Chiesi Pharmaceuticals Inc.]	Inaktiv	
BACE1-Inhibitor	AZD3293 [AstraZeneca]	II/III			
	CNP520 [Amgen Inc., Novartis Pharmaceuticals Corporation]	II (ab 2015)			

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
A $\beta$	Hemmung der Amyloid-Bildung	BACE1-Inhibitor	RG7129 [Roche Products (Ireland)] E2609 [Biogen, Eisai Co., Ltd.] JNJ-54861911 [Janssen, Shionogi Pharma]	I (abgebrochen) II (bis 2018) II/III (2015-2024)	
		BACE1 und BACE2 Inhibitor	Verubecestat (MK-8931, MK-8931-009) [Merck] Affitope AD02 [AFFiRiS AG] Vanutide cridificar (ACC-001) [Pfizer] ADDL	III (bis 2018) II II/Ila I	[164] [165]
		Aktive Immunisierung/ Bildung A $\beta$ -Antikörper	CAD 106 [Novartis] AN-1792 (synth. A $\beta$ ) [Janssen, Pfizer] Crenezumab (MABT5102A) [Genentech] CAD106 [Novartis Pharmaceuticals Corporation] ACI-24 (Pal1-15 acetate salt) [AC Immune SA]	II/III (2015 bis 2023) II (unterbrochen) II, II (bis 2020) III I	[166] [167] [168]
		Passive Immunisierung/ Antikörper gegen A $\beta$	Bapineuzumab (AAB-003) [Janssen, Pfizer]	III (2012 abgeschlossen)	
			AAB-003 (PF-05236812) Bapineuzumab Derivate [Janssen, Pfizer]	I (2014 abgeschlossen)	
			Gammagard [Baxter Healthcare] Y2062430 GSK933776A RN1219 R1450 Solanezumab (LY2062430) [Eli Lilly & Co.]	III (abgebrochen) II/III (unterbrochen) II I I III (bis 2016)	[169]
			Octagam® Intravenöses Immunglobulin IVIg [Octapharma]	II/III (inaktiv)	[170]
			Gamunex Intravenöses Immunglobulin IVIg [Grifols Biologicals Inc.]	II/III	

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
<b>A<math>\beta</math></b>	Hemmung der Amyloid-Bildung	Passive Immunisierung/ Antikörper gegen A $\beta$	Aducanumab (BIB037) [Biogen]	III (ab 09/2015)	[171] [172] [173] [174]
			SAR228810 [Sanofi]	I	
			BAN2401 [Biogen, Eisai Co., Ltd.]	II	
			Crenezumab [Genentech]	II	
			Gantenerumab - IgG1 Antikörper [Chugai Pharmaceutical Co., Hoffmann-La Roche]	III (bis 2018/2019)	
		LY3002813 (N3pG-A $\beta$ monoclonaler Antikörper) [Eli Lilly & Co.]	I (seit 2013)		
		MEDI1814 (anti-A $\beta$ Antikörper) [AstraZeneca]	I (seit 2014)		
		Ponezumab (PF-04360365 - IgG2 $\delta$ A monoclonaler Antikörper) [Pfizer]	II (2011 abgeschlossen)		
		Hemmung/Bindung von Amyloid am „Receptor for Advanced Glycation End-products - RAGE-Inhibitor	Azeliragon (PF-04494700, TTP488) [Pfizer, TransTech Pharma, Inc.]	III (ab 04/2015)	[175]
		Nikotinsäure $\alpha$ 7-Rezeptor-Agonist	Encenicline (EVP-6124) [FORUM Pharmaceuticals Inc., Mitsubishi Tanabe Pharma]	III (bis 2016)	[176]
Abbau von Plaques	Immunisierung	$\beta$ -Amyloid-Immunglobulinapplikation	Klinisch	[177]	
(Erhöhung der $\beta$ -Amyloid-Clearance)	Herhöhung Expression des apoE-Gens	Bexaroten (Targretin) [Ligand Pharmaceuticals, Inc., ReXceptor Inc.]	II (2014 abgeschlossen)	[178]	
Reduktion	ABC-Transporter / ABCC1-Aktivator	Thiethylperazin		[179]	
		Hopfen Extrakte Johanniskraut Extrakte		[180] [141]	

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle	
A $\beta$	Reduktion	ABC-Transporter / ABCC1-Aktivator	Baldrian Extrakte Curcumin Flavonoide aus <i>Crataegus oxyacantha</i>	II/Ia/IIb	[181] [182] [183]	
		GnRH-Agonist	Leuprorelin	II	[184]	
		GLP-1 Agonists	Liraglutide [Novo Nordisk A/S]	II/Ia/IIb	[185,186]	
	Hemmung der Amyloid-Oligomerisierung	Anlagerung an $\beta$ -Amyloid/ Verhinderung $\beta$ -Faltblattstruktur	„Beta-Sheet-Breaker			[187]
		Bindung an lösliches A $\beta$	Tramiprosat / Alzhemed [Neurochem, Inc.]	III (inactive)		
		Metallionenchelator	PBT2 [Prana Biotechnology Limited]	II/Ia/IIb	[188,189]	
		Zerstörung $\beta$ -Faltblattstruktur	Huperzin A [Debiopharm Group, Neuro-Hitech, Inc.]	IIb (inaktiv)	[190]	
			ELND005 (AZD-103) [Elan Corporation, Speranza Therapeutics]	II (abgeschlossen)	[191,192]	
	<b>Modifikation der A<math>\beta</math>-Peptide</b>	<b>Inhibierung QC / Hemmung der N-terminalen Zyklisierung</b>	PQ912 [Probiodrug AG]	<b>II (seit 2015)</b>	[193]	

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
Tau	Hemmung der Neurofibrillenbildung	Tau-Aggregationshemmer	TRx0237 (Methylenblau) [TauRx Therapeutics Ltd]	III (bis 2015)	[194]
		Taukinasehemmer	Peptid NAP	II	[195]
		Tau-Anti Antikörper	MC1	k.A.	[196]
	Stabilisierung Mikrotubuli		Epothilone D (BMS-241027) [Bristol-Myers Squibb]	I (2013 abgeschlossen)	[197]
	Inhibierung Mikrotubuli Polymerisation	Reduktion Thr231 phosphoryliertes Tau	Nicotinamide (Vit.B3)	II/IIa/IIb	[198]
	Reduktion Tau Oligomerisation und Neurofibrillen Degeneration	aktiver Impfstoff, um Immunantwort gegen pathologisch veränderte Formen von Tau hervorzurufen	AADvac-1 Impfstoff (Axon Peptid 108 konjugiert an KLH) [Axon Neuroscience SE]	I (10/2015 abgeschlossen) II ab 12/2015 – 2018	
Inflammatorisch	Hemmung der Amyloid-Bildung	Modulierung $\gamma$ -Sekretase-Aktivität	NSAIDs Celecoxib (Celebrex) [Pfizer]	III (2007 abgeschlossen)	[199]
	Reduzierung A $\beta$	Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- Antagonist (PPAR $\gamma$ ) TNF- $\alpha$ Rezeptor Inhibitor	Rosiglitazon [GlaxoSmithKline] Etanercept (Enbrel) [Pfizer] Thalidomid [Celgene Corporation]	eingestellt II (abgeschlossen) II/III (inaktiv)	[200] [201] [202]

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
Inflammatorisch	Verlangsamt AD		Dapsone (Avlosulfon, Diaminodiphenylsulfone, DDS) [Immune Network Ltd.]	II/IIa/IIb (inaktiv)	
	Reduzierung A $\beta$ 42 und Tau		Ibuprofen	IV (eingestellt)	[203]
		Stimulation Mikroglia Phagozytose und Inhibierung Mikroglia Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12	GC 021109 [GliaCure]	I (2014-2015)	
		COX-1 und COX-2 Inhibitor	Naproxen (Aleve, Anaprox, Naprosyn) ist NSAID [Procter & Gamble, Roche]	eingestellt	
Neurotransmitter	Modulatoren Glutamatrezeptor-Subtypen	Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPA)-Rezeptoren	CX516 (Ampalex, Ampakine) [Cortex Pharmaceuticals, Inc.]	II (2005 abgeschlossen)	
	Steigerung von cGMP	Inhibitor der Phosphodierase 9A	BI 409306 (SUB 166499) [Boehringer Ingelheim]	II (bis 2017)	
	AchE-I; Glutamatregulation	$\alpha$ -7 Nicotinic acetylcholine Receptor ( $\alpha$ 7-nAChR)	Huperzin A [Debiopharm Group, Neuro-Hitech, Inc.] Encenicline [EnVivo Pharmaceuticals]	IIa (inaktiv) III	[204] [205]
	AchE-I, NMDA-Modulatoren		Dimebolin [Medivation, Inc.]	III (inaktiv) als Antihistaminikum zugelassen	[206]
	Ach und Glutamat-Release	Glutamat-Modulator	Riluzole [Sanofi]	II	
		Selekt. 5-HT <sub>14</sub> -Antagonist	Lecozotan [Pfizer]	III	[207]
	$\alpha$ 4 $\beta$ 2 neuronaler Nicotinsäure-Acetylcholine-Receptor-Agonisten	Varenicline [Pfizer]	IIa/IIb (unterbrochen)	[208]	

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
Neurotransmitter	Modulator Glutamatfreisetzung und postsynaptic Glutamat-Rezeptor-Signal	$\alpha$ 2c Adrenalin Receptor Antagonist	ORM-12741 [Orion Pharma]	II (bis 2017)	[209]
		Serotonin 6 Receptor (5-HT <sub>6</sub> ) Antagonist	PF-05212377 [Pfizer] Idalopirdine (Lu AE58054) [Eli Lilly & Co.] RVT-101 (SB-742457, GSK 742457) [Axovant Sciences Ltd.]	II (bis 2016) III (bis 2015/2016) III (ab 2015/2016)	[210]
		Dopamin Receptor D2 Partialagonist	Brexpiprazole (OPC 34712) [Lundbeck, Otsuka Pharmaceutical Co.]	III (bis 06/2017)	
Andere	Reduktion IL-6; Hemmung $\alpha$ - und $\beta$ -Sekretase	HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	Simvastatin [Merck]	III (inaktiv)	[211]
	Hormonelle Therapieansätze	Progesteron und Glukokortikoid-Antagonist	Mifepriston	III	
	neuroprotektive Wirkung	Abnahme von TNF $\alpha$ und IL-6 bei gleichzeitiger Zunahme des IL-1 $\beta$	MAP Kinase Inhibitors CNI-1493 Neotrofin [NeoTherapeutics, Inc.]	k.A. k.A. (unterbrochen)	[212] [213]
	Förderung Nervenzellenwachstum	Förderung Stabilität und Funktion der Nervenzellen Nervenzellwachstumsfaktoren (NGF)	Cerebrolysin [Ebewe Pharmaceutical]	II (2009 abgeschlossen)	[214]
			CERE-110 [Ceregene, Inc.]	I (2010 abgeschlossen) II (inaktiv)	[155]
	Antioxidant	Bindung freier Radikale	Vit. E	III	[215]
	Reduktion A $\beta$ 42 und 40; A $\beta$ -Toxizität	Erhöhung „ketone body beta-hydroxybutyrate (BHB)“	AC-1204 (Caprylsäure) [Accera, Inc.]	II (bis 2016/17)	[216]
	Schutz der Neuronen vor A $\beta$ -induzierte Neurotoxizität	n.b.	T-817MA [Toyama Chemical Co., Ltd.]	II (2011 abgeschlossen)	
Reduktion A $\beta$ Akkumulation	Dihydropyridin-Kalziumkanalblocker	Nilvadipine (Nilvad, Nivadil, ARC029) [Archer Pharmaceuticals, Inc.]	III (bis 2017)		

Ansatz	Ziel	Wirkprinzip/ Wirkungsprofil	Wirkstoff (Synonym) [Unternehmen]	Phase	Quelle
Andere	Förderung sAPP $\alpha$ Freisetzung	$\alpha$ 4 $\beta$ 2 nicotinic (nAChR) receptor activator	AZD1446 [AstraZeneca, Targacept]	II/IIa/IIb (unterbrochen)	[217]
	Protektive Wirkung / Reduktion Ca-Einstrom	L-Typ Kalzium-Kanal-Antagonist	MEM 1003 [Memory Pharmaceuticals Corporation]	II/IIa/IIb (abgebrochen)	[218]
	Neuroprotektiv	SIRT1 activating agent verhindert A $\beta$ -induzierten Granulat Zellverlust Inhibierung A $\beta$ Aggregation & Inhibierung Tau Aggregation	Resveratrol	III	[219,220]
			T-817MA [Toyama Chemical Co., Ltd.]	II/IIa/IIb	[221]
			Curcumin (Longvida) [Verdure Sciences] / Trad. Medizin	II (2007)	[181,222,223]
		Omega-3-Fettsäuren DHA und EPA [Martek Biosciences Corporation, NeuroBioPharm, Inc.]	IV (bis 2019)		

#### 4.2.6.1. Therapieansatz: Hemmung der QC

Die QC (EC 2.3.2.5) gehören zur Klasse der Acyltransferasen (EC 2.3.2). Sie katalysieren die intramolekulare Zyklisierung N-terminaler Glutaminreste von Peptiden und Proteinen zu Pyroglutaminsäure (5-Oxoprolin) unter der Abspaltung von Ammoniak, sowie die intramolekulare Zyklisierung N-terminaler Glutamatreste ebenso zu Pyroglutaminsäure (5-Oxoprolin) jedoch unter Abspaltung von Wasser.

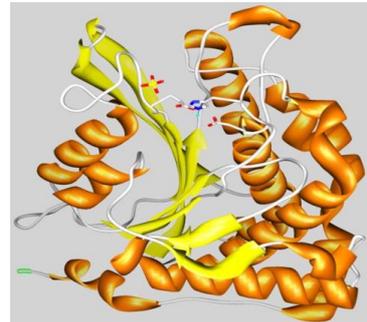


Abb. 10: Ribbondarstellung der humanen QC: [[234] Seite: 13118]

Aus dem Latex der tropischen Pflanze *Carica papaya* konnten Messer und Mitarbeiter den ersten Vertreter dieser Enzymklasse isolieren und charakterisieren [224,225]. In den achtziger Jahren wurde eine ähnliche enzymatische Aktivität im Hypophysengewebe von Säugetieren beobachtet [226,227]. In den nachfolgenden Jahren konnte an Hand von Sequenzvergleichen gezeigt werden, dass Glutaminylzyklasen sowohl in Pflanzen und Vertebraten, als auch in Bakterien und Insekten vorkommen [228]. Eine Einteilung der QC's kann in zwei Gruppen erfolgen, wobei in einer ersten Gruppe neben den Vertebraten- und Insekten-QC's auch die Glutaminylzyklasen der Hefen zusammengefasst werden können. Die Glutaminylzyklasen der Pflanzen, Bakterien und Protisten lassen sich einer zweiten Gruppe zuordnen [229,230]. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen von PQC (Papaya QC) und der aus cDNA abgeleiteten Sequenz der hQC (humane QC) lassen sich keinerlei Homologien erkennen [231,232]. Jedoch weisen sie ähnliche Spezifitäten und katalytische Eigenschaften auf [233]. So katalysieren die Glutaminylzyklasen aus der Pflanze *Carica papaya* und die in der Hefe *Pichia pastoris* exprimierte hQC's die Zyklisierung von Glutamyl- und Glutaminylresten. Begründet ist dies in einer konvergenten Evolution der Glutaminylzyklasen, bei der die Enzyme unterschiedliche Strukturen und physiologische Funktionen ausgebildet haben [228]. Untermauert werden konnte diese These durch die Klärung der Tertiärstrukturen beider Enzyme [229,234]. Auf der Basis von Sequenzvergleichen verschiedener Glutaminylzyklasen konnten weitere Hinweise auf Verwandtschaftsbeziehungen aufgezeigt und die Einteilung in die oben genannten zwei Gruppen untermauert werden. So weisen die Glutaminylzyklasen der Pflanze *Carica papaya* sowie der Bakterien *Myxococcus xanthus*, *Corynebacterium glutamicum* und *Zymomonas mobilis* eine 30% größere Sequenzübereinstimmung im Vergleich zur Gruppe der tierischen QC's auf [230,235]. Ein enges Verwandtschaftsverhältnis tierischer QC's konnte zu den bakteriellen zinkabhängigen Aminopeptidasen aufgezeigt werden [236].

So ist auch die hQC ein zinkabhängiges Metalloenzym, welches hauptsächlich in den Lymphozyten, im Gehirn und Knochenmark sowie in verschiedenen peripheren Drüsen beispielsweise der Hypophyse, der Schilddrüse und dem Thymus exprimiert wird [226,233].

Das Enzym (Abb. 10) ist ein aus 361 Aminosäuren bestehendes, monomeres Glycoprotein mit einer molekularen Masse von ~ 40 kDa [236,237].

Eine  $\alpha/\beta$  globuläre Domäne mit einem zentralen achtsträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das von  $\alpha$ -Helices umgeben wird, bildet die Tertiärstruktur des Enzyms [233]. Im aktiven Zentrum der hQC ist ein Zinkion gebunden. Dies ist vermutlich für die Protonierung der  $\gamma$ -Amidgruppe

verschiedener Substrate verantwortlich und nimmt somit eine wichtige Rolle bei der Katalyse im aktiven Zentrum des Enzyms ein [238].

Die Katalyse der QC erfolgt über einen nicht kovalenten Mechanismus, für dessen Funktion eine  $\alpha$ -Aminogruppe des Substrates essentiell ist und kann in drei Stufen eingeteilt werden. In der ersten Stufe erfolgt ein nucleophiler, intramolekularer Angriff auf die  $\gamma$ -C=O Gruppe des Substrates durch den Stickstoff der  $\alpha$ -Aminogruppe. Während in der zweiten Stufe ein Protonentransfer von der  $\alpha$ -Aminogruppe auf die Amidgruppe erfolgt, kommt es in der letzten Stufe zur Freisetzung von Ammoniak (bzw. Wasser bei Glutamat) [239].

Die physiologische Funktion tierischer QC, begründet in ihrer Eigenschaft zur Pyroglutamatbildung (Abb. 11) bei spezifischer intrazellulärer Lokalisation, ist vermutlich für die Modifizierung von peptidischen Hormonen und Neurotransmittern verantwortlich.

Für einige Peptide, wie z.B. das Gonadotropin-releasing Hormon

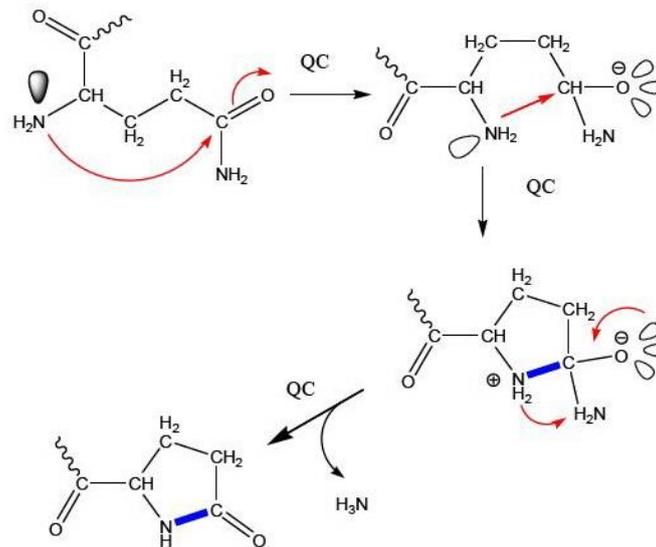


Abb. 11: Mechanismus der Zyklisierung [235]

(GnRH), das Thyrotropin-releasing Hormon (TRH) oder Monocyte Chemotactic Protein-2 (MCP-2), konnte gezeigt werden, dass der Pyroglutamat-Rest essentiell für ihre biologische Wirkung ist. So führt eine Veränderung des N-Terminus, z.B. durch Nicht-Zyklisierung des Glutamins, zu einem Verlust der Bindung der Hormone an ihre spezifischen Rezeptoren bzw. zum Unterbleiben einer zellulären Reaktion [240–242].

Auch bewirkt die Pyroglutamylation eine Erhöhung der Stabilität der Hormone, da der Peptid-N-Terminus durch die Bildung des Pyroglutamyl-Lactam-Ringes seine basischen Eigenschaften verliert. Aufgrund des Verlustes des für viele Aminopeptidasen essentiellen Erkennungsmerkmals ist der N-Terminus gegenüber unspezifischer Proteolyse weitestgehend resistent.

Somit liegt eine Beteiligung der QC an der Synthese von regulativen Peptiden und damit eine essentielle Rolle im Hormonanabolismus und der Steuerung körpereigener Regelkreisläufe nahe [6].

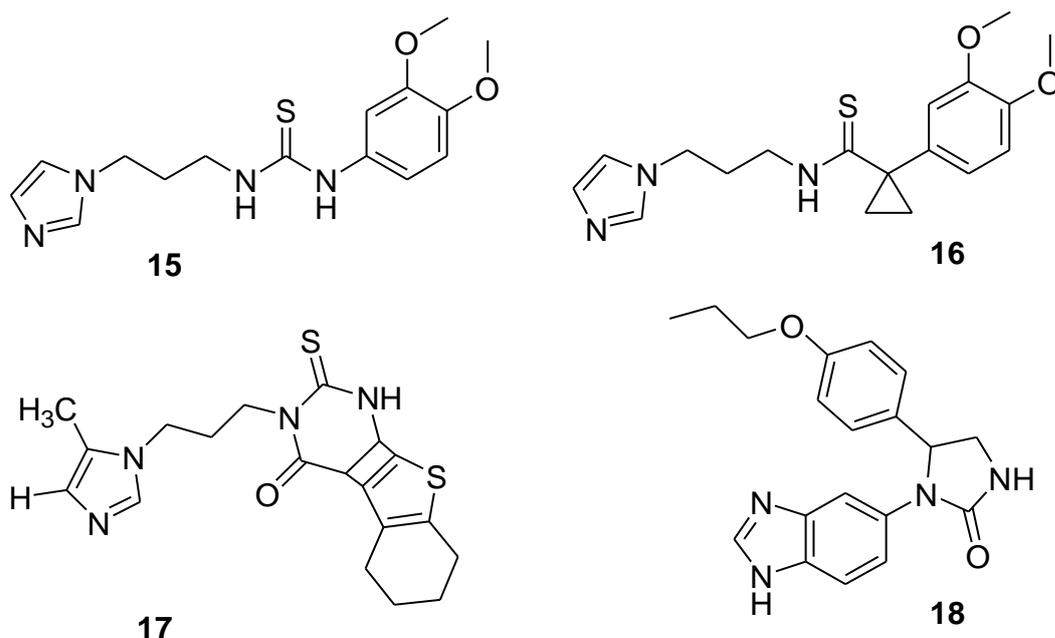
Ebenso konnte die hQC pathophysiologisch mit verschiedenen Krankheiten wie z.B. rheumatischer Arthritis, Osteoporose und Morbus Alzheimer (AD) in Verbindung gebracht werden [243,244].

Bei der Bildung von pGlu-modifizierten  $A\beta$ -Peptiden, einem Hauptbestandteil der senilen Plaques bei AD, werden die Glutaminreste am N-Terminus der  $A\beta$ -Peptide durch QC zu Pyroglutamyresten (pE) modifiziert. Hierdurch erhöht sich ihre proteolytische Resistenz gegenüber einem N-terminalen Abbau durch Aminopeptidasen und es kommt zu dem Verlust der N-terminalen Ladung. So sind die pGlu-modifizierten  $A\beta$ -Peptide hydrophober und aggregieren schneller als  $A\beta_{40/42}$ . Die  $A\beta_{3(pE)-40/42}$ -Fragmente stellen dabei eine Art Kristallisationskeim

dar, welcher zur Selbst- bzw. Co-Aggregation mit  $A\beta_{1(pE)-40/42}$  führt [245–248]. Weiterhin sind sie neurotoxisch [107,127,249], wobei eine direkte Neurotoxizität in Zellkultur-Experimenten und in transgenen Tieren nachgewiesen werden konnte [7,107,108,127,250–252]. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die QC die Zyklisierung zu pGlu-modifizierten  $A\beta$ -Peptiden katalysiert [106,108,228,253,254]. So führte die orale Applikation von QC-Inhibitoren in zwei verschiedenen transgenen Alzheimer Maus-Modellen sowie einem Drosophila Modell zu einer verminderten  $A\beta_{3(pE)-42}$ -Belastung. Weiterhin zeigte die Behandlung der Mäuse eine Reduktion von  $A\beta_{x-40/42}$ -Peptiden und eine verminderte Plaque- und Gliosen-Bildung sowie eine verbesserte Leistung im Gedächtnistraining und räumlichen Lerntests. Weitere Arbeiten, die die Rolle der QC in AD-Mausmodellen untersuchten, zeigten, dass QC entscheidend zur Modulation des  $A\beta_{pE3-42}$  Levels *in vivo* beiträgt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von QC im Cortex von Alzheimer Patienten hochreguliert ist und mit dem Vorhandensein von pE-modifizierten  $A\beta$ -Peptiden korreliert. In einer Arbeit von Kreuzberger, 2015 wird die schichtspezifische Verteilung von QC im temporalen Kortex und der hippocampalen Formation von Alzheimerpatienten und Kontrollen vergleichend untersucht und ein direkter Zusammenhang zwischen der Überexpression von QC und der Vulnerabilität betreffender Neuronenpopulationen gezeigt. Darüber hinaus bestätigt diese Arbeit die These, wonach QC und pE- $A\beta$  das Potential haben, nach axonalem Transport eine Kaskade in efferenten Hirnregionen zu initiieren, an deren Ende der Verlust von Nervenzellen steht [5].

Die Inhibierung der QC stellt einen kausalen Ansatz in der Behandlung der AD, sowie weiterer Erkrankungen, die mit Proteinaggregation und (Neuro) Entzündungen assoziiert sind, dar [104,106,255–257].

In den letzten Jahren wurden verschiedene QC-Inhibitoren (Abb. 12) in der Literatur, vorrangig in Patenten der Probiodrug AG [258–272] beschrieben.



**Abb. 12:** Auswahl bisher beschriebener QC-Inhibitoren: 15, 16 [238], 17 [273], 18 – QC-Inhibitor PQ912 [274]

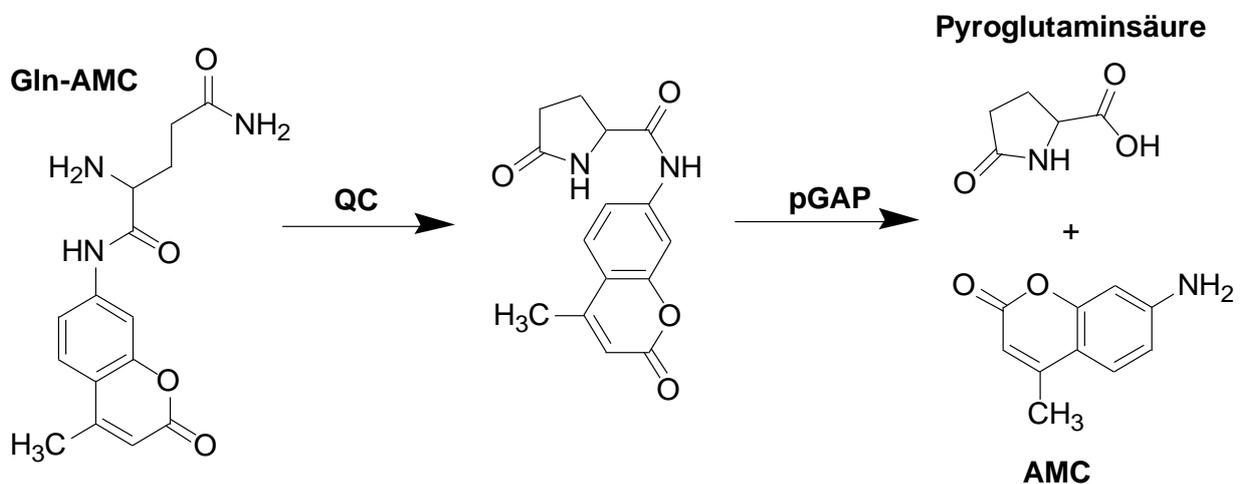
In Arbeiten von Buchholz und Mitarbeitern konnten Thioharnstoff-Derivate und Imidazol-Propyl-Thioamide als effektive humane QC-Inhibitoren identifiziert werden [238]. Die *in vitro*

und *in vivo* Testung der Imidazolderivate als QC-Inhibitoren führten zur Reduktion der pE-A $\beta$ - und Gesamt-A $\beta$ -Last sowie zu Verbesserungen der kognitiven Leistungsfähigkeit in transgenen Mausmodellen [7,104,106,108,253,255].

Basierend auf einem Homologie-Model des Enzyms wurden weitere QC-Inhibitoren entwickelt [273]. Der QC-Inhibitor PQ912 für die Behandlung von AD befindet sich derzeit in der klinischen Entwicklung. Die klinische Studie Phase 1 mit Einzel- (SAD) und steigenden Mehrfachdosen (MAD) wurde bereits erfolgreich durchgeführt [254,274]. Die klinische Studie Phase 2 begann im Jahr 2015 [157]. Alle bisher beschriebenen QC-Inhibitoren wurden mittels verschiedener Methoden (Synthese, Structure Based Design, Bioisosteric Replacement, Ligand-based Drug Design) im Rahmen eines „Drug design“ erzeugt. Bisher sind keine QC-Inhibitoren aus natürlichen Quellen (Naturstoffe) beschrieben.

Um die katalytischen Eigenschaften von QC's ermitteln zu können ist die kontinuierliche Darstellung des Reaktionsverlaufs bei der Zyklisierung N-terminaler Glutaminreste zu Pyroglutaminsäure notwendig.

Hierfür kann ein kontinuierlicher Assay, basierend auf der Umsetzung des freien Ammoniaks durch die Zyklisierung der N-terminalen Glutaminreste, sowie der Umsetzung eines gebildeten Pyroglutamatpeptides mit Pyroglutaminylaminopeptidase (pGAP) angewendet werden [233,275]. Bei dieser Methode wird das fluorogene Substrat Glutaminyl-7-amino-4-methylcoumarin (Gln-AMC) von der zugegebenen QC am Glutaminrest zyklisiert. Das dabei entstehende Intermediat Pyroglutaminyl-amino-methyl-coumarin wird anschließend mittels eines zugegebenem Hilfsenzym, der Pyroglutaminylaminopeptidase (pGAP), in Pyroglutaminsäure und Aminomethylcoumarin (AMC) gespalten (Abb. 13). Die Abspaltung der fluorogenen Gruppe führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz [276].



**Abb. 13:** Enzymatischer QC-Assay: Als Substrat dient Gln-AMC, welches durch die QC zyklisiert wird, so dass pGlu-AMC unter der Abspaltung von Ammoniak entsteht. Anschließend wird das Intermediat durch die pGAP in Pyroglutaminsäure und 7-Amido-4-methylcoumarin (AMC) gespalten, welches photometrisch nachgewiesen werden kann [6,275].

Die Anwendung dieses spektralphotometrischen Assays reicht von der Identifizierung der Aktivität von QC in verschiedenen Geweben, über die Quantifizierung der Enzymaktivität während der Proteinreinigung, bis hin zu Substratspezifitätsstudien und Screeningansätzen für potentielle Inhibitoren [275]. Ein Nachteil besteht jedoch in der begrenzten Auswahl an fluorogenen Substraten, wie Gln-pNA, Gln-AMC und Gln- $\beta$ NA. Vorteile des gekoppelten En-

zymtests mittels pGAP ist die Unempfindlichkeit gegenüber Verunreinigungen durch z.B. Ammonium-Ionen sowie die Stabilität und Aktivität über einen breiten pH-Bereich und eine hohe Spezifität zu fluorogenen Substraten [6].

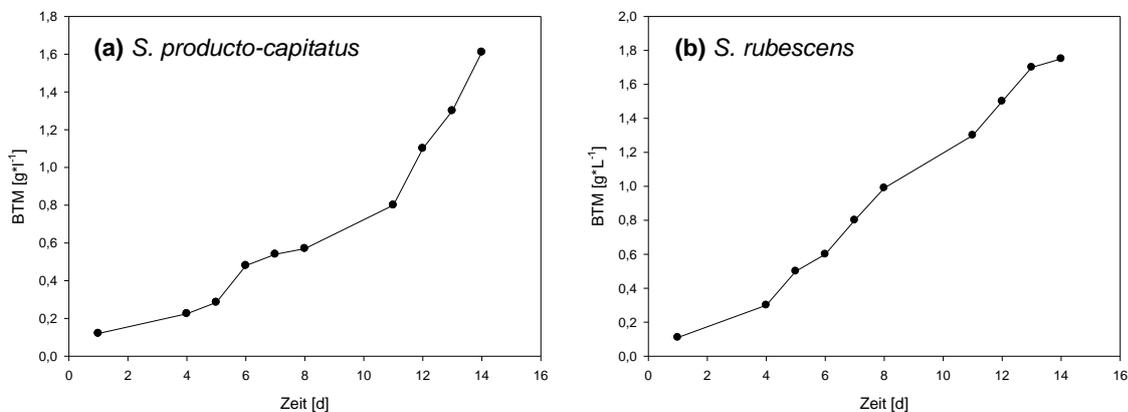
Eine weitere Assay-Methode beruht auf der Kopplung der QC-katalysierten Reaktion mit dem Hilfsenzym Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und dem Substrat  $\alpha$ -Ketoglutarat. Hierbei überträgt die GDH die bei der Pyroglutamat-Bildung freiwerdenden Ammoniumionen auf das  $\alpha$ -Ketoglutarat, unter gleichzeitiger Oxidation von NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup>. Die Reduktion des Cofaktors NADH/H<sup>+</sup> führt zu einer Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm. Obwohl diese Nachweismethode unabhängig von Fluorophoren ist und somit ein größeres Spektrum an verschiedenen Substraten ermöglicht, ist der Assay aufgrund der geringen Konzentration an freigesetzten Ammoniak sehr störanfällig gegenüber Salzionen [6].

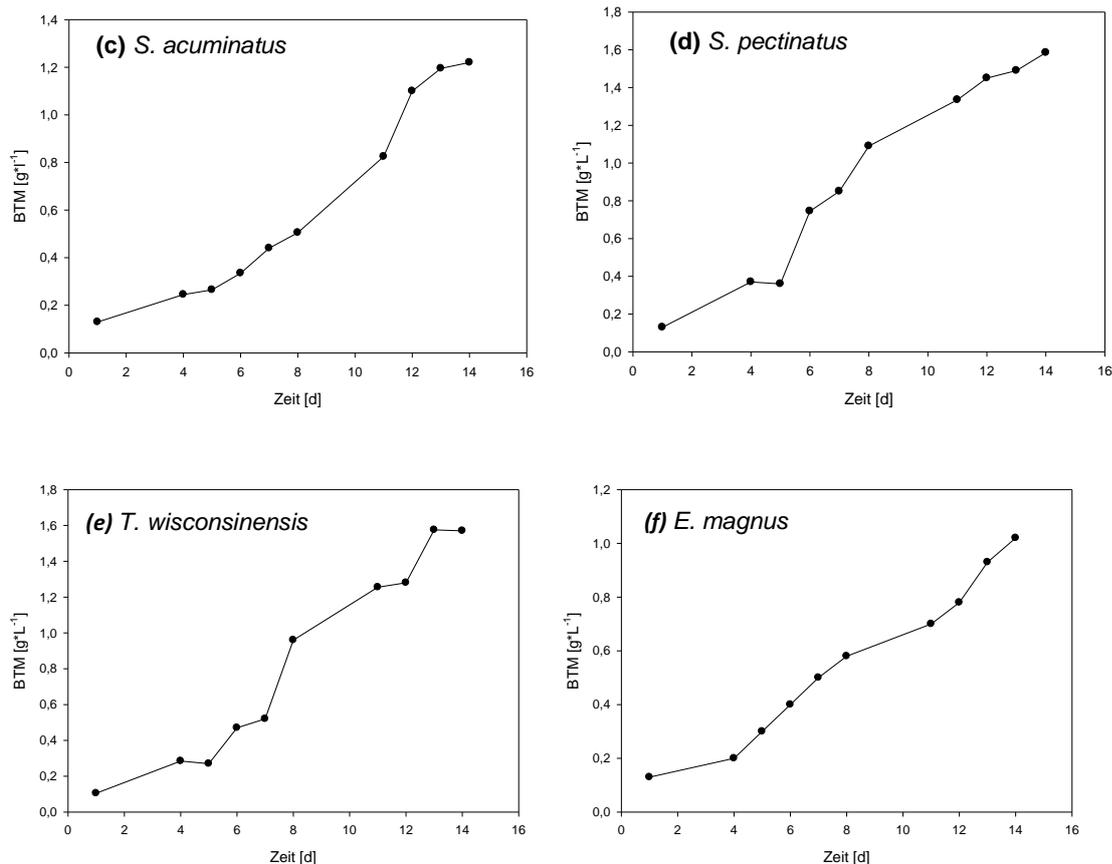
## 5. Ergebnisse & Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollen erstmals QC-inhibierende Verbindungen aus Algen identifiziert, charakterisiert und isoliert werden. Die Identifizierung erfolgt ausgehend von den Rohextrakten kultivierter Mikroalgen. Da die Identifizierung bioaktiver Verbindungen aus komplexen Algenextraktgemischen einen zeitaufwendigen und schwierigen mehrstufigen Prozess darstellt, erfolgt eine Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA). Die Methodik von AcorA basiert auf der Korrelation von physikochemischen Daten wie z.B. massenspektroskopischen Daten mit Testergebnissen aus biologischen Assays mit Hilfe von chemoinformatischen Methoden. Hierfür wurden die QC-Inhibierungen der Extrakte mit dem QC-Assay bestimmt sowie diese massenspektrometrisch mittels hochauflösender ESI-FTICR-MS und UPLC-ESI-MSn analysiert. Ausgehend von den MS-Daten sowie weiteren gezielten massenspektrometrischen Fragmentierungsuntersuchungen erfolgte die strukturelle Charakterisierung der QC-inhibierenden Verbindungen. Abschließend wurden die identifizierten QC-inhibierenden Verbindungen aus dem methanolischen Extrakt isoliert und auf ihre QC-Aktivität untersucht.

### 5.1. Kultivierung der Mikroalgen

Die Mikroalgen *Scenedesmus producto-capitatus* (*S. producto-capitatus*), *Scenedesmus rubescens* (*S. rubescens*), *Scenedesmus acuminatus* (*S. acuminatus*), *Scenedesmus pectinatus* (*S. pectinatus*), *Tetradesmus wisconsinensis* (*T. wisconsinensis*) und *Eustigmatos magnus* (*E. magnus*) wurden zunächst in 2 L Blasensäulenreaktoren kultiviert. Hierbei erfolgte eine Adaption der Algen an das Kultivationsmedium „Setlik-Medium“, welches bei den Kultivierungen zur Biomassegewinnung im 100 L Photobioreaktor (PBR) eingesetzt werden sollte. Für alle Algen wurde eine Kultivations Temperatur von 28°C gewählt. Unter diesen Kultivierungsparametern sowie einer Lichtintensität von 120  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\text{s}$  und einer kontinuierlichen Begasung mit Luft, welcher 2%  $\text{CO}_2$  zugesetzt wurde, erfolgte die Aufnahme von Wachstumskurven aus den Biomassekonzentrationen der Algen. Die Wachstumskurven der kultivierten Algen sind in der nachfolgenden Abb. 14 (a-f) graphisch dargestellt.





**Abb. 14:** Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (BTM) während der Kultivierung von (a) *S. producto-capitatus*, (b) *S. rubescens*, (c) *S. acuminatus*, (d) *S. pectinatus*, (e) *T. wisconsinensis* und (f) *E. magnus*

Die Wachstumsdiagramme (Abb. 14 a-f) zeigen, dass sich bei jeder Spezies vom 1. bis 2. Tag eine lag-Phase und ab dem 3. Tag eine Wachstumsphase einstellt. Die Wachstumsphase verlief bei den einzelnen Spezies mit unterschiedlicher Biomassezunahme. Die Algen *T. wisconsinensis*, *S. rubescens* und *S. acuminatus* gingen ab dem 13. Tag in die stationäre Wachstumsphase über. Die Alge *S. rubescens* wies nach 14 Tagen die höchste Biotrockenmassekonzentration von 1,75 g/L auf. Die geringste Biomassekonzentration wurde bei der Alge *E. magnus* mit 1,02 g/L ermittelt.

Die spezifischen Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  sind in nachfolgender Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Ermittelte spezifischen Wachstumsraten  $\mu_{\max}$

Mikroalge	Wachstumsraten $\mu_{\max}$ [d <sup>-1</sup> ]
<i>S. producto-capitatus</i>	0,14
<i>S. rubescens</i>	0,16
<i>S. acuminatus</i>	0,11
<i>S. pectinatus</i>	0,12
<i>T. wisconsinensis</i>	0,14
<i>E. magnus</i>	0,08

Wie aus Tab. 4 ersichtlich, wies *E. magnus* unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen die geringste spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  und *S. rubescens* die höchste auf.

Um Algenbiomasse der Wachstumsphase und der stationären Phase für die Durchführung der Untersuchungen in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurden die Algen in einem 100 L tubularen PBR (Abb. 15) kultiviert. Dieser tubulare PBR unterscheidet sich sowohl in seiner Geometrie als auch in der Durchmischung, Begasung und Temperierung von den im Labormaßstab verwendeten Blasensäulenreaktoren. Die Lichtintensität des 100 L PBR ist vom Reaktorsystem vorgegeben, so dass eine Lichtintensität von  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  bis zu einem OD von 20 und eine Lichtintensität  $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  bis zum Kultivationsende genutzt wurde. Es handelt sich somit um kein *scale up* vom Labormaßstab in den 100 L Technikumsmaßstab. Lediglich die Kultivierungsparameter Medium und Temperatur konnten übertragen werden.

Nach Inokulation des 100 L Photobioreaktor (Abb. 15) mit Algenbiomasse aus 2 L Blasensäulenreaktoren wurden die Kultivierungen gestartet. Es erfolgte eine inline Messung der Temperatur, pH-Wert, OD und der Pumpendrehzahl, welche online über den gesamten Kultivierungszeitraum mittels der Software MFSC win aufgezeichnet und als Plot visualisiert wurden. Die Wachstumskurven wurden anhand der online gemessenen OD-Werte über den gesamten Kultivierungszeitraum



**Abb. 15:** Kultivierung der Mikroalge *S. acuminatus* im 100 L Photobioreaktor

aufgenommen. Nach einer kurzen lag-Phase setzte bei allen Spezies die exponentielle Wachstumsphase (WP) am 2. Tag ein und verlief mit unterschiedlicher Biomassezunahme. Die Ernte der Biomasse aus der Wachstumsphase erfolgte zwischen dem 7. – 10. Tag. Für die Gewinnung der Biomasse der stationären Wachstumsphase wurde der Kultur nach der Ernte neues Nährmedium zugeführt und die Kultivierung fortgeführt (fed-batch – Verfahrensweise). Nach Erreichen der stationären Phase (SP), welche algenspezifisch zwischen dem 9. – 14. Tag einsetzte, wurden die Biomassen mittels Zentrifugation geerntet und die Kultivierungen beendet.

### 5.2. Extraktion und Extraktaufarbeitung

Die beiden Verfahren (einstufige Extraktion (e) und mehrstufige Extraktion (m)) gestatteten die Extraktion der nach dem Zellaufschluss zugänglichen intrazellulären Metaboliten der verschiedenen Algenbiomassen in den Lösungsmitteln *n*-Hexan, Methanol und Wasser auf Basis einer Fest-Flüssig-Extraktion. Somit wurden 72 Extrakte der zu untersuchenden Mikroalgen gewonnen.

Die Bezeichnung dieser Extrakte wurde wie folgt vorgenommen:

*Spezies* + Extraktionsverfahren (e oder m) + Wachstumsphase

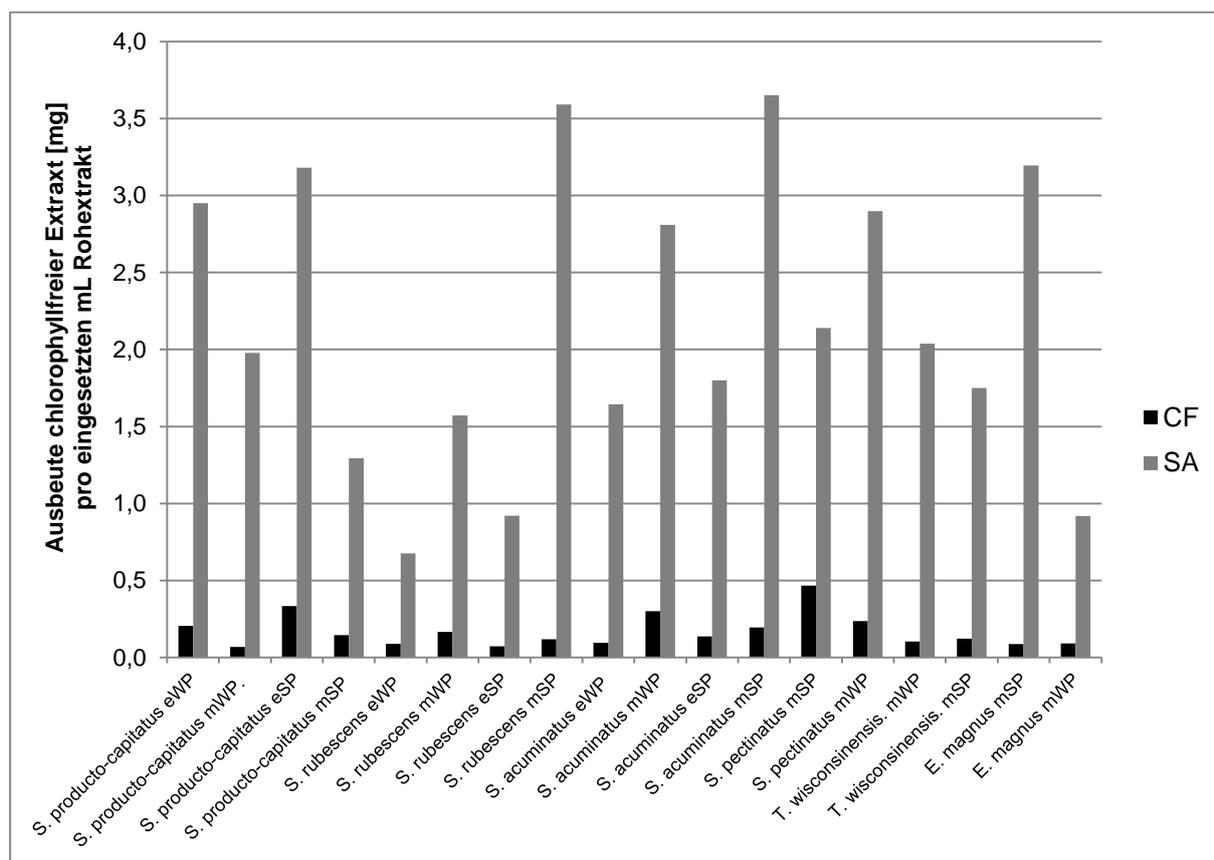
(WP-exponentielle Wachstumsphase oder SP-stationäre Wachstumsphase)

Die Extraktausbeuten der *n*-Hexan-Extrakte lagen im Durchschnitt zwischen 0,02g/g<sub>BTM</sub> – 0,07 g/g<sub>BTM</sub>, die der Methanol-Extrakte zwischen 0,09 g/g<sub>BTM</sub> – 0,52 g/g<sub>BTM</sub> und die der Wasser-Extrakte zwischen 0,08 g/g<sub>BTM</sub> – 0,1 g/g<sub>BTM</sub>. Die geringsten Extraktausbeuten wurden für die Mikroalge *Eustigmatos magnus* erhalten.

Da die methanolischen Algenextrakte hohe Gehalte an Chlorophyll aufwiesen, war es für die Durchführung der Bioassays sowie für chromatographische und massenspektrometrische Analysemethoden im Rahmen der vorliegenden Arbeit notwendig, das Chlorophyll aus den Extrakten zu entfernen.

Zu diesem Zweck wurden zwei Methoden zur Chlorophyll-Entfernung im Hinblick auf Ausbeute, Reproduzierbarkeit und Zeitaufwand erprobt.

Hierbei wurden zum einen eine Chlorophyll-Fällung (CF) sowie eine Chlorophyll-Entfernung mittels Festphasenextraktion unter Verwendung von SA-Kartuschen (SA) (Macherey & Nagel) vergleichend durchgeführt. Die Extraktherstellung erfolgte aus jeweils 10 g BTM. Nach Trocknung wurden die ausgewogenen Extrakte in 400 mL Methanol rückgelöst und hiervon jeweils 100 mL Extrakt für die Chlorophyll-Entfernungen eingesetzt. Im nachfolgenden Diagramm (Abb. 16) sind die Extraktausbeuten nach durchgeführter CF und SA jedes Extraktes dargestellt.



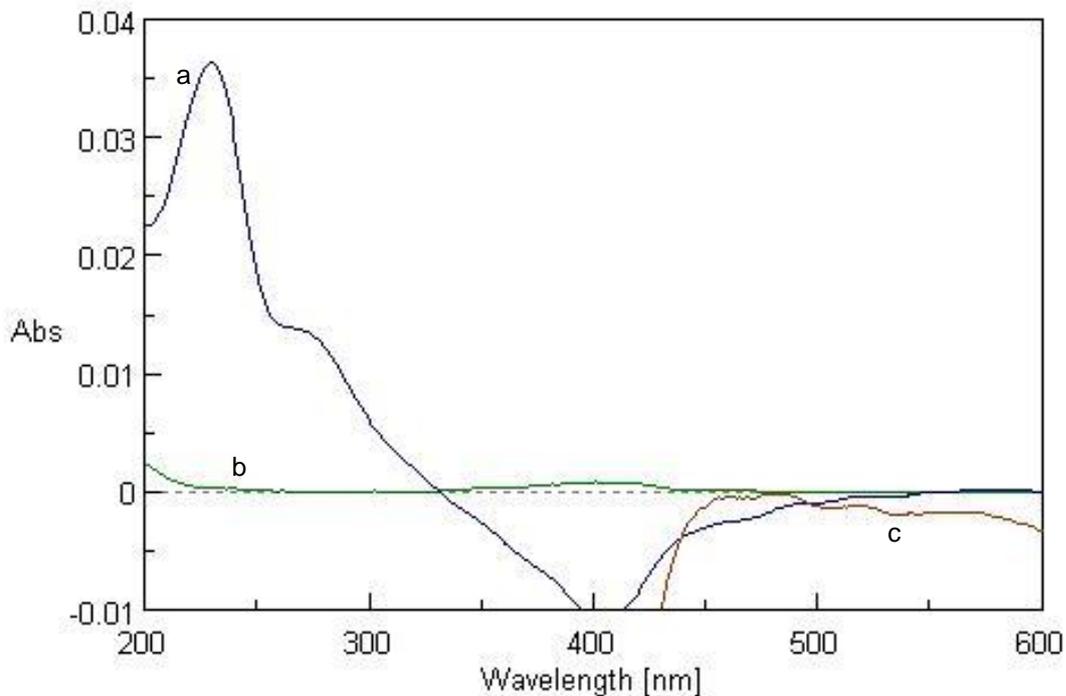
**Abb. 16:** Extraktausbeuten nach Chlorophyll-Fällung (CF) und SA-Kartuschen (SA) pro 1 mL methanolischen Extrakt [KHS\_001 / KHS\_015]

Wie aus der Graphik (Abb. 16) ersichtlich, waren die Extraktausbeuten nach durchgeführter Chlorophyll-Fällung sehr gering, bei sehr hohem zeitlichem Arbeitsaufwand. So konnten ausgehend von 2,5 g Algentrockenbiomasse nach Gewinnung eines methanolischen Rohex-

traktes mit einer Konzentration von 43,18 – 52,71 mg/L im Durchschnitt nur 6,6 – 46 mg chlorophyllfreier, methanolischer Extrakt gewonnen werden.

Die Ausbeuten nach Chlorophyll-Entfernung mittels SA-Kartuschen lagen im Vergleich bis zu 36-mal höher. Darüber hinaus gestaltet sich die Anwendung dieser Methode als sehr zeiteffektiv und einfach. Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt dieser Methode ist die Reproduzierbarkeit, da industriell gefertigte Kartuschen verwendet wurden.

Um zu ermitteln, ob die chlorophyllfreien Extrakte in den Bioassays getestet werden können, wurden exemplarisch die Absorptionsspektren des methanolischen Rohextraktes, des methanolischen Extraktes nach Chlorophyll-Fällung sowie des methanolischen Extraktes nach Chlorophyll-Eliminierung mittels SA-Kartuschen von *T. wisconsinensis* eSP aufgenommen und in Abb. 17 dargestellt.



**Abb. 17:** UV/VIS-Spektrum ( $\lambda = 200-600$  nm) des methanolischen Rohextraktes (a), des methanolischen Extraktes nach Chlorophyll-Fällung (b) und des methanolischen Extraktes nach Chlorophyll-Eliminierung mittels SA-Kartuschen (c) von *T. wisconsinensis* eSP [KHS\_115]

Die Absorptionsspektren in Abb. 17 zeigen, dass der chlorophyllfreie methanolische Extrakt nach Verwendung der SA-Kartuschen (c) im Vergleich zum methanolischen Rohextrakt (blau) bei den für den QC-Assay spezifischen Emissions- und Absorptionswellenlängen von  $\lambda = 380$  nm und  $\lambda = 460$  nm keine Absorptionsmaxima aufweisen und somit die photometrischen Messungen im Bioassay nicht beeinträchtigt.

### 5.3. Screening der Algenextrakte auf QC-inhibierende Eigenschaften

Die Algenextrakte wurden auf ihre Aktivität als Enzyminhibitoren von Glutaminylyklyasen im von der Firma Probiobdrug AG entwickelten QC-Enzym-Assay untersucht.

Aufgrund der Besonderheiten der Algenextrakte (Färbung, Lösungsmittel *n*-Hexan und Methanol, teilweise Trübung der wässrigen Extrakte) war es notwendig, eine Reihe von Voruntersuchungen zur Durchführung und Optimierung des QC-Assays vorzunehmen.

So wurden z.B. Voruntersuchungen durchgeführt, um einen Einfluss der Hemmung des Hilfsenzym pGAP auf den Gesamtansatz auszuschließen. Hierfür erfolgte die Überprüfung der Messergebnisse des QC-Assays vom *S. producto-capitatus* SP Extrakt bei drei verschiedenen pGAP Konzentrationen. Das Hilfsenzym wurde in den Verdünnungen 1:10, 1:25 und 1:50 im Ansatz eingesetzt. Eine Erhöhung der pGAP-Konzentration, bei gleich bleibenden Messbedingungen, führte zu keiner Veränderung der Restaktivitäten der QC, so dass ein Einfluss der Hemmung des Hilfsenzym auf den Gesamtansatz ausgeschlossen werden konnte [277].

#### 5.3.1. Parameterbestimmung für den QC-Assay

Vor dem Screening der Algenextrakte im QC-Assay, wurden die enzymkinetischen Parameter der Glutaminylyklyase sowie deren Toleranz gegenüber den verwendeten Lösungsmitteln bestimmt [277].

##### 5.3.1.1. Michaelis-Menten Konstante $K_m$

Die Michaelis-Menten-Konstante wurde bestimmt, um die Konzentration an Gln-AMC zu ermitteln, bei der ein optimaler Reaktionsverlauf und ein linearer Anstieg der Zeit-Umsatz-Kurven über den gesamten Messzeitraum von 27 Zyklen gewährleistet werden konnte. Dabei gibt der  $K_m$ -Wert die Konzentration an Substrat an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit der halben maximalen Geschwindigkeit  $V_{max/2}$  entspricht. Ebenfalls entscheidend ist die Menge an Glutaminylyklyase im Assay, so dass die Enzymkonzentration vor dem Einsatz im Assay ermittelt wurde. Die Ermittlung der Halbsättigungskonstante für die hQC erfolgte im Konzentrationsbereich von  $5,0 \cdot 10^{-6}$  -  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M i.A.. Hierbei wurde ein  $K_m$ -Wert von  $(5,9 \pm 0,10) \cdot 10^{-5}$  M bestimmt. Der ermittelte  $K_m$ -Wert für das Substrat Gln-AMC lag hierbei etwas unter den in der Literatur beschriebenen Werten von  $5,4 \pm 0,20 \cdot 10^{-4}$  M [233].

##### 5.3.1.2. Einfluss der Lösungsmittel

Um ein Ausfallen von Substanzen im unpolaren *n*-Hexan-Extrakt aufgrund der veränderten Polarität im Assay zu verhindern, wurde als Lösungsvermittler DMSO eingesetzt. In nachfolgenden Untersuchungen wurde somit die Toleranz der Glutaminylyklyase gegenüber DMSO und dem weiterhin zum Einsatz kommenden Lösungsmittel MeOH ermittelt.

Hierfür wurden Verdünnungsreihen der Lösungsmittel in zehn 1:2 Verdünnungen ausgehend von 40 % DMSO bzw. MeOH (maximale Konzentration) untersucht.

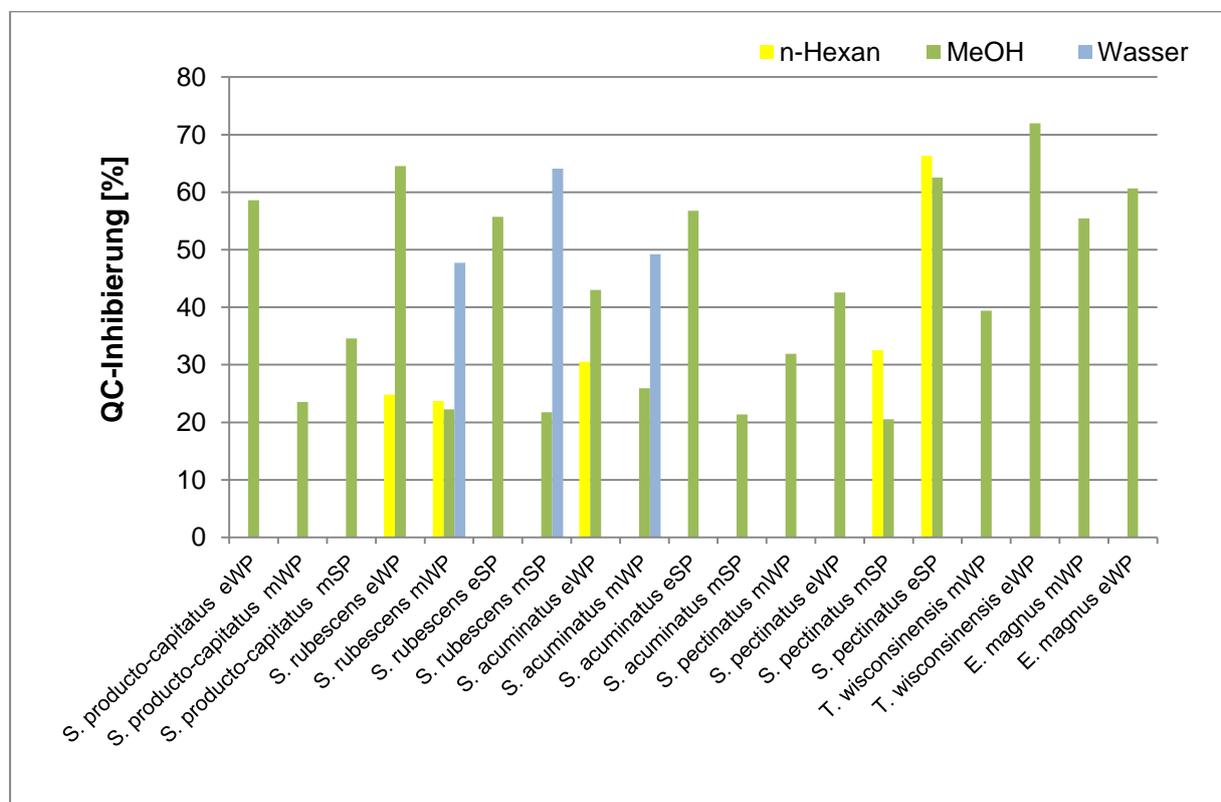
Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass eine DMSO Konzentration bis 2,5 % und eine Methanol-Konzentration bis 20 % keinen inhibierenden oder anderweitig störenden Einfluss auf die hQC haben.

Daher erfolgten die Messungen der *n*-Hexan-Extrakte mit 2,5 % DMSO i.A. und der Methanol-Extrakte mit 20 % i.A..

### 5.3.2. QC-inhibierende Wirkungen der Algenextrakte

Das Screening der Algenextrakte im QC-Assay erfolgte mit einer Extraktkonzentration von 1 mg/mL (0,2 mg/mL i.A.).

In der nachfolgenden Abb. 18 sind die Inhibierungen der QC aller positiv getesteten Extrakte (> 20 % Inhibierung) graphisch dargestellt.



**Abb. 18:** Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Extrakte; als positiv definiert Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung mit einer Standardabweichung < 5%

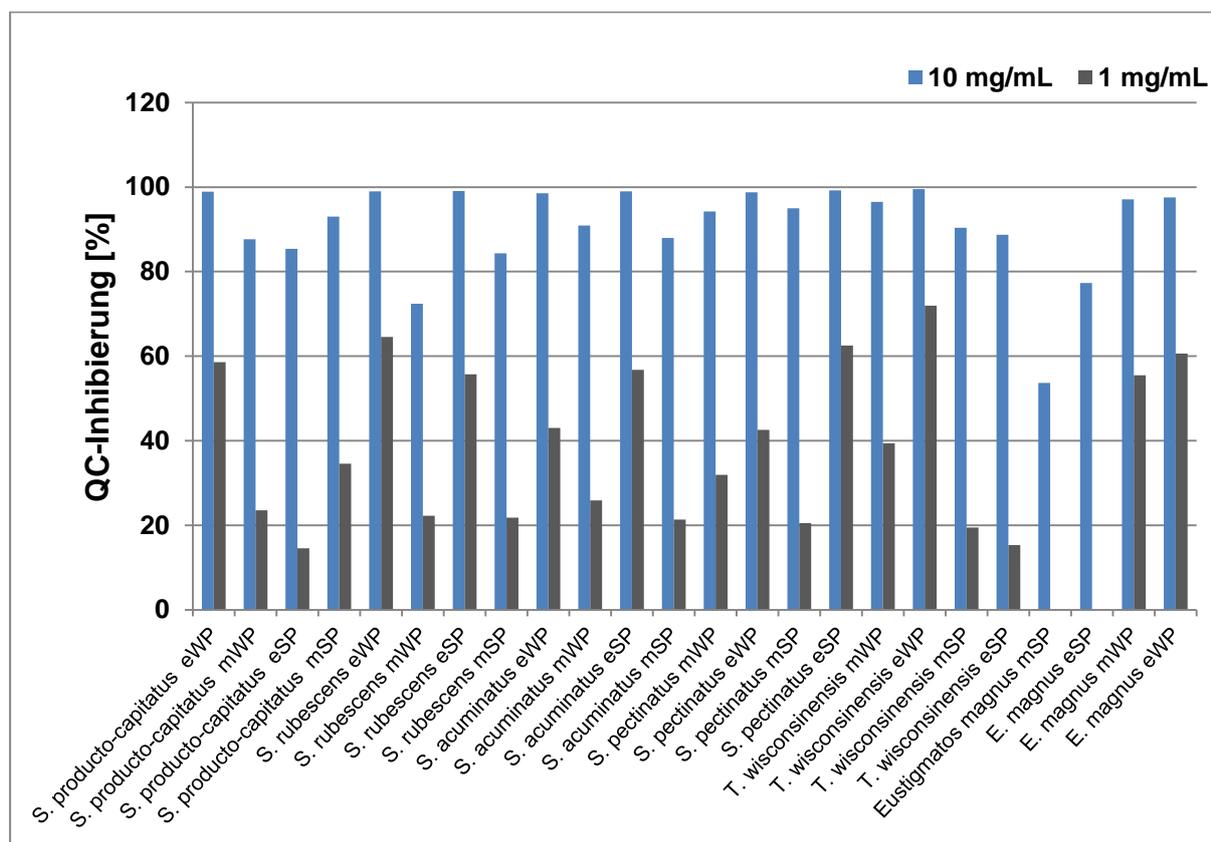
Insgesamt konnten 27 (38 %) der 72 getesteten Extrakte die QC inhibieren. Die Extrakte der Wachstumsphase waren aktiver als die Extrakte der stationären Phase. Insgesamt konnten 10 Extrakte die Enzymaktivität der QC über 50 % inhibieren. Die methanolischen Extrakte stellten dabei die aktivste Klasse dar.

Daher wurden für die Identifizierung von QC-inhibierenden Verbindungen die methanolischen Extrakte herangezogen und die weiteren Untersuchungen ausschließlich mit den methanolischen Extrakten durchgeführt.

### 5.3.2.1. Untersuchung der konzentrationsabhängigen QC-Inhibierung

Es wurde untersucht, ob die Inhibierungen der QC durch die methanolischen Extrakte, abhängig von der Konzentration der eingesetzten Extrakte sind, und es sich somit um spezifische Hemmungen handelt.

Hierfür wurden die methanolischen Extrakte in einer 10-mal höheren Konzentration von 10 mg/mL, was einer Konzentration von 2 mg/mL i.A. entsprach, im QC-Assay getestet (Abb. 19).



**Abb. 19:** Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der methanolischen Extrakte in den Konzentrationen 10 mg/mL (blau) und 1 mg/mL (schwarz) ermittelt aus Dreifachbestimmungen mit einer Standardabweichung <5%

Wie aus Abb. 19 ersichtlich wird, führte eine Erhöhung der Extraktkonzentration zur Steigerung der QC-Inhibierung in allen Methanol-Extrakten. Es handelt sich somit um eine konzentrationsabhängige Inhibierung der QC-Aktivität.

### 5.4. Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten

Die Identifizierung bioaktiver Verbindungen in komplexen Extraktgemischen ist ein aufwendiger Prozess, der mittels bioaktivitätsgeleiteter Isolierung oder High-Throughput-Screening realisiert werden kann. In den letzten Jahren bietet darüber hinaus auch die computergestützte Erfassung des Zusammenhanges zwischen chemischer Zusammensetzung und Bioaktivität einen alternativen Ansatz für das Auffinden bioaktiver Verbindungen aus komplexen Gemischen. Neben den ersten Bioaktivitätsvorhersagemethoden mittels „quantitative composition-activity relationship (QCAR) [278] wurden in den vergangenen Jahren verschiedene multivariate Analysemethoden, wie z.B. die Hauptkomponentenanalyse (principal compo-

nents analysis, PCA), die Hauptkomponentenregression (principal components regression, PCR) und die Partial Least Squares Analyse (PLSA) zur Identifizierung bioaktiver Verbindungen angewendet [279–281]. Der Nachteil dieser Methoden besteht jedoch darin, dass der Anwender für die Verarbeitung der Daten und die Durchführung der chemoinformatischen Analysen sehr gute Kenntnisse auf dem Gebiet der multivariaten Statistik besitzen muss.

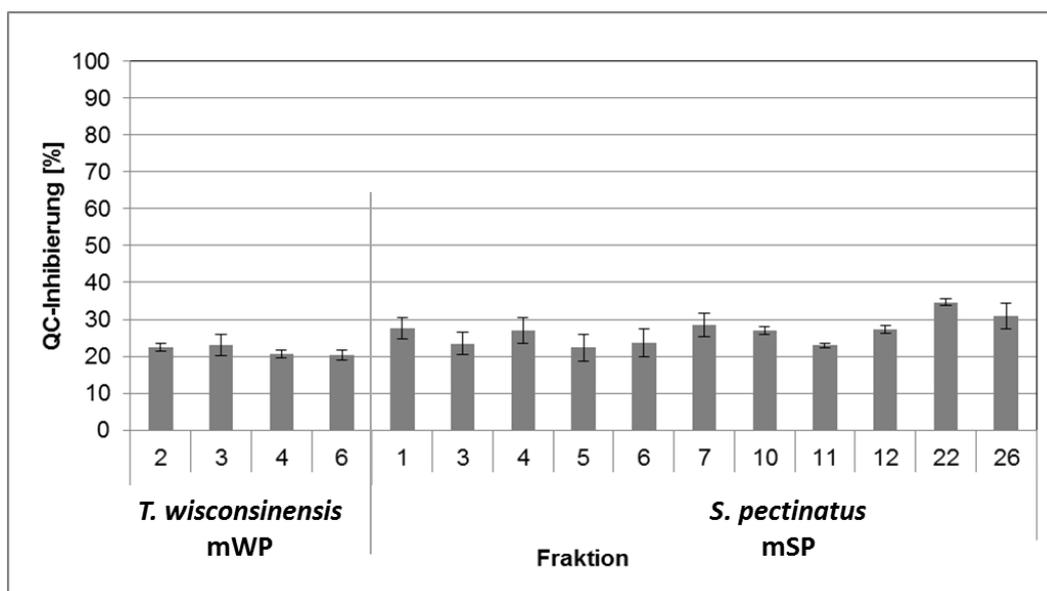
#### 5.4.1. Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten mittels bioaktivitätsgeleiteter Isolierung

Die bioaktivitätsgeleitete Isolierung (bioassay guided isolation) beruht auf einer sukzessiven Auftrennung eines Extraktes in Fraktionen und Unterfraktionen, wobei diese parallel zur Auftrennung, die z.B. chromatographisch erfolgen kann, in Testsystemen (Bioassays) zur Bestimmung biologischer oder pharmakologischer *in-vitro*-Aktivitäten getestet werden.

Die Auftrennung der aktivsten Fraktionen weiter in ihre Unterfraktionen erfolgt mit dem Ziel, die für die Wirkung der Ausgangsextrakte verantwortlichen biologisch aktiven Substanz oder Substanzklasse aus den immer kleiner werdenden Unterfraktionen zu isolieren [282].

Die bioaktivitätsgeleitete Isolierung der QC-inhibierenden Verbindungen erfolgte ausgehend von den chlorophyllfreien methanolischen Extrakten. Hierfür wurden die im QC-Assay als „aktiv“ getesteten methanolischen Extrakte *S. producto-capitatus* mSP, *S. rubescens* mWP, *S. pectinatus* mSP und *T. wisconsinensis* mWP mittels HPLC fraktioniert und die entstandenen Fraktionen auf ihre QC-inhibierende Aktivität getestet.

Die chromatographische Auftrennung der Extrakte (2 mg) wurde zunächst im analytischen Maßstab an einer RP-18 Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min unter Verwendung eines Gradientensystems aus Acetonitril/Wasser (s. Kap. 6.8.1 / HC1) über einen Zeitraum von 40 min durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte alle 90 s in Deepwell-Platten. Insgesamt wurden somit 135 Fraktionen der 5 QC-aktiven Extrakte erzeugt. Jede Fraktion wurde anschließend gedrittelt um eine Dreifachbestimmung im QC-Assay durchzuführen.



**Abb. 20:** Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Fraktionen; als positiv definiert Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung [KHS\_018 und KHS\_019]

Wie die Abb. 20 zeigt, konnten lediglich Fraktionen der aufgetrennten Extrakte von *S. pectinatus* mSP und *T. wisconsinensis* mWP die QC inhibieren.

Aufgrund der höchsten QC-Inhibierungen von 34,65 % bzw. 30,8 % erfolgte die weitere chromatographische Fraktionierung der **Fraktionen 22** und **26** von *S. pectinatus* mSP.

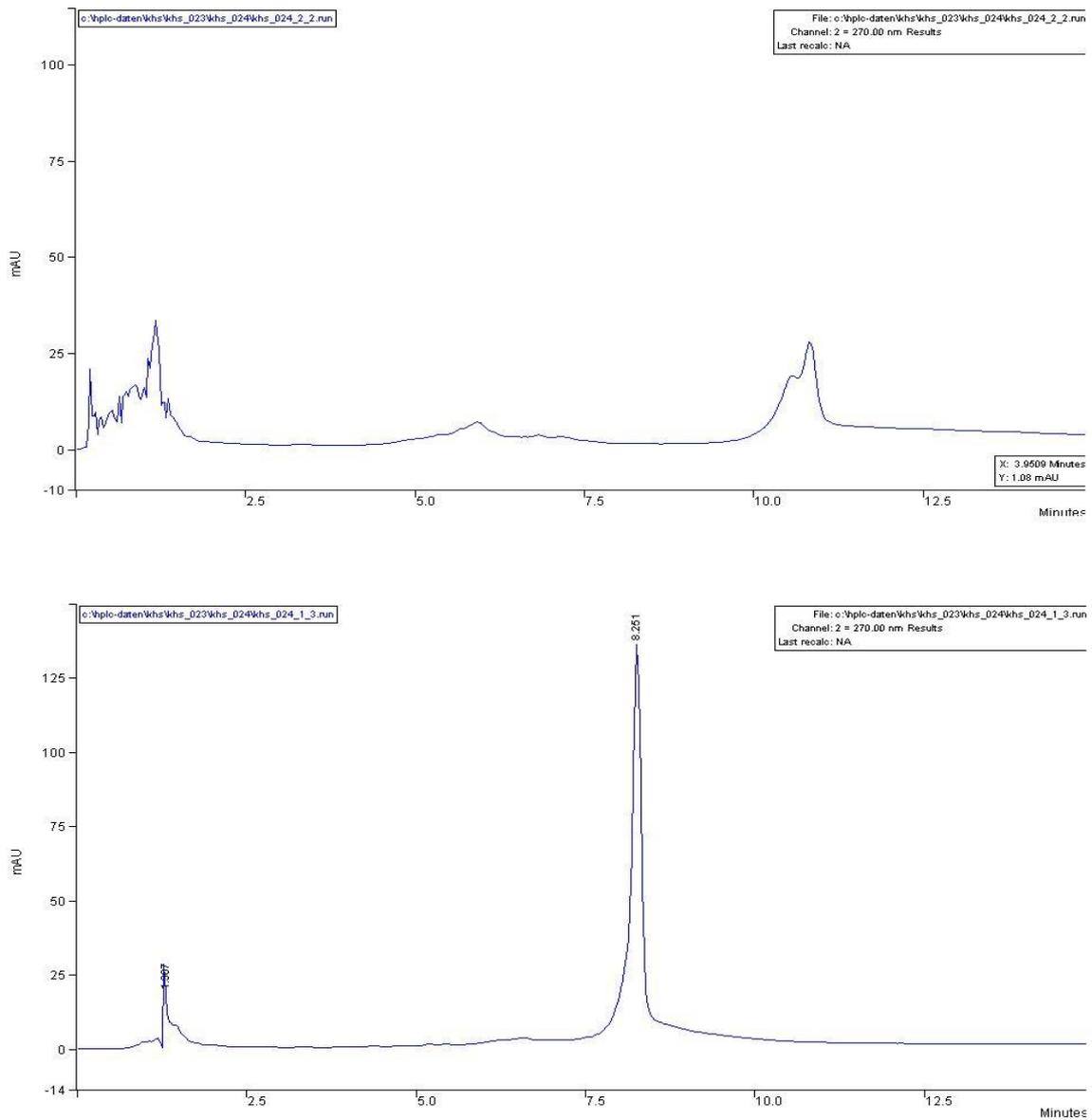
Um ausreichend Substanzmenge für die weitere Subfraktionierung der QC-aktiven Fraktionen 22 und 26 zu erhalten, wurde eine erneute Fraktionierung des *S. pectinatus* mSP Extraktes im semipräparativen Maßstab durchgeführt [KHS\_020]. Hierfür wurden 50 mg des Extraktes ebenfalls an einer RP-18 – Säule mittels HPLC aufgetrennt und fraktioniert (s. Kap. 6.8.1 / HC2). Für weitere Aufreinigungsschritte standen somit 1,2 mg von **Fraktion 22** [KHS\_020\_22] und 1,7 mg von **Fraktion 26** [KHS\_020\_26] zur Verfügung.

### **Fraktion 22**

Zunächst erfolgte die weitere chromatographische Auftrennung der **Fraktion 22** [KHS\_021\_1] ebenfalls mittels HPLC an einer RP-18 Säule, mit einer Flussrate von 1 mL/min, unter Verwendung eines Gradientensystems aus Acetonitril/Wasser (s. Kap. 6.8.1 / HC1) über einen Zeitraum von 40 min. Die Fraktionierung erfolgte wiederum alle 90 s in Deepwell-Platten. Die Extraktmenge von 1,2 mg wurde in jeweils 2 HPLC-Läufen unter Einsatz von 0,6 mg Probenauftragsmenge aufgetrennt. Die Chromatogramme beider HPLC-Läufe zeigten jeweils 2 Peaks im Retentionszeitbereich von 27,01 – 30,00 min und 30,01 – 33,00 min, so dass die Fraktionen F19 und F20 sowie F21 und F22 zu **Unterfraktion 1** [KHS\_021\_1/1] und **Unterfraktion 2** [KHS\_021\_1/2] vereint und die übrigen Fraktionen verworfen wurden.

**Unterfraktion 1** [KHS\_021\_1/1] und **Unterfraktion 2** [KHS\_021\_1/2] wurden mittels HPLC an einer RP-18 Säule, unter Verwendung eines Gradientensystems aus Acetonitril/Wasser (s. Kap. 6.8.1 / HC1) über einen Zeitraum von 35 min weiter chromatographisch aufgetrennt.

## 5. Ergebnisse & Diskussion



**Abb. 21:** oben: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 1 [KHS\_024\_2]; unten: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 2 [KHS\_024\_1]

Wie aus beiden Chromatogrammen in Abb. 21 zu ersehen ist, konnten sowohl bei der Trennung der Unterfraktion 1 (links) als auch bei Unterfraktion 2 (rechts) jeweils ein Peak detektiert werden. Bei anschließender Testung der Unterfraktion 1\_1 [KHS\_024\_2/2] mit einer Retentionszeit (RT) von 10,4 min und der Unterfraktion 2\_1 [KHS\_024\_2/2] mit einer RT von 8,25 min im QC-Assay, konnten keine QC-Inhibierungen mehr detektiert werden. Auch die massenspektrometrischen Analysen (LC-MS/MS und ESI-MS) der beiden Unterfraktionen erbrachten keine Hinweise auf die QC-inhibierenden Substanzen bzw. Substanzklassen der des aktiven Ausgangsextraktes.

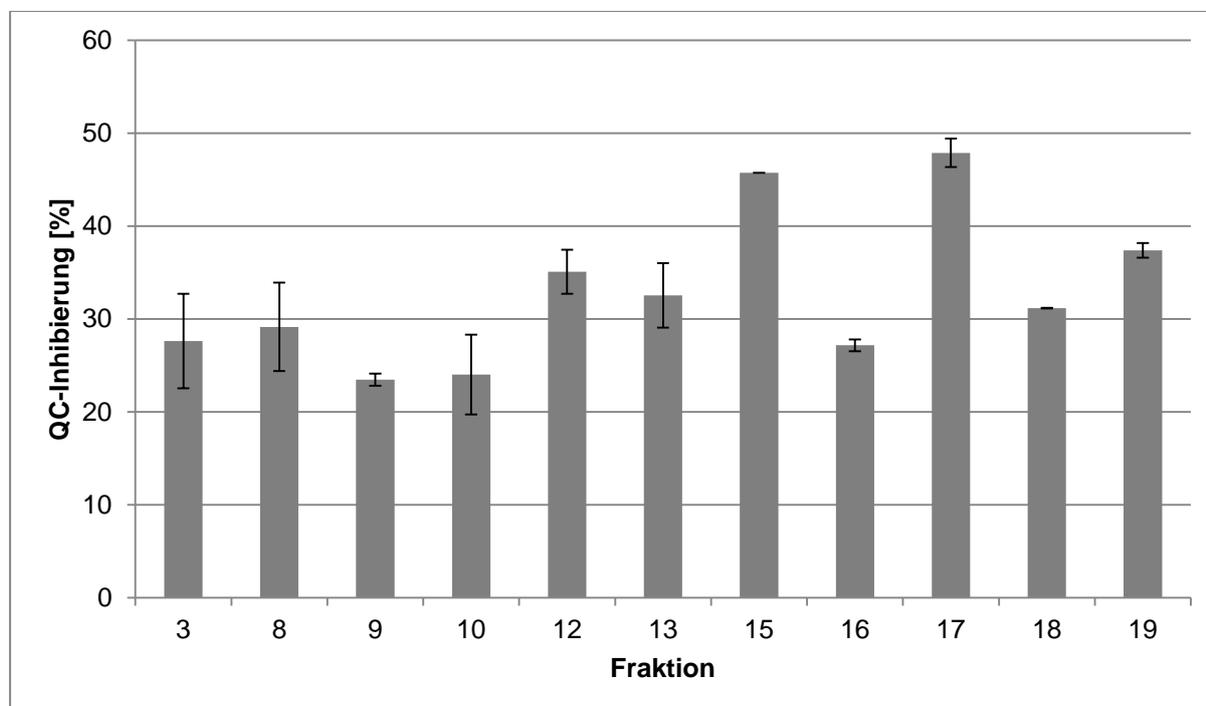
### **Fraktion 26**

Analog zu **Fraktion 22** wurde auch **Fraktion 26** mittels HPLC an einer RP-18 Säule (s. Kap. 6.8.1 / HC1) getrennt und alle 90 s in Deepwell-Platten fraktioniert [KHS\_023]. In den durchgeführten HPLC-Läufen konnten jeweils zwei Peaks mit RT von 20,80 min (F1) und 23,03 min (F2) detektiert werden.

Die anschließende Testung der beiden Unterfraktionen 1 und 2 zeigte keine QC-inhibierenden Aktivitäten.

Da die Isolierung der QC-inhibierenden Verbindungen weder aus der aktiven Fraktion 22 noch aus der Fraktion 26 erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde erneut eine präparative Auftrennung des *S. pectinatus* mSP Extraktes mittels HPLC (s. Kap. 6.8.1/HC2) vorgenommen [KHS\_33]. Jedoch konnten die vorangegangenen präparativen Auftrennungen des *S. pectinatus* mSP [KHS\_18\_2] nicht reproduziert werden, da die Chromatogramme deutliche Unterschiede im Peakmuster aufwiesen. Die erzeugten 27 Fraktionen wurden im QC-Assay auf ihre inhibierende Aktivität untersucht.

Insgesamt konnten 11 der getesteten 27 Fraktionen (Abb. 22) die QC inhibieren. Jedoch zeigten aufgrund der Unterschiede in der Auftrennung andere Fraktionen eine QC-inhibierende Aktivität, welche im Vergleich zu der ersten präparativen Auftrennung dieses Extraktes auch deutlich höher ausfiel. Die zur weiteren chromatographischen Subfraktionierung in der ersten präparativen Auftrennung heran gezogenen Fraktionen 22 und 26 zeigten keine QC-inhibierende Aktivität. Des Weiteren wiesen die Chromatogramme beider Fraktionen nach Subfraktionierung mittels HPLC ebenfalls deutliche Unterschiede im Peakmuster auf.



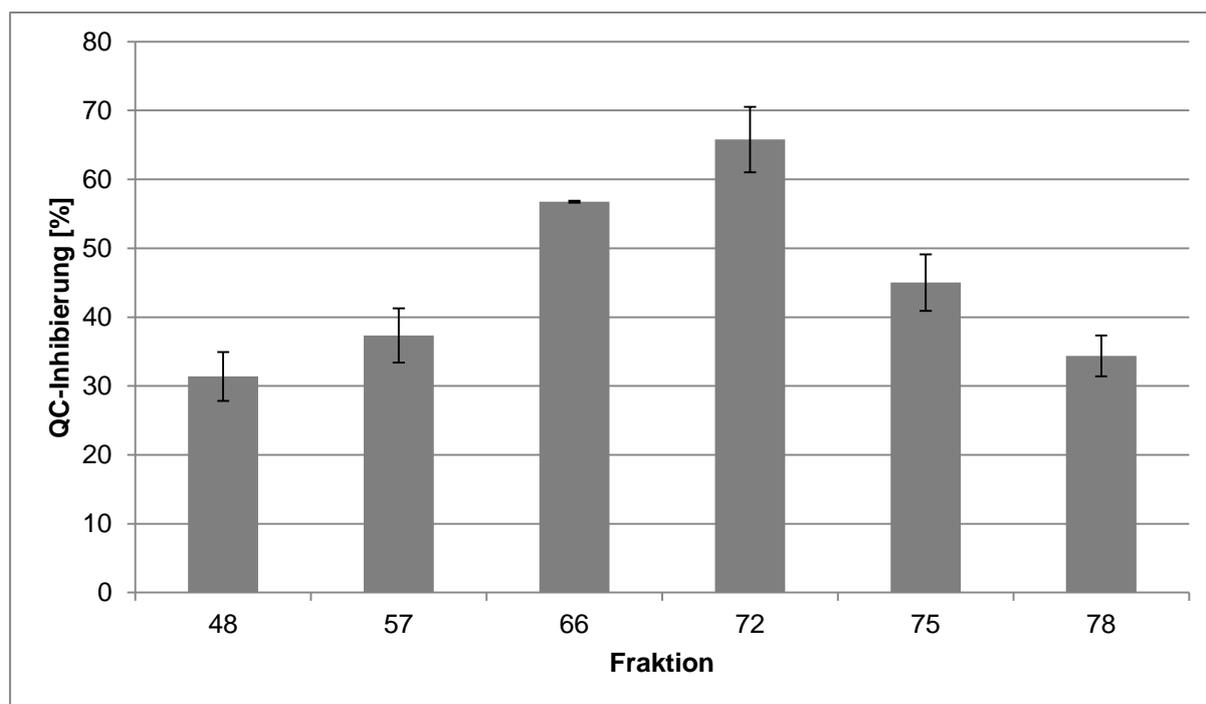
**Abb. 22:** Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Fraktionen; als positiv definiert: Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung [KHS\_039]

Die beiden aktivsten **Fraktionen 15** (45,7 %) und **Fraktion 17** (47,8 %) wurden weiter mittels HPLC an einer RP-18 Säule, mit einer Flussrate von 1 mL/min unter Verwendung eines Gradientensystems aus Acetonitril/Wasser (s. Kap. 6.8.1/HC3) über einen Zeitraum von

15 min aufgetrennt. Beide Fraktionen zeigten drei Peaks im Retentionszeitbereich von 0,7 min – 2,5 min / 1,7 min. In der anschließenden Testung der Unterfraktionen im QC-Assay konnten keine inhibierenden Aktivitäten detektiert werden.

In den präparativen bzw. semi-präparativen Auftrennungen des *S. pectinatus* mSP Extraktes mittels HPLC an einer RP-18 Säule konnten jeweils mehrere Fraktionen mittlerer Aktivität erhalten werden. Die Ursache der Verteilung der QC-inhibierenden Aktivität über mehrere Fraktionen könnte auf eine unzulängliche Trennung der aktivitätsrelevanten Verbindungen an der Säule zurückzuführen sein. Infolge dessen eluierten die Verbindungen nicht als Peak, welcher dann fraktioniert in ein bis zwei Fraktionen vorgelegt hätte, sondern die Verbindungen „schmierten“ über einen relativ langen Retentionszeitbereich und wurden somit auf mehrere Fraktionen verteilt. Die für die QC-inhibierende Aktivität verantwortlichen Verbindungen konnten somit mit der angewandten Methodik nicht getrennt werden. Weiterhin verlor sich in weiteren chromatographischen Auftrennungsschritten die QC-Aktivität, was auf zu geringe Konzentrationen der aktivitätsrelevanten Verbindungen in den Fraktionen bzw. dem Ausgangsextrakt zurückgeführt werden könnte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher die bioaktivitätsgeleitete Isolierung der QC-inhibierenden Verbindungen, ausgehend von einem *S. acuminatus* eSP Extrakt mittels präparativer säulenchromatographischer Trennung an Sephadex G-15 unter Einsatz einer deutlich höheren Ausgangsextraktmenge vorgenommen. Es handelt sich hierbei also um eine Größenausschluss-Chromatographie (SEZ) bei der die im Extrakt vorhandenen Substanzen bezüglich ihrer Molekülgröße getrennt werden. Die Trennung erfolgte ausgehend von 264 mg eines chlorophyllfreien methanolischen Extraktes (nach Chlorophyll-Entfernung mittels SA-Kartuschen und anschließender SPE an C18eC Kartuschen) von *S. acuminatus* eSP an Sephadex G-15 unter Verwendung von 70 % -igem Methanol als mobile Phase (s. Kap. 6.8.2). Im Abstand von 5,28 min (~ 8 mL) erfolgte die Fraktionierung zu insgesamt 95 Fraktionen. Der Nachlauf aus drei Säulenvolumina (SV) wurde als 96. Fraktion gesammelt. Anschließend erfolgte die Testung aller Fraktionen im QC-Assay.



**Abb. 23:** Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Fraktionen; als positiv definiert Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung [KHS\_051]

Wie bereits bei der präparativen Trennung des *S. pectinatus* mSP Extraktes mittels HPLC, konnten auch bei der Größenausschlusschromatographie an Sephadex G-15 mehrere QC-inhibierende Fraktionen detektiert werden. Auch hier wurden die Aktivitäten in Fraktionen über einen weiten Retentionszeitraum detektiert.

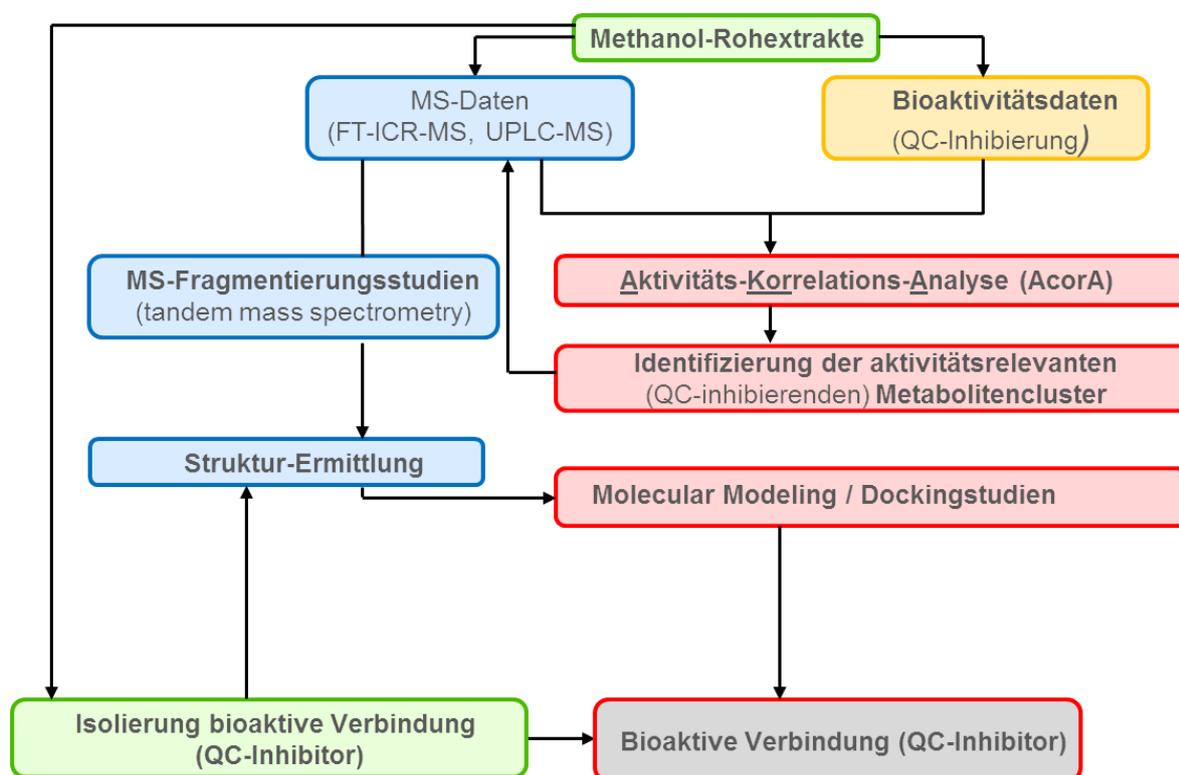
In nachfolgenden Untersuchungen wurde jede 3. Fraktion im Bereich der aktiven Fraktionen (30. – 96. Fraktion) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (s. Kap. 6.8.3/DC2). Die Detektion der Banden erfolgte visuell bei Tageslicht sowie bei Wellenlängen von  $\lambda = 254$  nm,  $\lambda = 366$  nm und nach Verwendung des Sprühreagens Vanilin-Schwefelsäure (s. Kap. 6.8.3.1). Weiterhin wurden die Fraktionen 57 – 80 mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> (s. Kap. 6.6.1) unter dem Gesichtspunkt der Identifizierung aktivitätsrelevanter Peaks untersucht. Hierbei fiel ein Peak mit der RT von 6,97 min auf, welcher bei den aktiven Fraktionen vorhanden, aber bei allen nicht-aktiven Fraktionen fehlte. Anhand dieses Peaks wurden die Fraktionen 61, 65, 66, 68, 71, 72 und 73 zu der Fraktion 5 [KHS\_051\_F5] wieder vereint. Die anschließende Testung dieser Fraktion 5 im QC-Assay zeigte eine Inhibierung der QC von 40,93 %. In den folgenden zahlreichen dünnschichtchromatographischen und säulenchromatographischen Analysen (nicht dargestellt) konnten weder aktivitätsrelevante Substanzen isoliert, noch massenspektrometrische Hinweise auf die aktiven Substanzen bzw. Substanzklassen erhalten werden. Weiterhin verlor sich in den chromatographischen Auftrennungsschritten die QC-Aktivität. Auch diese Vorgehensweise zur bioaktivitätsgeleiteten Isolierung war nicht zielführend.

Eine bioaktivitätsgeleitete Isolierung der QC-inhibierenden Verbindung war nicht möglich, so dass eine alternative Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung der aktivitätsrelevanten Verbindungen aufgefunden werden musste.

### 5.4.2. Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten mittels AcorA

Da die bioaktivitätsgeleitete Isolierung der QC-inhibierenden Verbindungen nicht zielführend war, erfolgte die Suche nach alternativen Methoden. Eine erfolgversprechende Methode stellte dabei der Ansatz der „Reverse Metabolomics“ dar, bei der „Metabolomics-Methoden“ mit Strategien der Naturstoffisolierung kombiniert und informatisch ausgewertet werden. Die Methodik basiert auf der Korrelation von massenspektroskopischen Daten mit Testergebnissen aus biologischen Assays, mit Hilfe von chemoinformatischen Methoden (Aktivitäts-Korrelations-Analyse, **activity correlation analysis**, AcorA) [283,284].

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 24) zeigt die Vorgehensweise sowie die durchgeführten notwendigen „Schritte“ zur Identifizierung QC-inhibierender Metabolite mittels AcorA.



**Abb. 24:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten mittels Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA)

Ausgehend von den methanolischen Extrakten war es erforderlich, neben der Bestimmung der biologischen Aktivität, eine massenspektrometrische Analyse der Extrakte durchzuführen. Die massenspektrometrischen Analysen erfolgten mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> und ESI-FTICR-MS sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus. Basierend auf den massenspektrometrischen Daten und den Bioaktivitätsdaten erfolgte die Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA). Aus den sich hieraus ergebenden QC-aktivitätsrelevanten Metabolitencluster wurden mit Hilfe der vorhandenen massenspektrometrischen Daten sowie weiteren, gezielten massenspektrometrischen Fragmentierungsstudien, die Kandidatenstrukturen der relevanten Verbindungen ermittelt. Mittels Molekular Modeling erfolgte dann eine erste Untersuchung der vorgeschlagenen Strukturen hinsichtlich ihres Potentials zur Hemmung der humanen QC. In einem letzten Schritt wurden die Metaboliten isoliert und auf ihre inhibierende Aktivität gegenüber der QC im Einzelfall untersucht.

#### 5.4.2.1. Massenspektrometrische Untersuchungen

Die massenspektrometrische Analyse der methanolischen Extrakte erfolgte nach Chlorophyll-Entfernung mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> und ESI-FTICR-MS sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus.

##### UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>

Für die Identifizierung bioaktiver Metaboliten in komplexen Algenextrakten wurde eine UPLC-ESI-MS<sup>2</sup> Methode etabliert. Durch die Nutzung der Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) wurde bei der chromatographischen Trennung der komplexen Algenextrakte eine sehr gute Auflösung, Empfindlichkeit sowie eine erhöhte Trenngeschwindigkeit erzielt.

Durch die Verwendung einer Ionenfalle (*Ion Trap*) war es unter Anwendung einer „data dependent“ MS<sup>2</sup> Methode (DDIT) außerdem möglich sequentielle MS<sup>2</sup> Fragmentierungen durchzuführen. Diese automatischen Fragmentierungen der Metaboliten erfolgte in einem *m/z* Bereich von 100 – 1000 Da. Die etablierte UPLC-ESI-MS<sup>2</sup> Methode ermöglichte eine massenspektrometrische Analyse komplexer Algenextrakte.

Es erfolgte die Analyse der chlorophyllfreien SA-Methanol-Extrakte in Dreifachmessung. Wie erwünscht, wiesen die Extrakte variable und identische Metabolitencluster auf. Die Variationen im Metabolitenprofil wurden durch die Verwendung der Biomassen sowohl aus der exponentiellen Wachstumsphase als auch der stationären Wachstumsphase und der Anwendung zweier Extraktionsmethoden erzeugt und waren im Hinblick auf die durchzuführende Korrelationsanalyse notwendig.

Beispielhaft zeigen die Base-Peak Chromatogramme der Alge *Sc. producto-capitatus* in Abb. 71 (Anhang), dass die Metabolitenprofile in Abhängigkeit der Wachstumsphasen (WP / SP) sowie der Extraktionsmethode (einstufig / mehrstufig) Varianzen und Gemeinsamkeiten aufweisen.

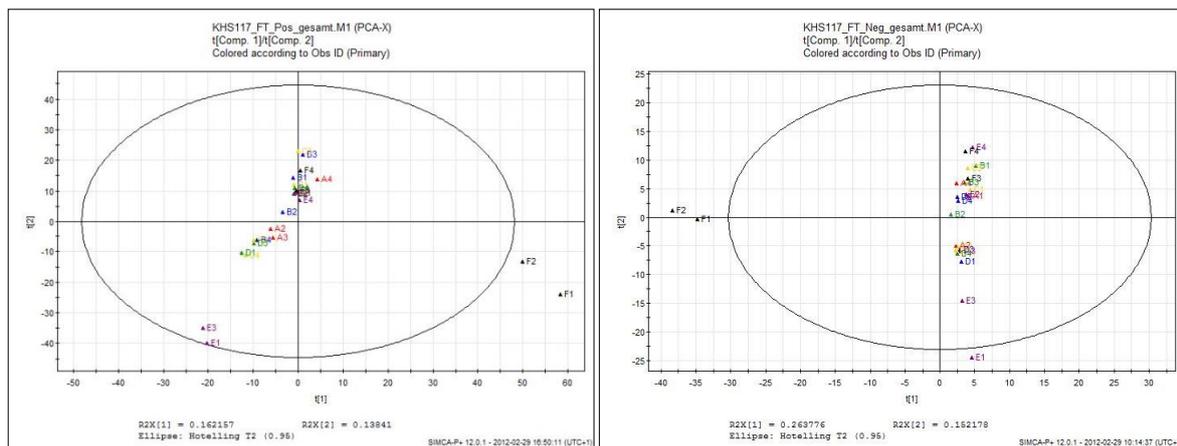
Vergleicht man weiterhin z.B. die Metabolitenprofile der einstufigen Extraktion der Wachstumsphase (Abb. 72, Anhang), zeigen sich gleiche Bereiche in Abhängigkeit der Zugehörigkeit zu einer Familie (*S. acuminatus*, *S. pectinatus* und *T. wisconsinensis* zugehörig zur Familie Scenedesmeaceae), sowie in Abhängigkeit der Zugehörigkeit zu einem Genus (*Sc. acuminatus*, *Sc. pectinatus*). Neben diesen homogenen Bereichen zeigen sich weiterhin Bereiche großer Varianz.

##### ESI-FTICR-MS

Als weiteres massenspektrometrisches Verfahren wurde die ESI-FTICR-MS ausgewählt. Im Gegensatz zur UPLC-ESI-MS handelt es sich bei diesem Verfahren um eine hochauflösende massenspektrometrische Analyse der Extrakte ohne chromatographische Auftrennung. Jedoch bietet dieses Verfahren die Möglichkeit einer absoluten Massenbestimmung. Auch hier wurden die Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte in Dreifachmessung analysiert und wiesen wie erwünscht sowohl variable als auch gleiche Bereiche in den Metabolitenspektren auf. Dies ist beispielhaft in den ESI-FTICR-MS Spektren in Abb. 73 und Abb. 74 (Anhang) zu sehen.

Da der massenspektrometrische Datensatz einen entscheidenden Einfluss auf die Güte der Korrelations-Analyse hat, wurde zur Beurteilung des selbigen eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis – PCA) mit dem Programm SIMCA 12+ durchgeführt. Die PCA stellt ein Verfahren der multivariaten Statistik dar, mit welchem Datensätze vereinfacht und veranschaulicht visualisiert werden können.

Nachfolgend sind in Abb. 25 die PCA – Score Plots der mittels ESI-FTICR-MS analysierten Extrakte *links* im positiven Ionenmodus und *rechts* im negativen Ionenmodus dargestellt.



**Abb. 25:** PCA-Score Plots der mittels FTICR-MS analysierten Extrakte *links* im positiven Ionenmodus und *rechts* im negativen Ionenmodus. Variable  $t(1)=m/z$ ;  $t(2)=$ Intensität; A= *S. producto-capitatus* wobei A1=eWP, A2=mWP, A3=eSP, A4=mSP; B= *S. rubescens* wobei B1=eWP, B2=mWP, B3=eSP, B4=mSP; C= *S. acuminatus* wobei C1=eWP, C2=mWP, C3=eSP, C4=mSP; D= *Sc. pectinatus* wobei D1=mWP, D2=eWP, D3=mSP, D4=eSP; E= *T. wisconsinensis* wobei E1=mWP, E2=eWP, E3=mSP, E4=eSP; F= *E. magnus* wobei F1=mSP, F2=eSP, F3=mWP, F4=eWP [KHS\_117]

Als Variablen wurden die mittels ESI-FTICR-MS detektierten Metaboliten anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/z$  ( $t(1)$ ) sowie deren zugehörige Intensitäten ( $t(2)$ ) definiert. Somit lassen sich aus dem Score Plot dieser Variablen, in Bezug auf die Metabolitenprofile der untersuchten Extrakte Gemeinsamkeiten (Homologien) und Varianzen in Bezug auf vorhandene Metaboliten bzw. deren Intensitäten ableiten. Hierbei gilt: desto enger beieinander Punkte liegen, desto ähnlicher sind die Metabolitenprofile und umgekehrt.

Aus dem in Abb. 25 dargestellten Score Plot lässt sich ableiten, dass die Extrakte im positiven Ionenmodus (linker Score Plot) Gemeinsamkeiten sowie Varianzen in Bezug auf enthaltene Metaboliten sowie deren Intensitäten aufweisen. Es finden sich Cluster wie z.B. das der Extrakte E4, E2, D4, A1 und C1, welche somit sehr ähnliche Metabolitenprofile sowohl in Bezug auf die vorhandenen Metabolite als auch deren Intensitäten besitzen. Aber große Varianzen sind z.B. durch die Extrakte E3, E1, F1 und F2 gegeben. Insgesamt weisen die Extrakte gleiche und unterschiedliche Metaboliten mit gleichen und unterschiedlichen Intensitäten auf.

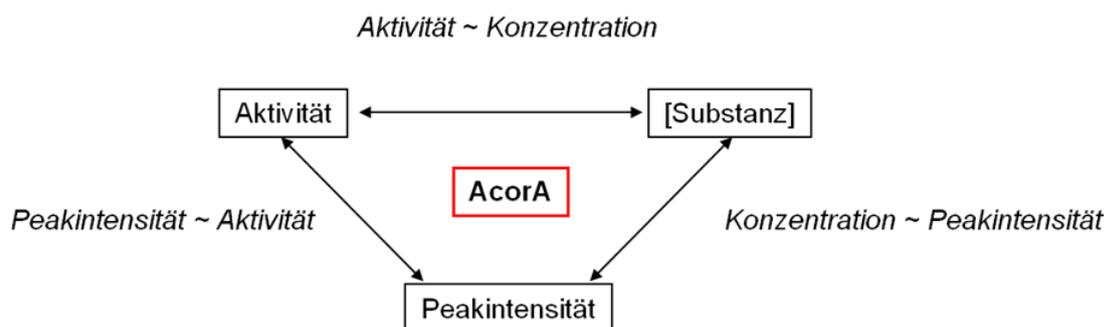
Der Score Plot der Extrakte im negativen Ionenmodus (Abb. 25 rechter Score Plot) zeigt eine deutlich schwächere Varianz in Bezug auf die enthaltenen Metaboliten, was sich aus der Anordnung des Extraktendatenpunktes entlang der  $t(2)$ -Achse ableiten lässt. Hier besteht die Varianz vornehmlich in der Intensität der vorhandenen Metaboliten. Ursächlich hierfür könnte die schlechtere Ionisierung der Metaboliten im negativen Modus als im positiven Ionenmodus sein. Darüber hinaus stellen auch, wie im positiven Ionenmodus, die Extrakte F1 und F2 eine große Varianz im Metabolitenprofil im Vergleich zu den übrigen Extrakten dar. Ebenso las-

sen sich in diesem Score Plot Cluster wie z.B. D2, D4, A1, E2 und C1 finden, in denen die Extrakte große Gemeinsamkeiten aufweisen.

Die beiden Score Plots zeigen, dass der Datensatz sowohl die für die Korrelationsanalyse (AcorA) notwendigen Varianzen als auch Gemeinsamkeiten im Metabolitenprofil aufweisen. Diese konnten durch die Verwendung unterschiedlicher Biomassen (exponentielle und stationäre Wachstumsphase) unter Anwendung zweier Extraktionsverfahren erzeugt werden.

#### 5.4.2.2. Korrelationsanalyse (AcorA)

Mittels einer in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie entwickelten Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA), erfolgte eine direkte Korrelation der massenspektrometrischen Metabolitenprofile (UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS) mit den Bioaktivitätsprofilen eines Extraktes. Diese direkte Korrelation der Metabolitenprofile mit den Bioaktivitätsprofilen basiert auf der Grundannahme, dass die Aktivität direkt proportional zu den Konzentrationen der aktiven Verbindungen steht (Abb. 26). Die Konzentration verhält sich direkt proportional zur Peakintensität, woraus sich ein ebenfalls proportionaler Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Peakintensität ergibt.



**Abb. 26:** Grundannahme der Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) [283]

Hierbei wird berücksichtigt, dass Substanzen in den massenspektrometrischen Untersuchungen durch mehrere Peaks (Isotopenpeaks, Adukte, Fragmente) repräsentiert werden. Eine Korrelation erfolgt zwischen der Aktivität des Gesamtextraktes und jedem einzelnen Peak bzw. dessen Intensität, wobei angenommen wird, dass die aktivitätsrelevanten Peaks am besten korrelieren.

Es liegt zwischen Bioaktivität / Konzentration und somit zwischen Konzentration / Peakintensität selten ein linearer Zusammenhang vor, so dass AcorA die Spearman Rangkorrelationsanalyse zu Grunde gelegt wurde. Nach Vorverarbeitung der massenspektrometrischen Rohdaten mittels einer XCMS-Software für das Peakpicking und Alignment, erfolgt als Ergebnis der Korrelationsanalyse die Ausgabe einer Hitliste ( $m/z$ ,  $t_R$ , Korrelationskoeffizient, Peakintensität) von Peaks, die eine statistisch signifikante Korrelation mit der Bioaktivität aufweisen [283].

Die für die Korrelationsanalyse notwendigen Variationen und Gemeinsamkeiten in Bezug auf das Metabolitenprofil, Peakintensität sowie Bioaktivität der Extrakte konnten erzielt werden, indem die Biomassen der exponentiellen und stationären Wachstumsphase sowie zweier Extraktionsmethoden zur Extraktgewinnung eingesetzt wurden. Weiterhin konnte dies durch die Auswahl eng verwandter sowie entfernter Algenspezies erhalten werden. Die Korrelati-

ons-Analyse wurde mit einem Probensatz von 24 Extrakten (notwendige Probenanzahl >18) durchgeführt. Es erfolgte die Korrelation der massenspektrometrischen Daten aus den UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>- sowie ESI-FTICR-MS Analysen des positiven sowie negativen Ionenmodus mit den Bioaktivitätsdaten.

### **Positiver Ionenmodus**

#### **UPLC-ESI-MS**

Die Datenaufbereitung der massenspektrometrischen Rohdaten der 24 Extrakte, in Dreifachmessung (72 Messungen), erfolgte nach Konvertierung in das *mzXML* Dateiformat mittels der Software XCMS. Nach Peakpicking und Alignment umfasste der Datensatz 10526 Peaks. Anschließend erfolgte die Korrelation (Spearman Rangkorrelationsanalyse) mit den Bioaktivitätsdaten (Inhibierung %) aus dem QC-Assay (s. Abb. 19; 1 mg/mL). Hierbei erfolgte die Bestimmung der Signifikanzschwelle als zweiseitiger Signifikanztest ( $\alpha = 5\%$ ) mittels eines Permutationstests (n = 1000 Wiederholungen).

Die erhaltene Hitliste (s. Anhang; Tab. 18) zeigte eine signifikante, positive Korrelation von 326 Peaks (Korrelationskoeffizient >0.6).

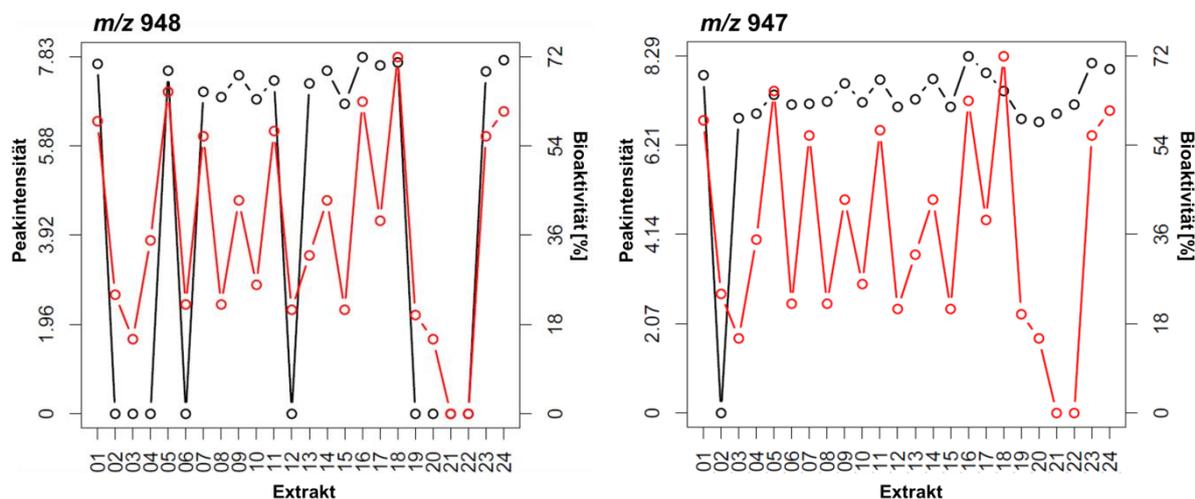
Aus vorangegangenen Arbeiten von Michels (2011) ist bekannt, dass Korrelationen zu Peakcluster meist auf „richtig positive“ Hits hindeuten. Daher wurde die Datenauswertung auf Basis dieser Erkenntnis durchgeführt. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Peakcluster, welche aus Isotopenpeaks, Fragmenten und Adukten bestehen können, nicht zwangsläufig an aufeinanderfolgenden Positionen in der Hitliste aufgelistet sein müssen.

Nach Auswertung der Hitliste (Tab. 18) konnten die Peakcluster A1 und A2 als mögliche positive Hits identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die Verbindungen mit den Molekulationen  $[M+H]^+$  *m/z* 947 (A1) und  $[M+H]^+$  *m/z* 931 (A2).

**Tab. 5:** Ausschnitt aus der Hitliste (Anhang Tab. 18) nach AcorA der UPLC-ESI-MS Daten im pos. Ionenmodus [KHS\_048\_ACORA]

Nr.	Korrelationskoeffizient	<i>m/z</i> (+)	<i>t<sub>R</sub></i> [min]	Peakcluster/Annotation
1	0.88	948.4	9,26	A1 / Isotopenpeak $[M+H]^+$ 947
...	...			
13	0.84	932.5	9,32	A2 / Isotopenpeak $[M+H]^+$ 931
...	...			
15	0.84	931.5	9,35	A2 / $[M+H]^+$
...	...			
30	0.80	933.5	9,36	A2 / Isotopenpeak $[M+H]^+$ 931
...	...			
58	0.77	947.4	9,25	A1 / $[M+H]^+$ 947

Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen die Korrelation zwischen der Bioaktivität (QC-Inhibierung) und der Peakintensität der Verbindungen mit  $[M+H]^+$   $m/z$  947 (A1).

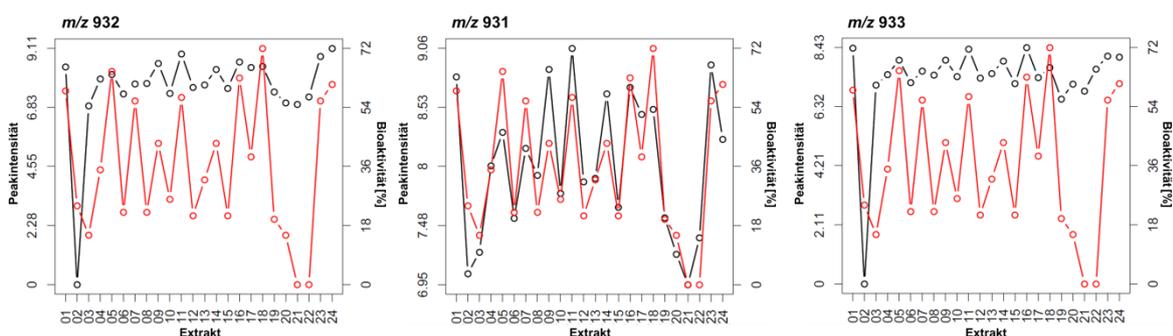


**Abb. 27:** AcorA-Plots des Peakclusters A1

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $[M+H]^+$   $m/z$  947 (links) und  $m/z$  948 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Die Korrelation der Peakintensität der Verbindung mit  $m/z$  948 (linke Abb. 27) und  $m/z$  947 (rechte Abb. 27) mit der Bioaktivität zeigt, dass die Peakintensität bei abnehmender Bioaktivität ebenfalls abnimmt und bei zunehmender Aktivität ansteigt. Der proportionale Zusammenhang zwischen Peakintensität und Bioaktivität lässt sich besonders gut in den Plots der Verbindung mit  $m/z$  948 über alle 24 untersuchten Extrakte in der linken Abbildung erkennen. Für die Verbindung mit  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  931 (A2, Abb. 28, Mitte) und deren Isotopenpeaks zeigt die Korrelations-Analyse, dass die Peakintensität bei abnehmender Bioaktivität abnimmt und bei zunehmender Aktivität ansteigt. Damit weist  $m/z$  931 die beste Korrelation auf und ist ein Kandidat für die Aktivität.



**Abb. 28:** AcorA-Plots des Peakclusters A2

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) des Isotopenpeaks der Verbindung  $[M+H]^+$   $m/z$  932 (links),  $m/z$  931 (Mitte) und eines weiteren Isotopenpeaks der Verbindung  $[M+H]^+$   $m/z$  933 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

**ESI-FTICR-MS**

Die Datenaufbereitung der massenspektrometrischen Rohdaten der 24 Extrakte, in Dreifachmessung (72 Messungen), erfolgte ebenfalls mittels der Software XCMS nach Konvertierung der Daten in das cdf-Dateiformat. Nach Peakpicking und Alignment umfasste der Datensatz 3835 Peaks.

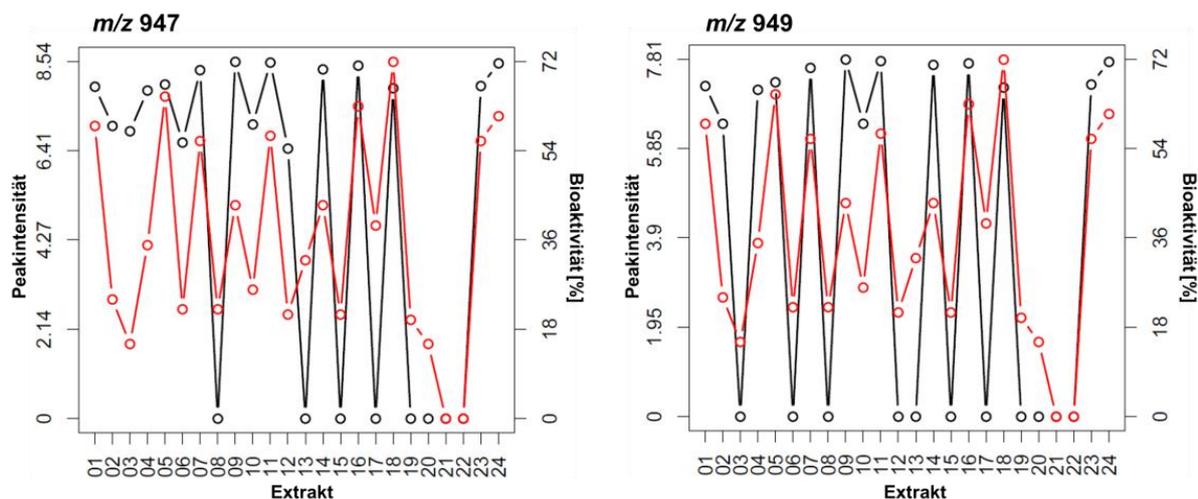
Ausgehend von diesem Datensatz erfolgte die Korrelation (Spearman Rangkorrelationsanalyse) mit den Bioaktivitätsdaten (Inhibierung %) aus dem QC-Assay (s. Abb. 19; 1 mg/mL). Hierbei wurde die Bestimmung der Signifikanzschwelle ebenfalls als zweiseitiger Signifikanztest ( $\alpha = 5\%$ ) mittels eines Permutationstests ( $n = 1000$  Wiederholungen) durchgeführt.

Die durch AcorA erzeugte Hitliste (Tab. 6) zeigt eine signifikante, positive Korrelation von 79 Peaks (Korrelationskoeffizient  $>0.5$ ).

**Tab. 6:** Ausschnitt aus der AcorA Hitliste (Tab. 19, Anhang) der ESI-FTICR-MS Daten im pos. Ionenmodus [KHS\_048\_ACORA]

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z(+)	Peakcluster / Annotation
1	0.81	970.5	C1 / Isotopenpeak, 969
2	0.81	949.5	C1 / Isotopenpeak, 947
...	...		
5	0.79	985.5	C1 / [M+K] <sup>+</sup> , 946
6	0.78	947.5	C1 / [M+H] <sup>+</sup> , 946
7	0.77	948.5	C1 / Isotopenpeak, 947
...	...		
12	0.74	969.6	C1 / [M+ Na] <sup>+</sup> , 947
...	...		
30	0.63	894.6	C2 / [M+Na] <sup>+</sup> , 871
...	...		
41	0.59	986.5	C1 / Isotopenpeak 985
42	0.59	933.6	C3 / Isotopenpeak 931
...	...		
44	0.58	895.6	C2 / Isotopenpeak, 894
...	...		
54	0.56	971.6	C1 / Isotopenpeak 969
55	0.56	932.6	C3 / Isotopenpeak 931
56	0.56	931.6	C3 / [M+H] <sup>+</sup> , 931

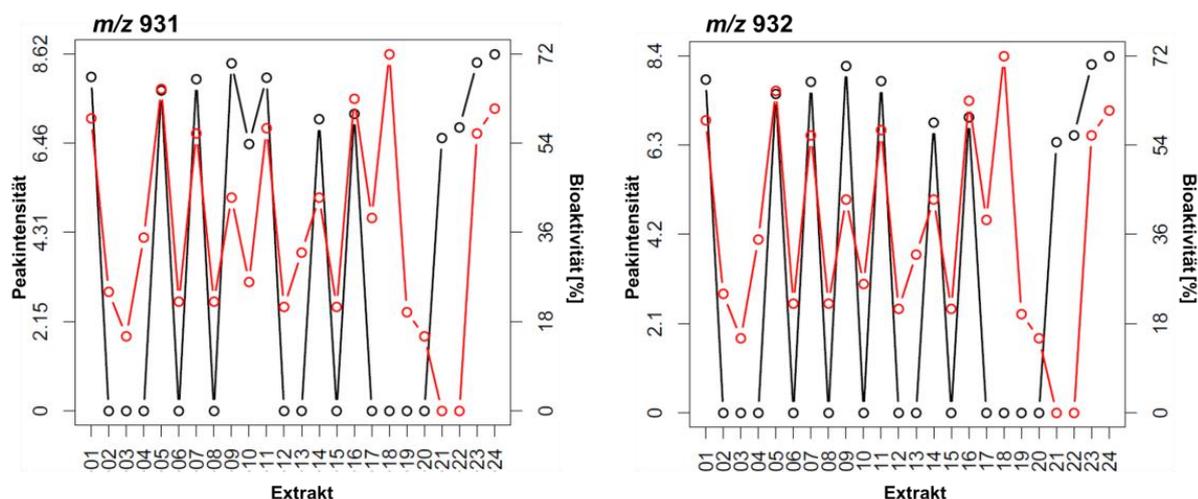
Es konnten insgesamt 3 Peakcluster identifiziert werden, wobei das Peakcluster C1 (Abb. 29) eine überaus signifikante Korrelation mit der Bioaktivität aufwies. In diesem Peakcluster korrelierten nicht nur der [M+H]<sup>+</sup> Peak der Verbindung bei  $m/z$  947, einschließlich seiner Isotopenpeaks sondern auch die Peaks der Natrium- [H+Na]<sup>+</sup> und Kalium [H+K]<sup>+</sup> Adukte, einschließlich deren Isotopenpeaks. Auch die Korrelations-Analyse der UPLC-ESI-MS Daten zeigte für diese Verbindung mit [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  947 (Peakcluster A1) eine signifikante Korrelation.



**Abb. 29:** AcorA-Plots des Peakclusters C1

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung  $[M+H]^+$   $m/z$  947 (links) und des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  949 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]  
Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

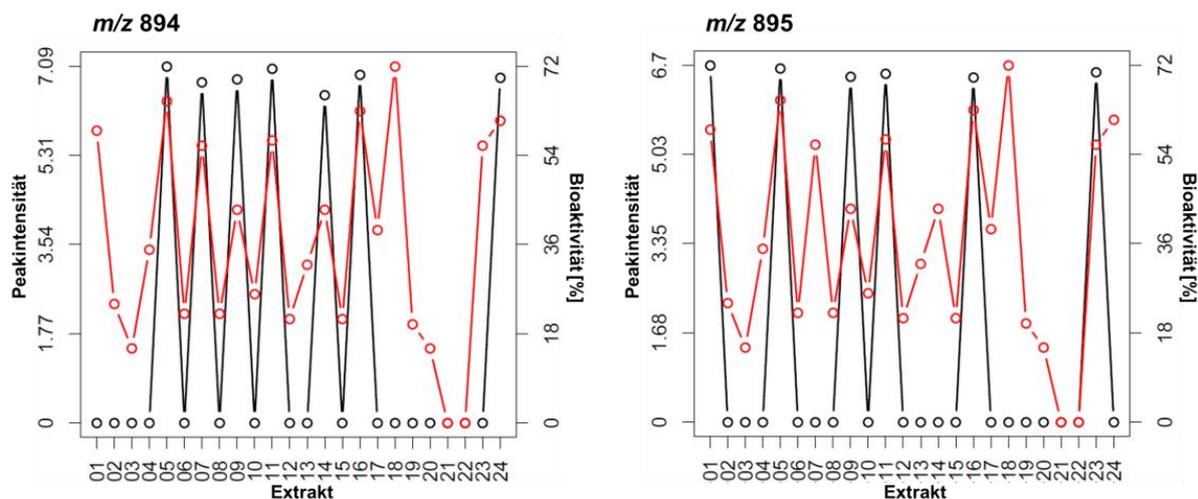
Das zweite identifizierte Cluster C3 der Verbindung mit  $[M+H]^+$   $m/z$  931 sowie dessen Isotopenpeak bei  $m/z$  932 zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation der Peakintensität mit der Bioaktivität (Abb. 30).



**Abb. 30:** AcorA-Plots des Peakclusters C3

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung  $[M+H]^+$   $m/z$  931 (links) und des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  932 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]  
Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Als drittes Cluster konnte C2 der Verbindung mit  $[M+Na]^+$   $m/z$  894 sowie dessen Isotopenpeak identifiziert werden. Die Korrelations-Analyse erbrachte auch bei diesem Ion einen signifikanten Zusammenhang der Zunahme der Bioaktivität bei ansteigender Peakintensität sowie Abnahme der Bioaktivität bei sinkender Peakintensität (Abb. 31).



**Abb. 31:** AcorA-Plots des Peakclusters C2

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung  $[M+Na]^+$   $m/z$  894 (links) und des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  895 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Im positiven Ionenmodus konnten mittels Korrelations-Analysen der UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS Daten mit den Bioaktivitäten folgende Peakcluster identifiziert werden, die auf mögliche, bioaktive Verbindung hindeuten.

Peakcluster **A1** mit den Molekülionen  $[M+H]^+$   $m/z$  947 (UPLC-ESI-MS)

Peakcluster **A2** mit den Molekülionen  $[M+H]^+$   $m/z$  931 (UPLC-ESI-MS)

Peakcluster **C1** mit den Molekülionen  $[M+H]^+$   $m/z$  947 (ESI-FTICR-MS)

Peakcluster **C2** mit den Molekülionen  $[M+Na]^+$   $m/z$  894 (ESI-FTICR-MS)

Peakcluster **C3** mit den Molekülionen  $[M+H]^+$   $m/z$  931 (ESI-FTICR-MS)

## Negativer Ionenmodus

### UPLC-ESI-MS

Wie auch im positiven Ionenmodus wurde die Datenaufbereitung der massenspektrometrischen Rohdaten der 24 Extrakte, in Dreifachmessung (72 Messungen), nach Konvertierung in das *mzXML* Dateiformat mittels der Software XCMS vorgenommen. Hierbei umfasste der Datensatz nach Peakpicking und Alignment mit 4652 Peaks deutlich weniger Peaks als im positiven Ionenmodus.

Anschließend erfolgte die Korrelation (Spearman Rangkorrelationsanalyse) mit den Bioaktivitätsdaten (Inhibierung %) aus dem QC-Assay (s. Abb. 19; 1 mg/mL). Hierbei erfolgte die Bestimmung der Signifikanzschwelle ebenfalls als zweiseitiger Signifikanztest ( $\alpha = 5\%$ ) mittels eines Permutationstests ( $n = 1000$  Wiederholungen).

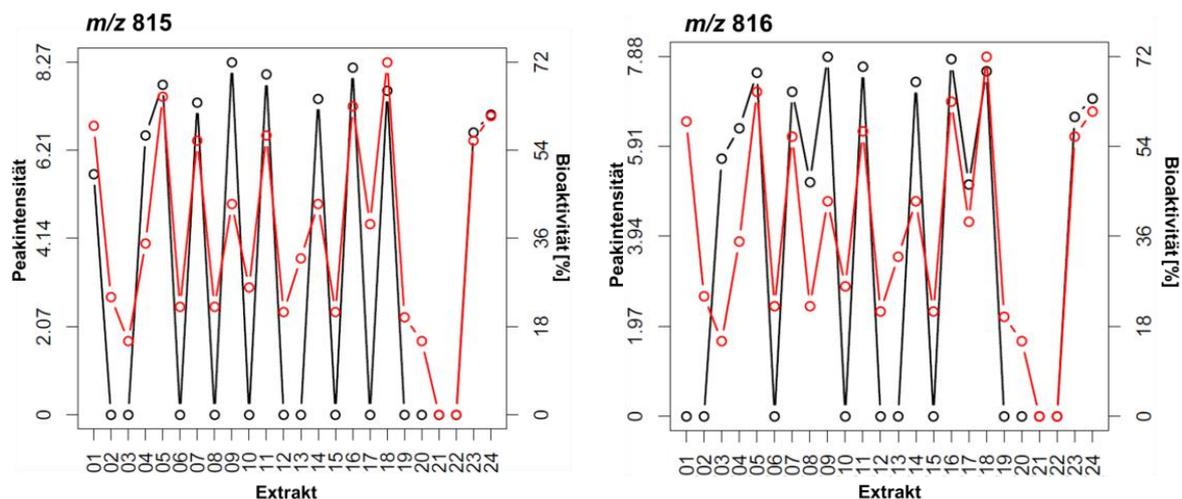
Als Ergebnis zeigten 131 Peaks (Korrelationskoeffizient  $>0.6$ ) eine signifikante Korrelation mit der QC-inhibierenden Aktivität (Tab. 21, Anhang). Die Auswertung der Hitliste wurde ebenfalls basierend auf Peakcluster durchgeführt.

**Tab. 7:** Ausschnitt aus der Hitliste (Tab. 20, Anhang) nach AcorA der UPLC-ESI-MS Daten im neg. Ionenmodus [KHS\_048\_ACORA]

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (-)	R <sub>t</sub> [min]	Peakcluster/Annotation
...	...			
4	0.83	815.7	7.22	B1 / [M-H] <sup>-</sup>
5	0.82	846.3	5.49	
6	0.81	815.7	7.52	B2 / [M-H] <sup>-</sup>
7	0.80	867.6	5.53	
8	0.80	817.7	7.70	B3 / [M-H] <sup>-</sup>
9	0.80	818.6	7.70	B3 / Isotopenpeak 817
...	...			
15	0.75	794.7	8.86	B4 / Isotopenpeak 793
16	0.75	816.6	7.92	
17	0.74	745.6	4.57	B5
18	0.74	509.5	4.59	B6
...	...			
22	0.74	817.6	7.22	B7 / [M-H] <sup>-</sup>
23	0.73	833.6	9.63	B8
...	...			
26	0.73	816.7	7.20	B1 / Isotopenpeak 815
27	0.72	819.6	9.54	
28	0.72	742.7	9.63	B9 / [M-H] <sup>-</sup>
29	0.72	818.7	7.20	B7 / Isotopenpeak 817
...	...			
33	0.72	744.7	9.63	B9 / Isotopenpeak 742
34	0.72	797.7	7.20	
35	0.71	816.7	7.51	B2 / Isotopenpeak 815

Es konnte eine Reihe von Peakclustern (B1-B9) identifiziert werden. Dabei fiel auf, dass mehrere Peakcluster auf gleiche Verbindungen mit [M-H]<sup>-</sup> bei *m/z* 815 und *m/z* 817 hinweisen und eine deutliche Korrelation in Bezug auf die Bioaktivität zeigten. Die Peakcluster B1 und B2 weisen jeweils auf die gleiche Verbindung mit [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 815 hin, wobei bei beiden auch der Isotopenpeak bei *m/z* 816 eine deutliche Korrelation aufweist.

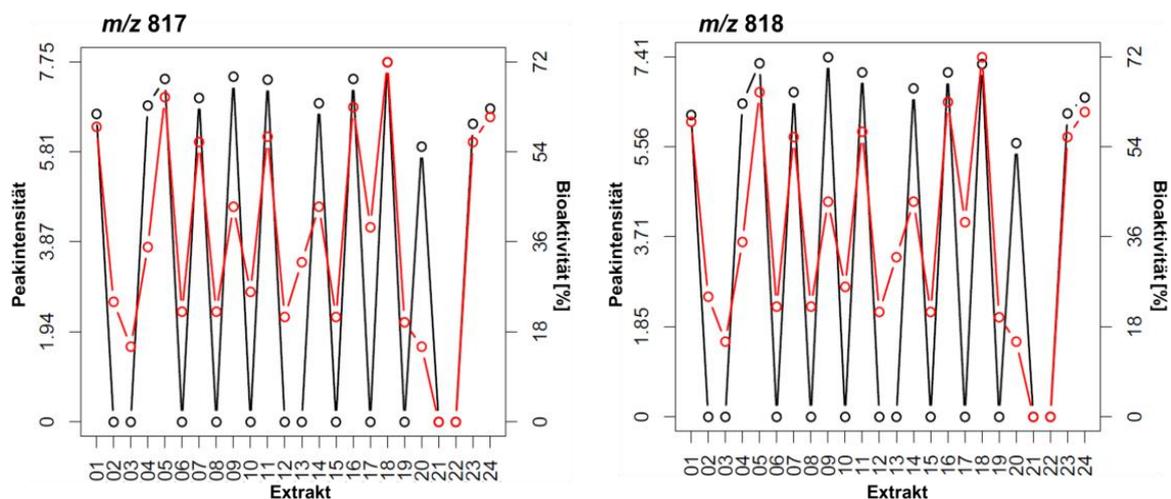
Nachfolgend ist für die Peakcluster B1 (Abb. 32) und B3 (Abb. 33) die Korrelation zwischen der Bioaktivität (QC-Inhibierung) und der Peakintensität der Verbindungen [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 815 sowie bei *m/z* 817 (jeweils links) und dem zugehörigen Isotopenpeaks bei *m/z* 816 sowie bei *m/z* 818 (jeweils rechts) graphisch dargestellt.



**Abb. 32:** AcorA-Plots des Peakclusters B1

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 815 (links) und dazugehörigen Isotopenpeaks *m/z* 816 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.



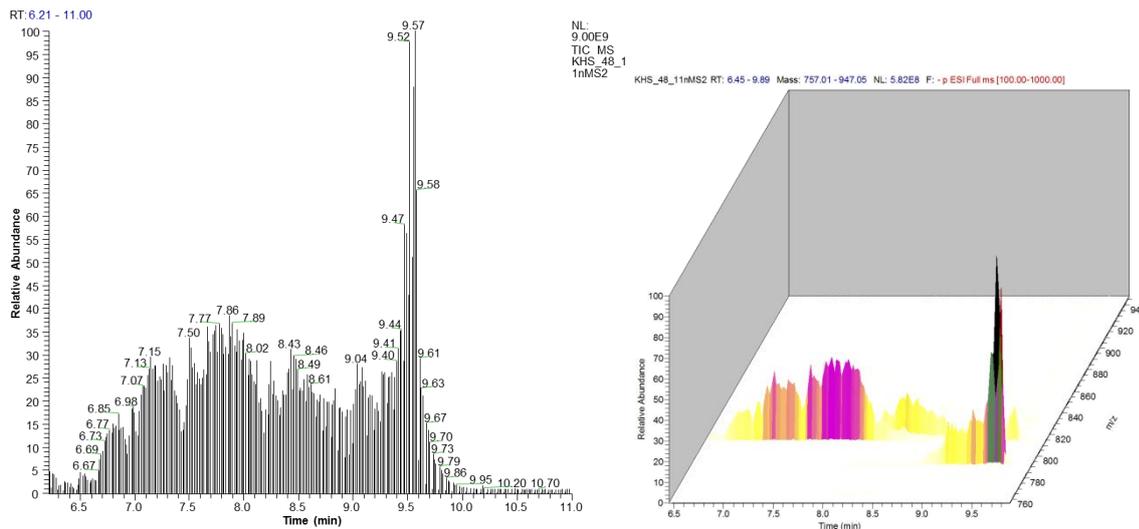
**Abb. 33:** AcorA-Plots des Peakclusters B3

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 817 (links) und des Isotopenpeaks der Verbindung mit *m/z* 818 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Die Graphiken zeigen für beide Verbindungen sowie deren Isotopenpeaks einen proportionalen Zusammenhang zwischen Peakintensität und Bioaktivität in allen 24 untersuchten Extrakten.

Da weitere Peakcluster, die sich jedoch in ihren Retentionszeiten unterscheiden, auf diese beiden Verbindungen hinweisen, wurden die Chromatogramme (total ion chromatogram – TIC; Gesamtionenstrom) im Retentionszeitbereich von 6,5 min bis 11,0 min der UPLC-ESI-MS Messungen aller Extrakte genauer betrachtet.



**Abb. 34:** Ausschnitt aus TIC (links) und der detektierten  $m/z$  (rechts) im Retentionsbereich von 6,2 min bis 11,0 min des Extraktes von *Sc. acuminatus* eSP [KHS\_048\_1\_1nMS2]

Wie die Abb. 34 erkennen lässt, konnten die Verbindungen mit  $m/z$  815 und  $m/z$  817 über den Retentionszeitbereich von 6,2 min bis 9,89 min detektiert werden. Es erfolgte somit keine Trennung der Verbindungen an der Säule, woraus ein Peak im Chromatogramm resultieren würde. Aufgrund der ungenügenden Trennung eluierten („schmierten“) die Verbindungen über diesen relativ langen Retentionszeitbereich. Jedoch konnte anhand der MS<sup>2</sup>-Spektren eindeutig festgestellt werden, dass es sich um gleiche Verbindungen bzw. Isomere handelt. Hierin kann das Auftreten mehrerer korrelierender Peakcluster begründet sein.

### ESI-FTICR-MS

Auch im negativen Ionenmodus wurde die Datenaufbereitung der massenspektrometrischen Rohdaten der 24 Extrakte, in Dreifachmessung (72 Messungen), mittels XCMS nach Konvertierung der Daten in das cdf-Dateiformat vorgenommen. Der Datensatz umfasste nach Peakpicking und Alignment 952 Peaks.

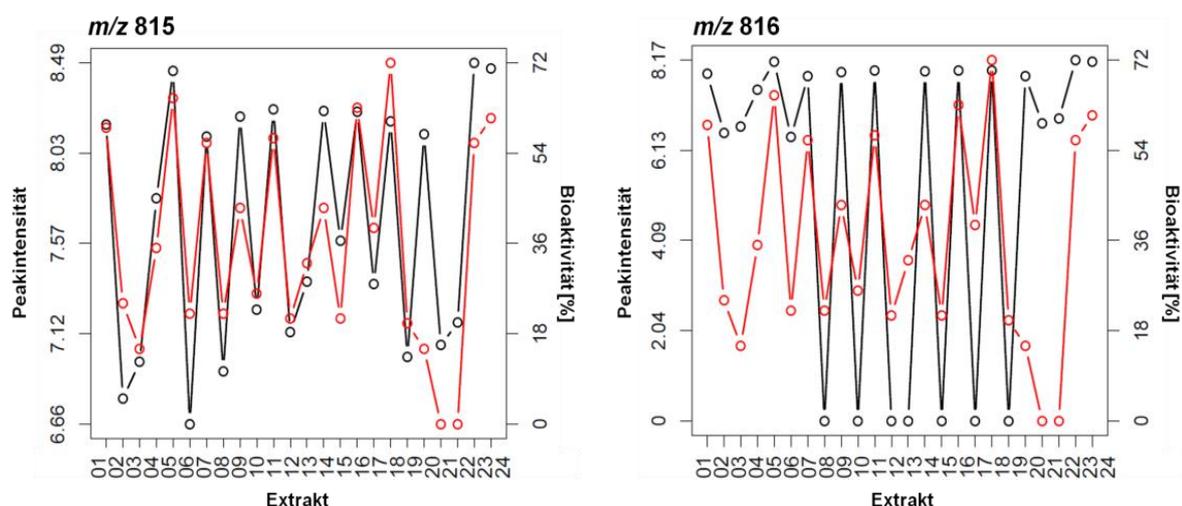
Von diesem Datensatz erfolgte die Korrelation (Spearman Rangkorrelationsanalyse) mit den Bioaktivitätsdaten (Inhibierung %) aus dem QC-Assay (s. Abb. 19; 1 mg/mL). Hierbei wurde die Bestimmung der Signifikanzschwelle als zweiseitiger Signifikanztest ( $\alpha = 5\%$ ) mittels eines Permutationstests ( $n = 1000$  Wiederholungen) durchgeführt.

Die mittels AcorA erzeugte Hitliste (Tab. 21, Anhang) zeigt eine signifikante, positive Korrelation von 41 Peaks, wovon 27 einen Korrelationskoeffizient  $>0.5$  aufwiesen.

**Tab. 8:** Ausschnitt aus der AcorA Hitliste (Tab. 21, Anhang) der ESI-FTICR-MS Daten im neg. Ionenmodus [KHS\_048\_ACORA]

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (-)	Peakcluster / Annotation
1	0,75	815,5	D1 / [M-H] <sup>-</sup>
...	...		
7	0,68	816,5	D1 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 815
...	...		
9	0,64	794,5	D2 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 793
10	0,64	795,5	D2 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 793
11	0,64	821,5	D3 / N.A.
...	...		
13	0,63	817,5	D4 / [M-H] <sup>-</sup>
14	0,63	819,5	D4 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 817
...	...		
16	0,59	822,5	D3 / N.A.
...	...		
19	0,56	793,5	D2 / [M-H] <sup>-</sup>
...	...		
21	0,53	831,5	D5 / N.A.
...	...		
24	0,51	832,5	D5 / N.A.
...	...		
26	0,50	743,5	D6 / N.A.
27	0,50	744,5	D6 / N.A.

Mittels der Korrelations-Analyse konnten 6 Peakcluster identifiziert werden. Hierbei fielen besonders die Peakcluster D1, D2 und D4 auf, da diese ebenfalls bei der Korrelation der UPLC-ESI-MS Daten im negativen Ionenmodus als signifikant identifiziert werden konnten. Hierbei handelt es sich um die Verbindungen mit den Ionen [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  815,  $m/z$  793 sowie  $m/z$  817.

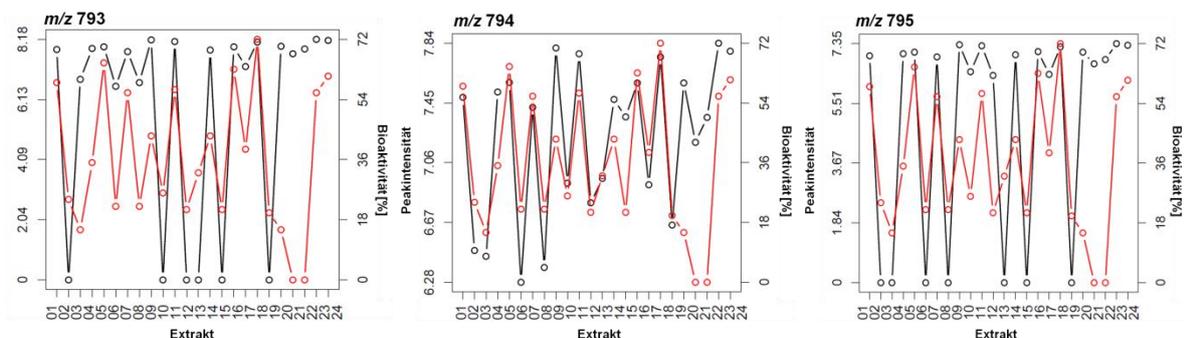
**Abb. 35:** AcorA-Plots des Peakclusters D1

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  815 (links) und des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  816 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Die in Abb. 35 dargestellten Graphiken zeigen für die Verbindung mit  $[M-H]^-$   $m/z$  815 (links) sowie deren Isotopenpeak mit  $m/z$  816 (rechts) einen proportionalen Zusammenhang zwischen Peakintensität und Bioaktivität in den 24 untersuchten Extrakten. Mit zunehmender Peakintensität nimmt die Bioaktivität zu bzw. vermindert sich bei abnehmender Peakintensität.

Das zweite identifizierte Peakcluster D2 weist auf eine signifikante Korrelation der Verbindung mit  $[M-H]^-$  bei  $m/z$  793 hin.



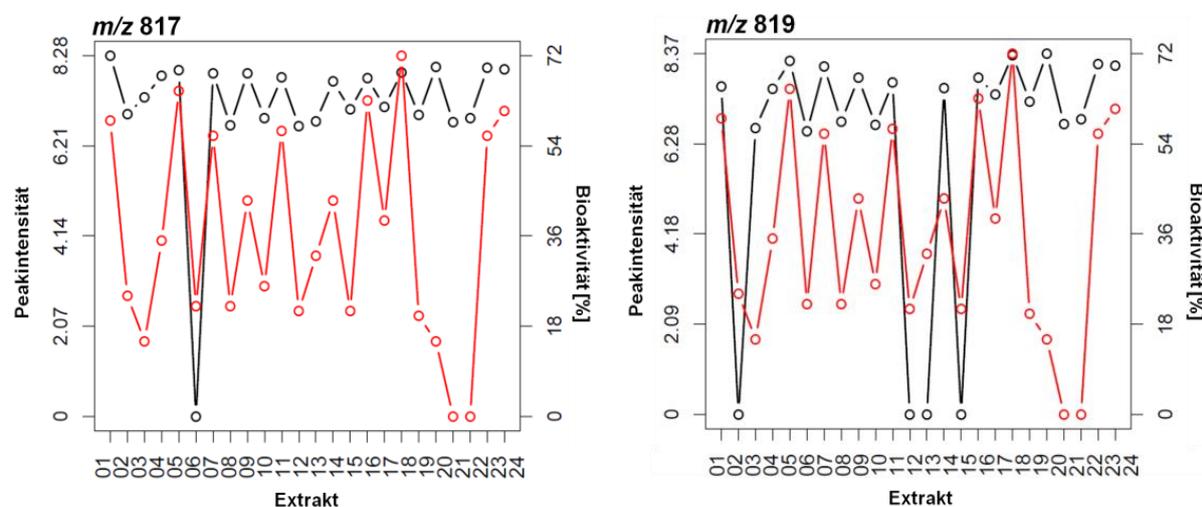
**Abb. 36:** AcorA-Plots des Peakclusters D2

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung  $[M-H]^-$   $m/z$  793 (links) und der Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  794 (Mitte) und  $m/z$  795 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Wie die Abb. 36 zeigt, korrelieren die Peakintensitäten der Verbindung mit  $[M-H]^-$   $m/z$  793 (links) sowie deren Isotopenpeaks bei  $m/z$  794 (Mitte) und  $m/z$  795 (rechts) mit dem Anstieg bzw. der Abnahme der Bioaktivität in den getesteten Extrakten.

Als weiteres Peakcluster konnte D4 identifiziert werden. Dieses zeigte ebenfalls, wie in Abb. 37 zu sehen, eine Korrelation zwischen der Peakintensität der Verbindung, mit  $[M-H]^-$   $m/z$  817 (links) sowie des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  819 (rechts), und der Bioaktivität in den Extrakten. Sie kann somit als potentiell „positiver“ (aktiver) Hit eingeschätzt werden.



**Abb. 37:** AcorA-Plots des Peakclusters D4

Korrelation der Bioaktivität (rot) und der Peakintensität (schwarz) der Verbindung  $[M-H]^-$   $m/z$  817 (links) und des Isotopenpeaks der Verbindung mit  $m/z$  819 (rechts) über die untersuchten Extrakte. [KHS\_048\_ACORA]

Die Linien in den abgebildeten Plots stellen keine mathematische Abhängigkeit oder Zusammenhang dar, sondern werden in dieser Form von der Software R ausgegeben.

Im negativen Ionenmodus konnten mittels Korrelations-Analysen der UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS Daten mit den Bioaktivitäten folgende Peakcluster identifiziert werden, die auf mögliche, bioaktive Verbindung hindeuten.

Peakcluster **B1** mit den Molekülionen  $[M+H]^-$   $m/z$  815 (UPLC-ESI-MS)

Peakcluster **B3** mit den Molekülionen  $[M+H]^-$   $m/z$  817 (UPLC-ESI-MS)

Peakcluster **D1** mit den Molekülionen  $[M+H]^-$   $m/z$  815 (ESI-FTICR-MS)

Peakcluster **D2** mit den Molekülionen  $[M+Na]^-$   $m/z$  793 (ESI-FTICR-MS)

Peakcluster **D4** mit den Molekülionen  $[M+H]^-$   $m/z$  817 (ESI-FTICR-MS)

### Zusammenfassung der mittels Korrelationsanalysen (AcorA) identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Metaboliten

Es erfolgten Korrelationsanalysen der massenspektrometrischen Daten der UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS Messungen (positiver und negativer Ionenmodus) mit den Bioaktivitätsdaten des QC-Assays. Die erhaltenen Hitlisten der vier Aktivitäts-Korrelations-Analysen wurden im Hinblick auf Peakcluster, welche aus Isotopenpeaks, Fragmenten sowie Adukten bestehen können, aber nicht zwangsläufig in der Hitliste aufeinanderfolgen, ausgewertet. Es ergaben sich daraus Peakcluster, der Verbindungen **19 – 24** (Tab. 9).

**Tab. 9:** Zusammenfassung der im positiven und negativen Ionenmodus korrelierenden Peakcluster

	UPLC-ESI-MS <sup>n</sup>		ESI-FTICR-MS	
	$m/z$	Peakcluster (Verbindung)	$m/z$	Peakcluster (Verbindung)
<i>pos. Ionenmodus</i>	947	A1 ( <b>19</b> )	947	C1 ( <b>19</b> )
	931	A2 ( <b>20</b> )	931	C3 ( <b>20</b> )
			894	C2 ( <b>21</b> )
<i>neg. Ionenmodus</i>	815	B1, B2 ( <b>22</b> )	815	D1 ( <b>22</b> )
	817	B3 ( <b>23</b> )	817	D4 ( <b>23</b> )
			793	D2 ( <b>24</b> )

Die Korrelationsanalyse der beiden massenspektrometrischen Metabolitenprofil-Datensätze (UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS) mit den Bioaktivitätsdaten (QC-Inhibierung) zeigten übereinstimmende, signifikante Korrelationen gleicher Peakcluster der Verbindungen **19 – 24**.

In nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die im positiven Ionenmodus korrelierenden Verbindungen **19 – 21** und die im negativen korrelierenden Verbindungen **22 – 24** strukturell charakterisiert.

### 5.4.2.3. Strukturelle Charakterisierung der identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Metaboliten

Die identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Verbindungen **19 – 24** erfolgte mittels der vorhandenen massenspektrometrischen Daten sowie weiterer gezielter UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmentierungs- und hochauflösender ESI-FTICR-MS-Untersuchungen strukturell charakterisiert. Ausgehend von den ermittelten Summenformeln wurden unter Verwendung von massenspektrometrischen Datenbanken und Literaturdatenbanken [285–287] sowie durch Vergleich mit den in der Literatur veröffentlichten Daten, die Strukturen der Verbindungen verifiziert.

Die Charakterisierungen erfolgten aus den Extrakten direkt ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte.

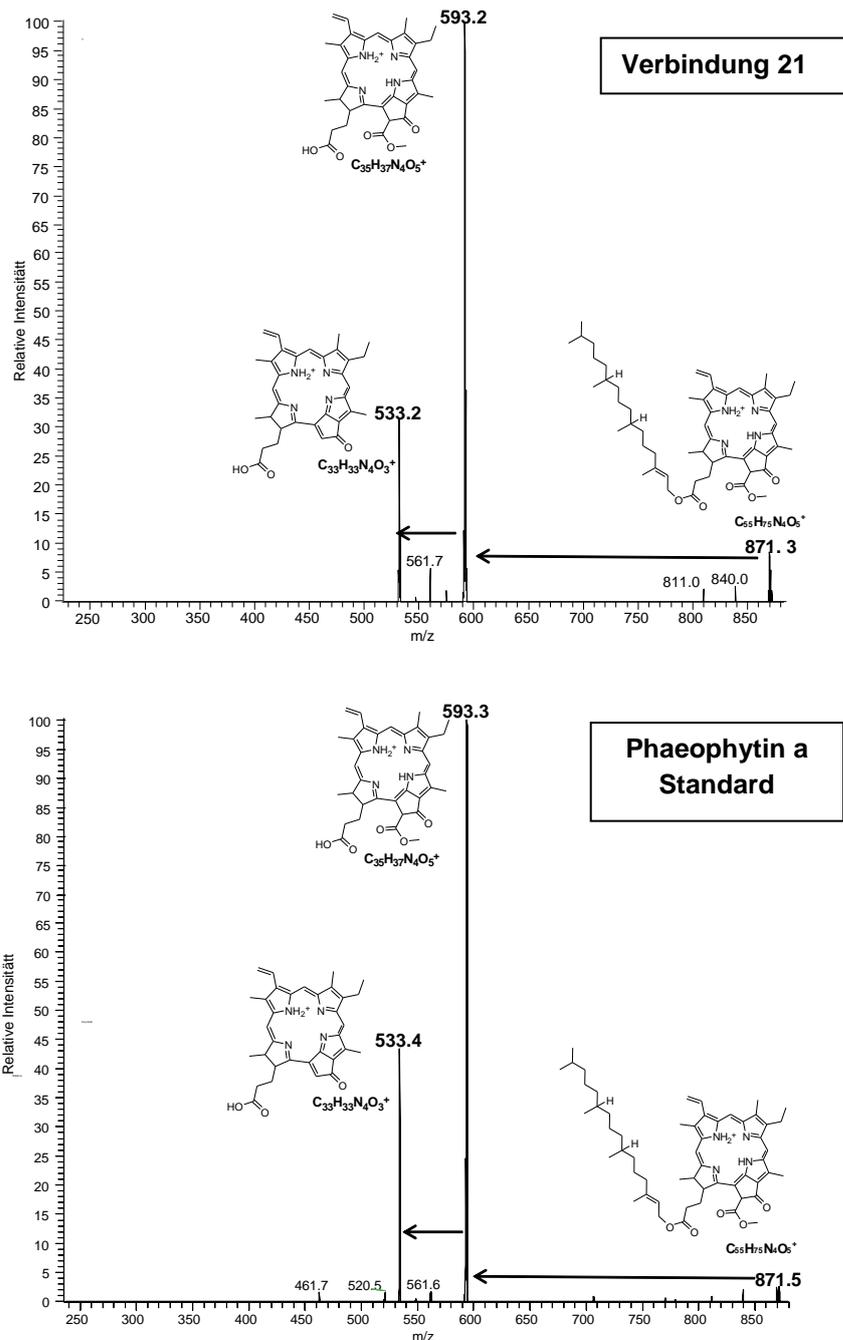
#### Verbindungen 19 - 21

Für die Verbindungen **19 – 21** mit [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 947, *m/z* 931 und [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 871 konnten mittels der ESI-FTICR Daten aus den exakten Massen folgende Summenformeln ermittelt werden:

- **19:** 947,5884730 [M+H]<sup>+</sup> calc. for **C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>** 947,5892420
- **20:** 931,5957630 [M+H]<sup>+</sup> calc. for **C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>** 931,5943273
- **21:** 871,5727730 [M+H]<sup>+</sup> calc. for **C<sub>55</sub>H<sub>74</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>** 871,5731980

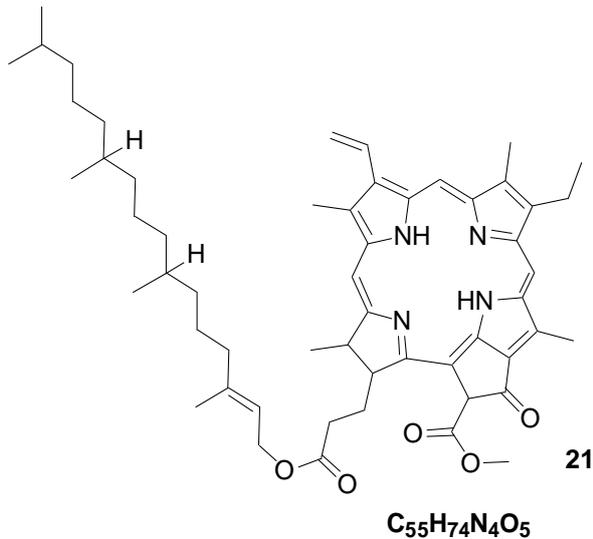
**Verbindung 21**

Die strukturelle Charakterisierung der Verbindung **21** erfolgte anhand der MS<sup>2</sup>-Spektren des *Scenedesmus producto-capitatus* eWP Extraktes. Da das Fragmentierungsverhalten der Verbindung **21** mit [M+H]<sup>+</sup> bei *m/z* 871,5 sowie die kalkulierte Summenformel C<sub>55</sub>H<sub>74</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> darauf hindeutete, dass es sich bei der Verbindung um Phaeophytin handeln könnte, wurde Phaeophytin a der Firma LGC-Standards als Vergleichsreferenz ebenfalls mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> sowie hochauflösender ESI-FTICR-MS [KHS\_113] unter Anwendung der gleichen Methode vermessen.



**Abb. 38:** MS<sup>2</sup>-Spektrum der Verbindung **21** des *S. producto-capitatus* eWP Extraktes (oben) und des Phaeophytin a Standard der Firma LGC-Standards (unten) vermessen mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> [KHS\_118]

Wie in den Spektren Abb. 38 zu erkennen ist, zeigte sich sowohl bei der Verbindung **21** als auch bei der Referenz Phaeophytin a eine identische Fragmentierung unter Bildung der beiden Ionen mit  $m/z$  593,2  $[M\text{-}phytadiene]^+$  und 533,2  $[M\text{-}phytadiene\text{-}C_2H_4O_2]^+$ . Es entsteht unter dem typischen Verlust von Phytadien das Ion mit  $m/z$  593,2. Weiterhin kommt es durch den Verlust von  $C_2H_4O_2$  zur Bildung des Fragmentions  $C_{33}H_{33}N_4O_3^+$  bei  $m/z$  533,2 [288]. Aufgrund gleicher Fragmentierungsmuster, als auch der Untersuchungen mittels hochauflösenden ESI-FTICR-MS handelt es sich bei der **Verbindung 21** wahrscheinlich um **Phaeophytin** (Abb. 39).

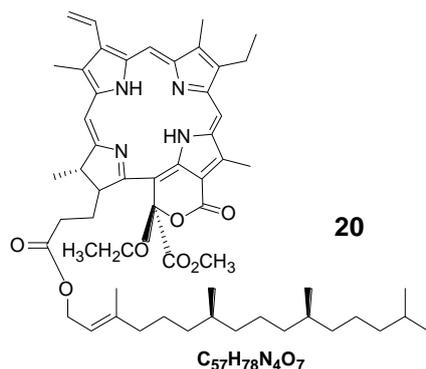


**Abb. 39:** Strukturvorschlag für Verbindung **21**

Detektiert werden konnte die Verbindung **21** in allen untersuchten Extrakten bei unterschiedlichen Retentionszeiten im Bereich von 5,0 – 7,5 min. Das sich die Verbindung in allen Extrakten finden lässt, kann darauf zurückgeführt werden, dass Phaeophytin an der Photosynthese (PS II) beteiligt ist, sowie als Abbauprodukt des Chlorophylls nach der Chlorophyll-Entfernung durch die Einwirkung schwacher Säuren entsteht und somit in allen Extrakten in unterschiedlicher Konzentration vorlag.

**Verbindung 20**

Die Verbindung **20** zeigte in den MS<sup>2</sup>-Spektren der UPLC-ESI-MS Analysen ebenso wie Verbindung **21** einen Neutralverlust von 278, der auf eine Abspaltung von Phytadien zurückgeführt werden kann. Aufgrund dieser Abspaltung unter Bildung des Fragmentions mit  $m/z$  653 [M-phytadiene]<sup>+</sup> sowie der hochauflösenden ESI-FTICR-MS Daten, einschließlich kalkulierter Summenformel, kann es sich bei dieser Verbindung wahrscheinlich ebenso um ein Porphyrinderivat handeln. Eine Datenbankrecherche der kalkulierten Summenformel C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> erbrachte in einer von Huang *et al.* (2007) veröffentlichten Arbeit, eine mögliche Struktur der Verbindung, die in nachfolgender Abb. 40 dargestellt ist [289].



**Abb. 40:** Strukturvorschlag für Verbindung **20** [289]

Weitere Fragmentierungsuntersuchungen (MS<sup>3-n</sup>) der Verbindung direkt aus den Extrakten waren nicht erfolgreich, so dass keine weiteren Informationen, die den Strukturvorschlag weiter untermauern konnten, erlangt wurden.

**Verbindung 19**

Wie die beiden Verbindungen **20** und **21** lässt sich auch die Verbindung **19** mit großer Wahrscheinlichkeit der Substanzklasse der Porphyrinderivate zuordnen. In den MS<sup>2</sup>-Spektren dieser Verbindung konnte ebenfalls ein auf Phytadien hindeutender Neutralverlust detektiert werden. Weiterhin kann anhand der ermittelten Summenformel angenommen werden, dass die Verbindung ebenfalls aus einem Porphyrinring mit 4 Stickstoffatomen besteht und kein Zentralatom enthält. Aus den vorliegenden massenspektrometrischen Daten der Extrakte war es jedoch nicht möglich einen Strukturvorschlag abzuleiten.

Die Klasse der Porphyrine einschließlich Phaeophytin weist eine Reihe von bioaktiven Eigenschaften auf. So stellt Phaeophytin einen potenten HCV-NS3 Proteaseinhibitor dar (Ziel für die Entwicklung von neuen Anti-Hepatitis C-Therapien) [290]. Weiterhin besitzen sie antioxidative Eigenschaften [291] sowie eine anti-inflammatorische Aktivität, da sie als NO-Inhibitor agieren können [292].

**Verbindung 22 – 24**

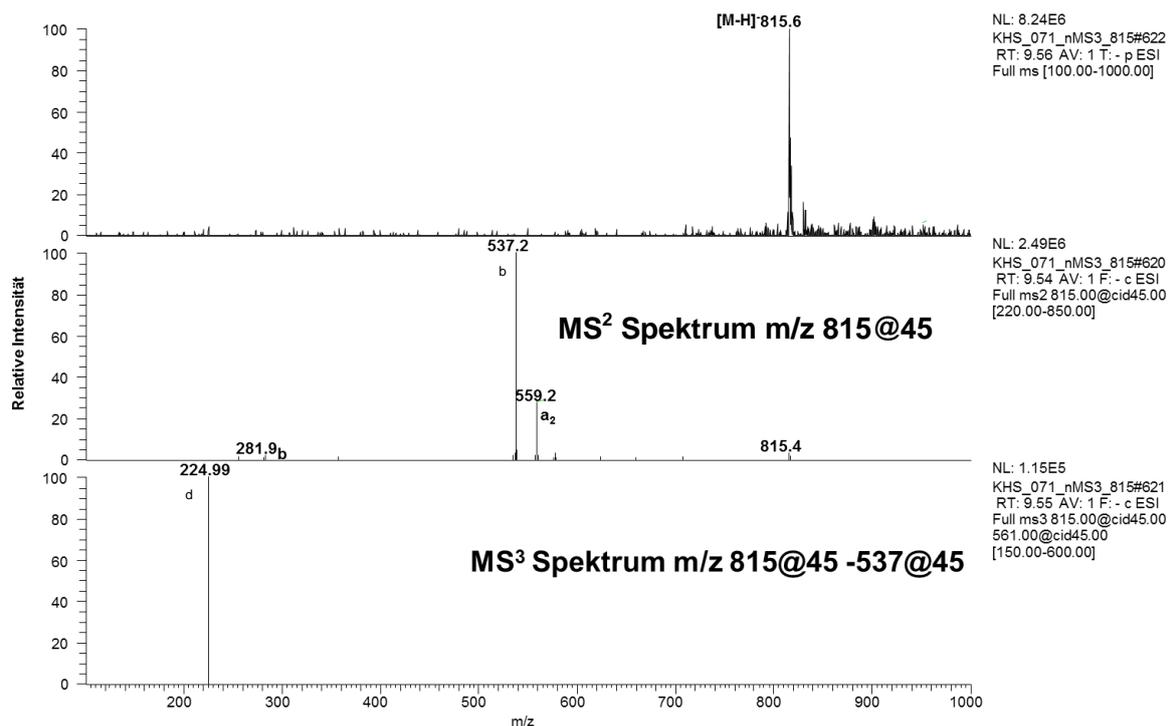
Die Strukturbestimmung der Verbindungen **22**, **23** und **24** erfolgte zunächst durch die Bestimmung der möglichen Elementarzusammensetzung anhand der hochauflösenden ESI-FTICR-MS-Daten, wodurch die nachfolgenden Summenformeln kalkuliert werden konnten:

- **22:** 815,49827 [M-H]<sup>-</sup> cal. für C<sub>43</sub>H<sub>76</sub>O<sub>12</sub>S 815,498472

- **23:** 817,51596 [M-H]<sup>-</sup> cal. für **C<sub>43</sub>H<sub>78</sub>O<sub>12</sub>S** 817,514122
- **24:** 793,51441 [M-H]<sup>-</sup> cal. für **C<sub>41</sub>H<sub>78</sub>O<sub>12</sub>S** 793,514122

Anhand der vorhandenen MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Daten der UPLC-ESI-MS Analysen der Extrakte, konnten die Strukturen der Verbindungen **22–24** verifiziert und durch die massenspektrometrischen Analysen von Referenzsubstanzen untermauert werden.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Massenspektren der Verbindung **22** mit dem Molekülion [M-H]<sup>-</sup> bei *m/z* 815,6 dargestellt.

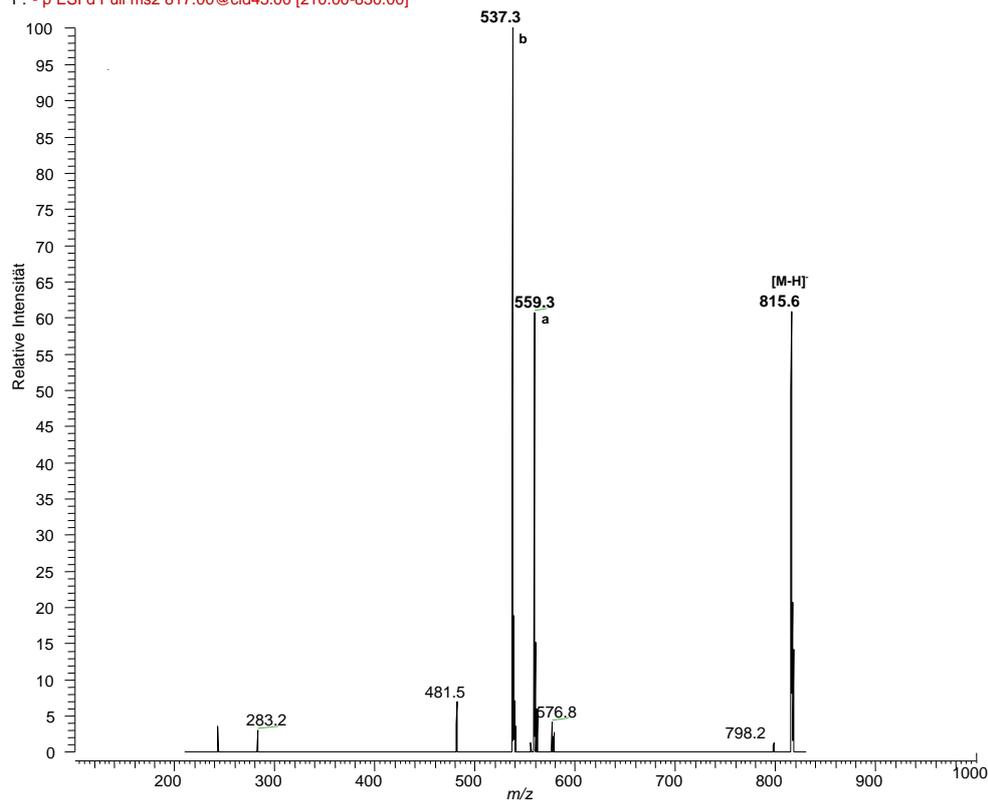


**Abb. 41:** MS<sup>1</sup>-Spektrum des [M-H]<sup>-</sup> Ions mit *m/z* 815 der Verbindung **22** unter (-)ESI-Bedingungen (1); MS<sup>2</sup>-Spektrum (2) unter Bildung der Fragmentationen [a] *m/z* 559 und [b] *m/z* 537 sowie MS<sup>3</sup>-Spektrum des Fragmentations [d] mit *m/z* 225. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 45 % bei (-)ESI eingesetzt. [KHS\_071\_nMS3]

Ausgehend von der für die Verbindung **22** detektierten Molekülmasse mit *m/z* 815,5 konnte in der Ionenfalle die Bildung der MS<sup>2</sup>-Fragmentationen [a] bei *m/z* 559,2 sowie [b] bei *m/z* 537,2 induziert werden. Das Fragmentation a (*m/z* 559,2) weist hierbei auf den neutralen Verlust eines Palmitoylrestes (C16:0) hin. Die Entstehung des Fragmentations b (*m/z* 537,2) lässt sich auf eine Abspaltung von Linolensäure (C18:3) zurückführen. Im MS<sup>3</sup>-Massenspektrum konnte das Fragmentation [d] mit *m/z* 224,9 nachgewiesen werden, welches auf C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub>S<sup>-</sup> hinweist. Aufgrund der massenspektrometrischen Daten handelt es sich bei der Verbindung **22** wahrscheinlich um ein Sulfoquinovosyldiacylglycerid (SQDG) mit den Acylresten Palmitoyl (C16:0) und Linolenoyl (C18:3).

Um dies zu untermauern, wurde ein SQDG-Standard der Firma Lipid Products (GB) mittels UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> unter Verwendung gleicher Methodik vermessen.

KHS\_78\_1\_SQDG Standard #621 RT: 9.59 AV: 1 NL: 2.36E7  
 F: - p ESI d Full ms2 817.00@cid45.00 [210.00-830.00]



**Abb. 42:** MS<sup>2</sup>-Spektrum des [M-H]<sup>-</sup> Ions mit  $m/z$  815 des SQDG-Standards unter Bildung der Fragmentionen [a]  $m/z$  559 und [b]  $m/z$  537 unter (-)ESI-Bedingungen [KHS\_78\_1\_SQDG Standard]

Für die Fragmentionen [a] und [b] konnten folgende Daten ermittelt werden:

Scan Modus [ $m/z$ ]	$m/z$ [relative Intensität (%)]
MS <sup>2</sup> [815]	537 ([b], 100), 559 ([a], 80)

Basierend auf diesen Resultaten kann gezeigt werden, dass das Fragmentierungsverhalten des kommerziellen SQDG-Standards dem von Verbindung **22** entspricht. Das MS<sup>2</sup>-Massenspektrum (Abb. 42) zeigt ebenfalls wie Verbindung **22** die Fragmentionen [b]  $m/z$  537,3 und [a<sub>1</sub>]  $m/z$  559,3 durch neutrale Verluste des Palmitoyl- (C16:0) und des Linolenylrestes (C18:3) aus dem Molekülion  $m/z$  815,6. Weiterhin zeigte das MS<sup>3</sup>-Spektrum des Standards ebenfalls das charakteristische Fragmention  $m/z$  224,8 (nicht dargestellt).

Die Verbindungen **23** und **24** zeigten in den MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren ebenfalls die Fragmentionen [b]  $m/z$  537,3 sowie das charakteristische Fragmention der Sulfoquinovose mit  $m/z$  224,8. Weiterhin wurde im MS<sup>2</sup>-Massenspektrum der Verbindung **23** ein weiteres Fragmention [a<sub>2</sub>] mit  $m/z$  561,4 detektiert, welches auf einen Neutralverlust von Linolsäure (C18:2) vom Molekülion  $m/z$  817,5 hinweist. An der sn-2-Position dieses Fragmentions ist eine Palmitinsäure (C16:0) inkorporiert.

Die Verbindung **24** enthält im Molekül zwei Palmitinsäuren (C16:0). In einem ersten Schritt kommt es zur Abspaltung einer Palmitinsäure, so dass das Fragment [b] bei  $m/z$  537 entsteht. Ein zweiter Neutralverlust von  $m/z$  256 deutet auf die Abspaltung der zweiten Palmitinsäure zu dem Fragment [c]  $m/z$  283 hin.

Weiterhin wurden von den Verbindungen **22** – **24** MS<sup>3</sup>- und MS<sup>4</sup>-Massenspektren mittels UPLC-ESI-MS aufgenommen. Aus der Gesamtheit der massenspektrometrischen Daten konnten somit die in Abb. 43 dargestellten Strukturen sowie das Fragmentierungsverhalten postuliert werden. Die Daten der detektierten Fragmentationen sind in Tab. 10 dargestellt.

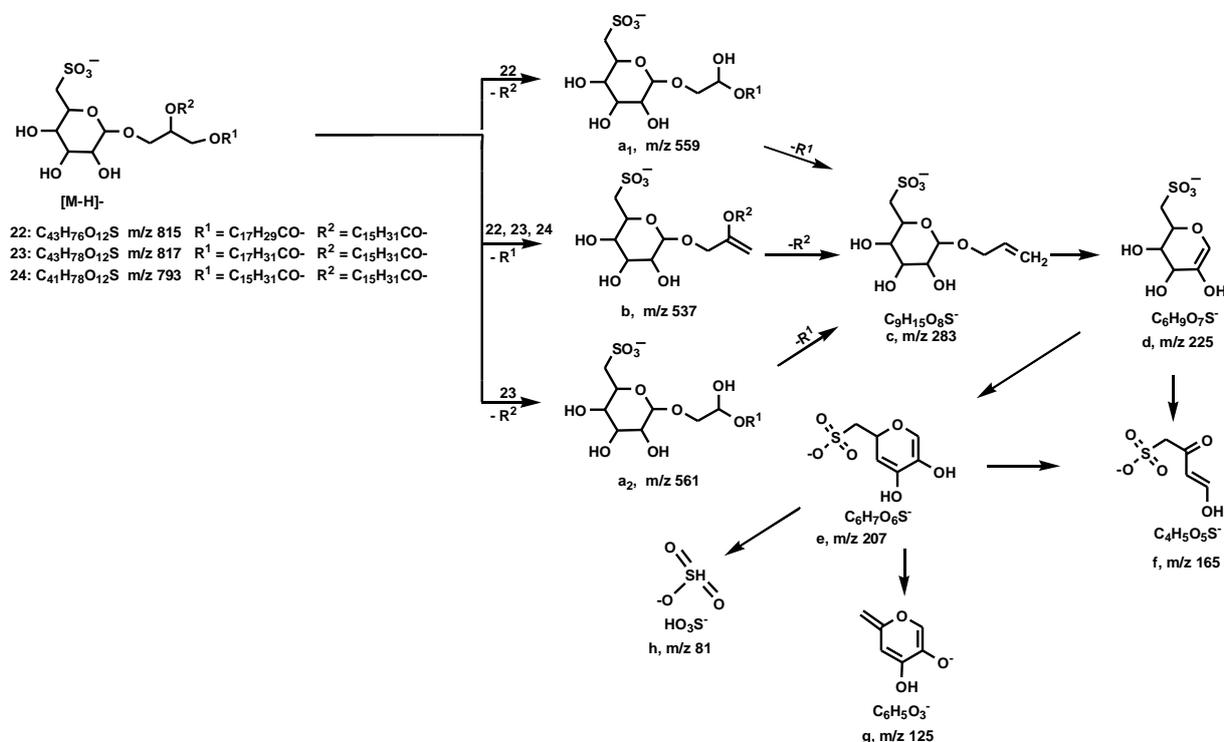


Abb. 43: Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung **22** - **24** unter (-)ESI-Bedingungen.

Tab. 10: (-) ESI-MS<sup>n</sup> Daten der Verbindungen 22 - 24

Verbindung	Scan Modus [ <i>m/z</i> ]	<i>m/z</i> [relative Intensität (%)]
22	MS <sup>2</sup> [815]	537 ([b], 100), 559 ([a <sub>1</sub> ], 38)
	MS <sup>3</sup> [815 → 537]	225 ([d], 100), 207 ([e], 7), 165 ([f], 12), 283 ([c], 26)
23	MS <sup>2</sup> [817]	537 ([b]), 100), 561 ([a <sub>2</sub> ], 32)
	MS <sup>3</sup> [817 → 537]	225 ([d]), 100), 165 ([f], 30), 207 ([e], 9), 283 ([c], 3)
24	MS <sup>2</sup> [793]	537 ([b], 100), 225 ([d], 20)
	MS <sup>3</sup> [793 → 537]	283 ([c], 42), 207 ([e], 53), 225 ([d], 100)
	MS <sup>4</sup> [793 → 537 → 225]	207 ([e], 52), 165 ([f], 60), 125 ([g], 100), 81 ([h], 27)

Die Gesamtheit der massenspektrometrischen sowie die in der Literatur veröffentlichten Daten untermauern die postulierten SQDG-Strukturen der Verbindungen **22–24**. Sulfoquinovosyldiacylglyceride (1,2-di-O-acyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-sn-glycerol) sind mit 2 Fettsäuren verestert, wobei sich in ihren Massenspektren charakteristische Neutralverluste der jeweiligen Fettsäuren (Palmitinsäure, Linolsäure, Linolensäure etc.) unter Entstehung des charakteristischen Fragmentes C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub>S mit *m/z* 225 findet [293–296]. Die natürlichen SQDG's weisen hierbei ausschließlich eine α-anomere Glycosidkonformation auf [297]. Da aufgrund der durchgeführten massenspektrometrischen Analysen eine Zuordnung der Position der Acylreste am Glyceridgerüst, welches glycosidisch am Sulfonozucker gebunden ist, nicht möglich ist, wird die in der Literatur [293,298,299] postulierte Position der Acylreste angenommen.

**Tab. 11:** Mögliche Position der Acylgruppen der Verbindungen 22-24 (\* angenommene Position gemäß Referenzsubstanzen)

Verbindung	MS <sup>1</sup> (m/z)	m/z (calc.)	Acylreste	
			sn-1-Position *	sn-2-Position *
22	815,5	815,49	Linolensäure (C18:3)	Palmitinsäure (C16:0)
23	817,5	817,51	Linolsäure (C18:2)	Palmitinsäure (C16:0)
24	793,5	793,51	Palmitinsäure (C16:0)	Palmitinsäure (C16:0)

Sulfolipide (insbesondere die SQDG's) stellen eine Substanzklasse dar, die bereits in verschiedenen Mikroalgen der Abteilung Rhodophyta z.B. *Porphyridium purpureum* [300], der Abteilung Heterokontophyta z.B. *Heterosigma carterae*, *Phaeodactylum tricorntum* [299], *Heterosigma caterae* [301] und *Pavlova lutheri* [302], sowie den Makroalgen *Gigartina tenella* [303] und *Caulerpa racemosa* [304] identifiziert werden konnten. Weiterhin ist ihr Vorkommen in Cyanobakterien z.B. *Lyngbya lagerheimii* [305], *Oscillatoria raoi* [306], *Arthrospira platensis*, *Scytonema hofmanni* und *Nostoc punctiforme* [298] sowie der Pflanze *Spinacia oleeracea* (Spinat) [307] bekannt. In Tab. 16 (Anhang) findet sich eine Übersicht der bisher beschriebenen Sulfolipide aus Mikroalgen. Die Biosynthese sowie die Funktion der SQDG z.B. als wichtiger Bestandteil der Thylakoidmembran photosynthetisch aktiver Organismen sind in verschiedenen Arbeiten beschrieben [308–315].

Die von Sulfolipiden beschriebenen Bioaktivitäten bezogen sich bisher auf immunosuppressive Wirkungen [297] sowie auf antivirale Wirkungen z.B. gegen HIV, HSV-1, HSV-2, Cox B3 [298,304,305,316–319]. Weiterhin sind antineoplastische Wirkungen sowie inhibierende Wirkung der enzymatischen Aktivitäten der DNA-Polymerasen pol  $\alpha$  und pol  $\beta$  sowie der  $\alpha$ -Glukosidase und der Caspase, bekannt [320–324]. *Brahmi et al.* wiesen eine Telomerase inhibierende Wirkung (antikanzerogen) der aus dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* isolierten SQDGs nach [325]. Darüber hinaus sind anti-inflammatorische Aktivitäten [326] und anti-proliferative Wirkungen auf verschiedene humane Krebszelllinien beschrieben [327–330] sowie eine prophylaktische Wirkung gegen eine *Mykobakterium tuberculosis*-Infektion bekannt [331]. Antibakterielle Wirkungen von Sulfolipiden gegen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [332] [oder *B. subtilis* und *E.coli* [333] aus verschiedenen makrophytischen Algen konnten bereits ebenfalls nachgewiesen werden. Ebenso sind eine antiprotozoale Aktivität von Sulfolipiden [334] sowie die Wirkung bei entzündlichen Hauterkrankungen, insbesondere bei *Psoriasis* beschrieben [335]. In Bezug auf  $\beta$ -amyloid-assoziierte Erkrankungen oder Alzheimer ist in zwei japanischen Patenten beschrieben dass SQDG als „Gehirn Neuronen-Aktivator“ [336] bei  $\beta$ -amyloid-assoziierte Erkrankungen sowie aufgrund der Caspase inhibierenden Eigenschaft als aktive Komponenten bei Alzheimer [324] eingesetzt werden könnten. Eine Enzyminhibierende Wirkung gegen QC ist bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Bei den Analysen der massenspektrometrischen Daten der aktivitätsrelevanten Verbindungen **22** - **24** fielen zwei weitere Verbindungen auf, die das gleiche Fragmentierungsverhalten unter Bildung des charakteristischen Fragmentions [d] der Sulfoquinovose mit  $m/z$  225 zeigten. Da anzunehmen war, dass es sich bei diesen Verbindungen ebenso um Sulfolipide handeln kann, wurden auch diese beiden Verbindungen strukturell charakterisiert.

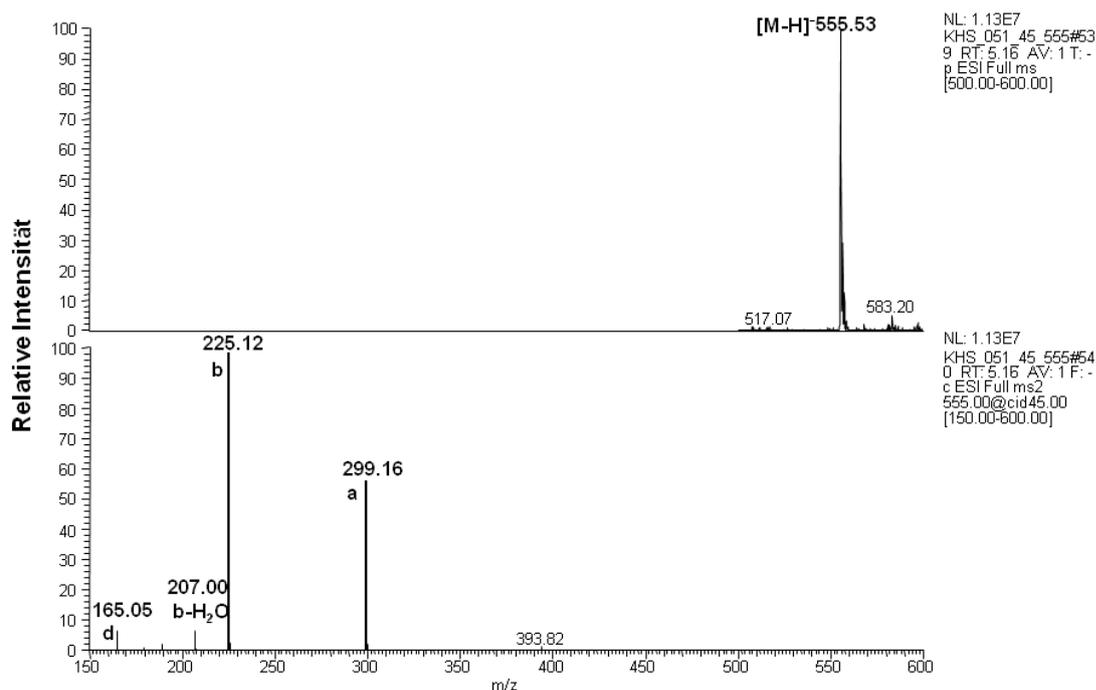
### Verbindung 25 – 26

Auch bei diesen Verbindungen erfolgte zunächst die Kalkulation der nachfolgenden Summenformeln durch die Bestimmung der möglichen Elementarzusammensetzung anhand der hochauflösenden ESI-FTICR-MS-Daten:

- **25:** 555 / (555,28479 [M-H]<sup>-</sup> cal. für **C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>11</sub>S** 555,28446)
- **26:** 317 / (317,05452 [M-H]<sup>-</sup> cal. für **C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>S** 317,05479)

Anhand der vorhandenen MS<sup>2</sup>- MS<sup>4</sup>-Daten der UPLC-ESI-MS Analysen der Extrakte konnten für die Verbindungen **25** und **26** Strukturen sowie das Fragmentierungsverhalten verifiziert werden.

In der nachfolgenden Abbildungen sind die MS<sup>1</sup>- und MS<sup>2</sup>-Massenspektren der Verbindung **25** mit dem Molekülion [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  555,5 dargestellt.

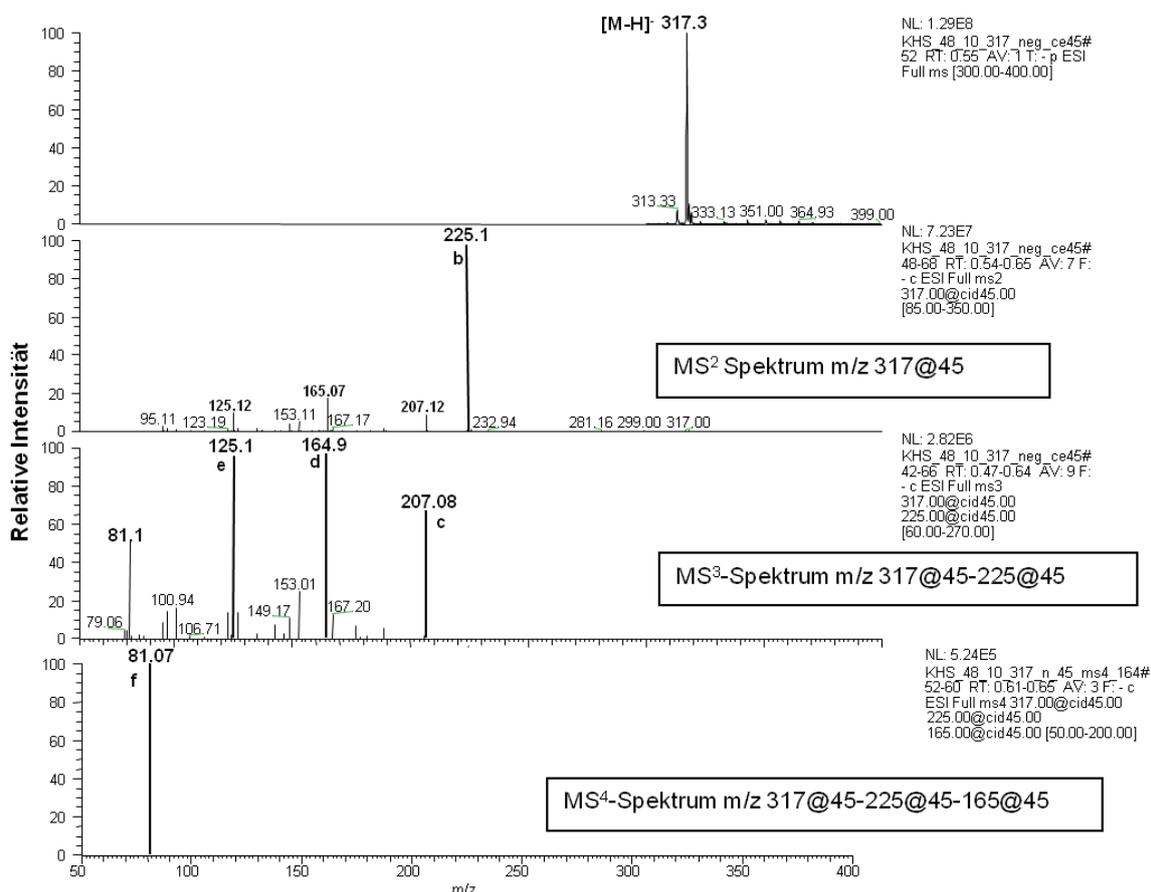


**Abb. 44:** MS<sup>1</sup>-Spektrum des [M-H]<sup>-</sup> Ions mit  $m/z$  555 der Verbindung **25** unter (-)ESI-Bedingungen (1); MS<sup>2</sup>-Spektrum (2) unter Bildung der Fragmentionen [a]  $m/z$  299 und [b]  $m/z$  225 sowie des Fragmentions [c] mit  $m/z$  207 und [d] mit  $m/z$  165. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 45 % bei (-)ESI eingesetzt. [KHS\_051\_45]

Wie auch die Verbindungen **22** – **24** zeigt das MS<sup>2</sup>-Spektrum (Abb. 44) der Verbindung **25** das charakteristische Fragmentation der Sulfoquinovose mit  $m/z$  225,1 sowie ein durch den neutralen Verlust von Palmitinsäure (MW 256) unter Bildung des Fragmentions [a] mit  $m/z$  299,1. Ein weiteres Fragmention, welches auf eine zweite Fettsäure hinweist, konnte nicht

detektiert werden, so dass es sich bei dieser Verbindung wahrscheinlich um ein Sulfoquino-vosylmonoacylglycerid (SQMG) handelt. Als Fettsäure liegt Palmitinsäure vor.

Nachfolgend sind die Massenspektren der Verbindung **26**, welche zu strukturellen Charakterisierungen herangezogen wurden, dargestellt.



**Abb. 45:** MS<sup>1</sup>-Spektrum des [M-H]<sup>-</sup> Ions mit  $m/z$  317 der Verbindung **26** unter (-)ESI-Bedingungen (1); MS<sup>2</sup>-Spektrum (2) unter Bildung der Fragmentionen [b] mit  $m/z$  225; MS<sup>3</sup>-Spektrum (3) des Fragmentions [b] unter Bildung der Ionen [c] mit  $m/z$  207, [d] mit  $m/z$  165 und [e] mit  $m/z$  125; MS<sup>4</sup>-Spektrum (4) des Tochterions [d] unter Bildung des Fragmentions [f] mit  $m/z$  81. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 45 % bei (-)ESI eingesetzt. [KHS\_048\_10\_317\_neg\_ce45 / KHS\_048\_10\_317\_n\_ms4\_165]

Das MS<sup>1</sup>-Massenspektrum zeigt das Molekülion [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  317,3. Hiervon ausgehend konnte im MS<sup>2</sup> Spektrum das charakteristische Fragmention [b] mit  $m/z$  225,1 selektiert werden. Die MS<sup>3</sup>- und MS<sup>4</sup>-Spektren zeigen ausgehend vom charakteristischen Fragmention [b] dessen Fragmentierungsverhalten in die Fragmentionen [c], [d], [e] bis hin zu SO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> [f].

Anhand der von den Verbindungen **25 – 26** aufgenommenen Massenspektren konnten die in Abb. 46 dargestellten Strukturen sowie das Fragmentierungsverhalten postuliert werden. Die Daten der detektierten Fragmentionen sind in Tab. 12 dargestellt.

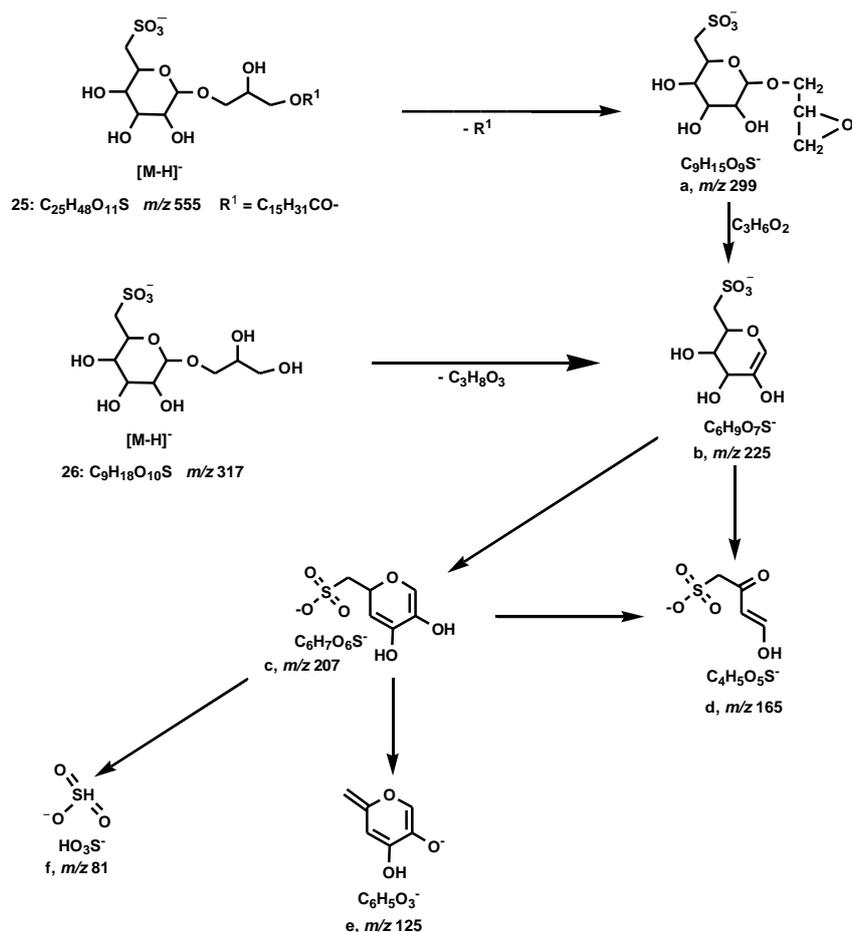


Abb. 46: Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung **25** und **26** unter (-)ESI-Bedingungen.

Tab. 12: (-) ESI-MS<sup>n</sup> Daten der Verbindungen **25** und **26**

Verbindung	Scan Modus [ $m/z$ ]	$m/z$ [relative Intensität (%)]
25	MS <sup>2</sup> [555]	299 ([a], 70), <b>225</b> ([b], <b>100</b> ), 207 [c], 9)
	MS <sup>3</sup> [555 → 299]	<b>255</b> ([b], <b>100</b> ), 165 ([d], 38)
26	MS <sup>2</sup> [317]	<b>225</b> ([b], <b>100</b> )
	MS <sup>3</sup> [317 → 225]	207 ([c], 38), 165 ([d], 84), <b>125</b> ([e], <b>100</b> )
	MS <sup>4</sup> [317 → 225 → 165]	<b>81</b> ([f], <b>100</b> )

Anhand der massenspektrometrischen Daten kann postuliert werden, dass es sich bei Verbindung **25** wahrscheinlich um 1-O-palmitoyl-3-O(6'-sulfo- $\alpha$ -quinovopyranosyl)-glycerol und bei Verbindung **26** um 1-O-(6-Deoxy-6-sulfogluco-pyranosyl)-glycerol handelt, die ebenfalls der Substanzklasse der Sulfolipide zugeordnet werden kann.

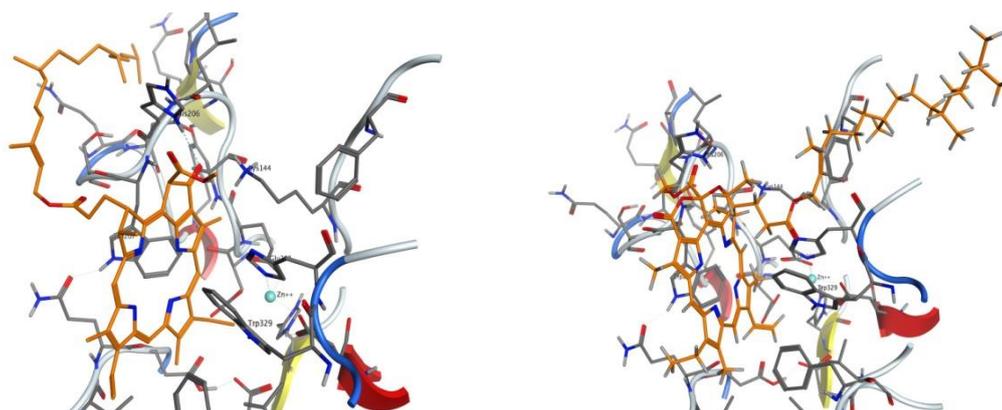


Die Phytolkette kann auch bei dieser Verbindung nicht eindeutig vom Dockingprogramm platziert werden und nimmt unterschiedlichste Anordnungen an der Oberfläche des Proteins ein.

#### **Verbindung 21 - $C_{55}H_{74}N_4O_5$**

Die Docking Studien zeigten, dass keine der Konformationen eine Koordination am Zink ermöglicht. Vielmehr lag das Ringsystem vor der Öffnung des aktiven Zentrums der QC und versperrte somit den Zugang zum Zinkatom für Substrate oder andere Inhibitoren.

Die Phytolkette konnte ebenfalls nicht eindeutig vom Dockingprogramm platziert werden.



**Abb. 48:** Konformation mit dem Ringsystem in der aktiven Tasche der QC der Verbindung **21** (links) und der Verbindung **20** (rechts)

Die Docking Studien der Porphyrinderivate (Verbindungen **20** und **21**) zeigten, dass das Ringsystem (Porphyrinring) beider Verbindungen sich vor die Öffnung des aktiven Zentrums der hQC lagert und somit eine Interaktion mit dem Enzym nicht möglich ist. Eine direkte inhibitorische Wirkung dieser Verbindungen auf die aktive Tasche der hQC scheint somit nicht möglich zu sein.

#### **Verbindung 22 – $C_{43}H_{76}O_{12}S$**

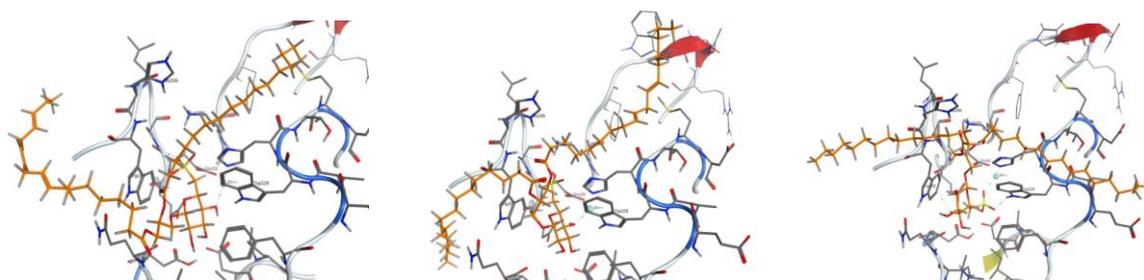
Diese Verbindung wies in der besten Konformation mit einer Koordination keine Bindung am Zinkatom auf. Von den 30 Dockingkonformationen koordinierten 8 am Zinkatom in der aktiven Tasche. Die Alkylketten konnte nicht eindeutig vom Dockingprogramm platziert werden.

#### **Verbindung 23 – $C_{43}H_{78}O_{12}S$**

Wie auch bei den anderen beiden SQDG's wies die Verbindung **23** in der besten Konformation keine Koordination am Zinkatom auf. Von den 30 durchgeführten Dockingkonformationen zeigten 11 eine Koordination am Zink. Auch bei dieser Verbindung konnten die Alkylketten nicht eindeutig vom Dockingprogramm platziert werden.

#### **Verbindung 24 – $C_{41}H_{78}O_{12}S$**

Die Dockingstudien der Verbindung **24** zeigten, dass 7 von 30 Dockingkonformationen am Zink koordinierten, wobei die energetisch beste Konformation Nr. 27 ebenfalls nicht am Zink koordiniert war. Die Fettsäuren (Alkylketten) konnten wie auch bei der vorhergehenden Verbindung vom Dockingprogramm nicht eindeutig platziert werden.



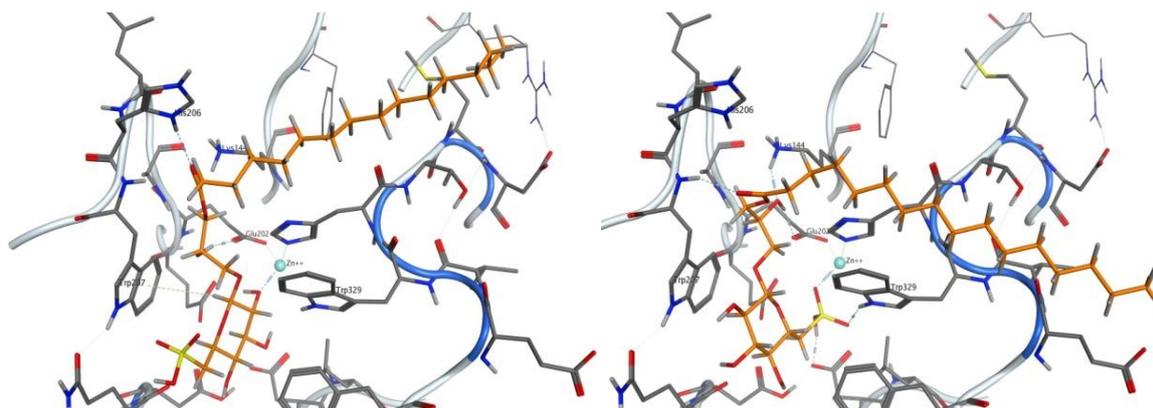
**Abb. 49:** Zink-koordinierende Konformation der Verbindung **22** (links), **23** (Mitte) und **24** (rechts) in der aktiven Tasche der QC

### **Verbindung 25 – $C_{25}H_{48}O_{11}S$**

Die Verbindung **25** wies die beste bindende Konformation mit einer Koordination der OH-Gruppe am Zink im aktiven Zentrum auf. Weiterhin ging die Verbindung H-Brückenbindungen zu den Aminosäuren Glu202 und His206 ein.

In anderen Dockingkonformationen, in denen die Sulfoxygruppe am Zink koordinierte, konnte die Verbindung H-Brückenbindungen zu den Aminosäuren Lys144, Trp329 und Asp159 knüpfen.

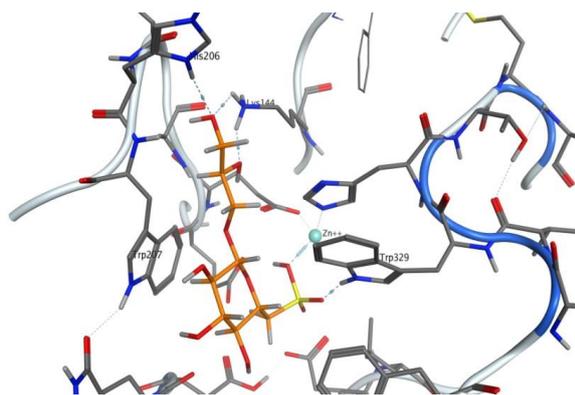
Die Fettsäure (Alkylkette) konnte vom Dockingprogramm nicht eindeutig platziert werden und nahm somit unterschiedlichste Anordnungen an der Oberfläche des Proteins ein.



**Abb. 50:** Beste bindende Konformation der Verbindung **25** in der aktiven Tasche der QC – keine Zn-Koordination (links) und eine Sulfoxy-Zn-koordinierte Konformation der Verbindung **25** (rechts)

### **Verbindung 26 – $C_9H_{18}O_{10}S$**

Die Verbindung **26** wies die beste bindende Konformation mit einer Koordination der Sulfoxygruppe am Zinkatom in der aktiven Tasche der QC auf. Des Weiteren ging die Verbindung Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Lys144, His206 und Trp329 ein, sowie eine hydrophobe Wechselwirkung zum Ringsystem des Trp207.



**Abb. 51:** Beste bindende Konformation, Sulfoxy-Zn koordiniert, der Verbindung **26** in der aktiven Tasche der QC

Für die als aktivitätsrelevant identifizierte Sulfolipide (Verbindung **22 - 26**) konnten die Dockingstudien zeigen, dass die Verbindungen im aktiven Zentrum binden können und energiearme Konformationen existieren, die am Zinkatom koordinieren und H-Brückenbindungen zu funktionell wichtigen Aminosäuren knüpfen können. Die Verbindungen könnten somit potentielle QC-Inhibitoren darstellen.

#### **5.4.4. Aktivitätsnachweis der identifizierten QC-aktivitätsrelevanten Metaboliten**

Zum Nachweis QC-inhibierender Eigenschaften der als aktivitätsrelevant identifizierten Verbindungen, wurde jeweils eine Referenzverbindung der beiden Substanzklassen der Porphyrinderivate sowie der Sulfolipide im QC-Assay auf die inhibierenden Aktivitäten untersucht. Als Referenzverbindung der Porphyrin-Derivate wurde ein Phaeophytin a - Standard (LGC-Standards) und für die Substanzklasse der Sulfolipide ein SQDG-Standard (Lipid Products) zur Testung herangezogen.

##### **Porphyrin Derivate (Verbindungen 20 und 21) – Phaeophytin a Standard**

Die Testung des Phaeophytin a - Standards erfolgte im QC-Assay in den Konzentrationen 0,25 mg/mL und 0,025 mg/mL i.A..

In beiden Konzentrationen konnte der Phaeophytin a Standard die QC nicht inhibieren [KHS\_119]. Hiermit konnte die mittels Molecular Modeling festgestellte Tendenz der Nicht-Inhibierung bestätigt werden und die Porphyrinderivate (Verbindung **20** und **21**) als potentielle QC-Inhibitoren ausgeschlossen werden.

##### **Sulfolipide (Verbindungen 22 – 26) – SQDG Standard**

Der SQDG Standard wurde ebenfalls im QC-Assay nach der in *Kap. 6.5* beschriebenen Methodik in den beiden Konzentrationen 0,25 mg/mL und 0,025 mg/mL i.A. untersucht.

Hierbei konnten der SQDG Standard die QC in beiden Konzentrationen um 77 % bzw. 76 % inhibieren. Sulfolipide stellen somit potentielle QC-Inhibitoren dar [KHS\_73].

Der für den SQDG-Standard ermittelte  $IC_{50}$ -Wert betrug  $10,9 \mu\text{M}$  [KHS\_82 / PQ1582] und liegt damit sogar unterhalb des Bereichs (stärkere Wirksamkeit), der aus dem Patent *Inhibitors of glutaminy cyclase, 2007* [337] beschriebenen QC-Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten von  $0,22 \mu\text{M} - 14 \mu\text{M}$ .

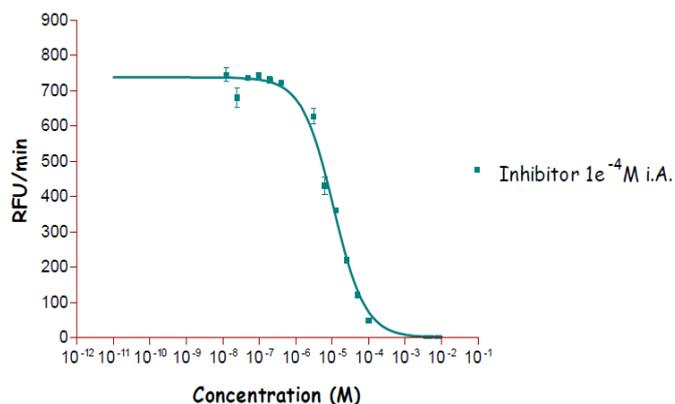


Abb. 52:  $IC_{50}$  Bestimmung des SQDG Standards

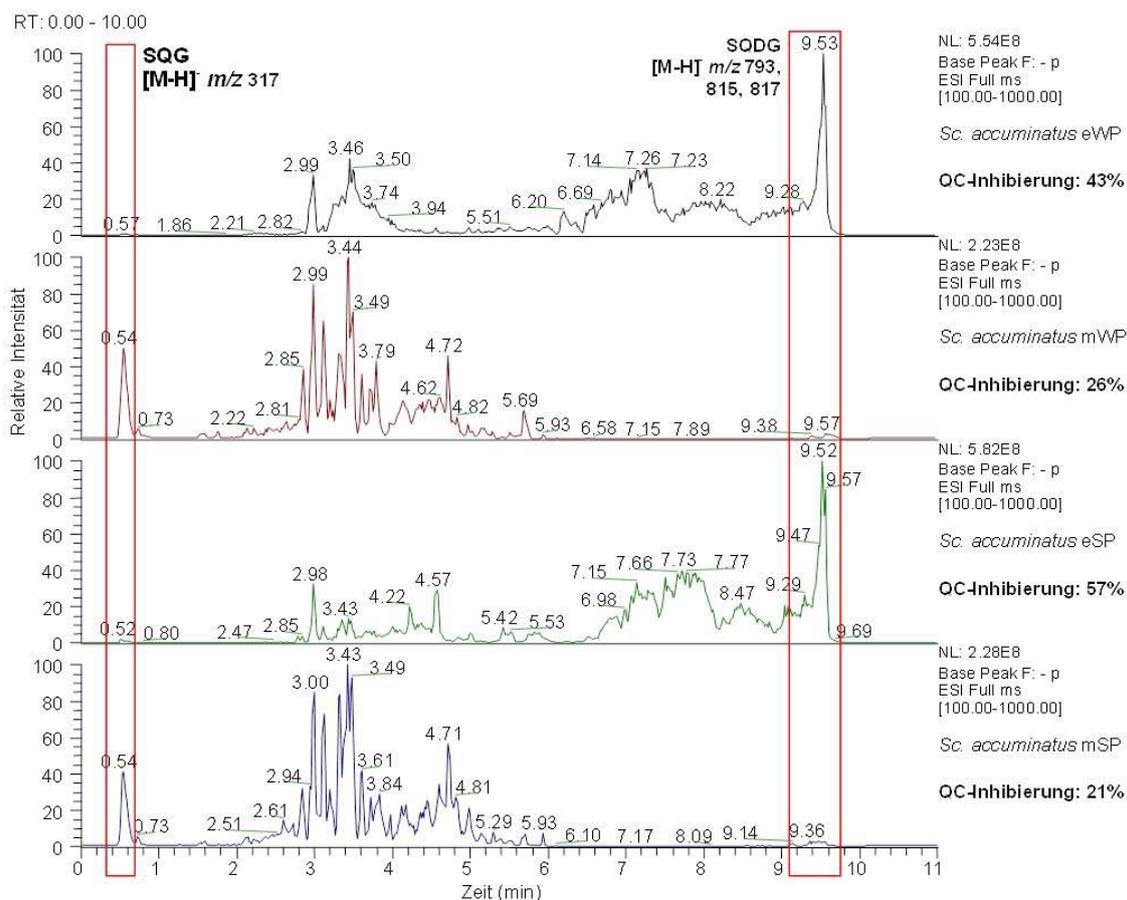
Für die als aktivitätsrelevant identifizierten Sulfolipide konnte somit ein Aktivitätsnachweis erbracht und nachgewiesen werden, dass es sich um QC-inhibierende Verbindungen handelt.

#### 5.4.5. Isolierung der QC-aktiven Metaboliten (Sulfolipide)

Um letztendlich zu bestätigen, dass die als QC-inhibierende Verbindungen identifizierten Sulfolipide (Verbindung **22** – **26**) tatsächlich eine inhibierende Wirkung besitzen, wurden diese aus methanolischen Algenextrakten isoliert und im QC-Assay auf ihre inhibierende Aktivität untersucht.

Zunächst wurden die vorhandenen massenspektrometrischen Daten der methanolischen Extrakte im negativen Ionenmodus (UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>, ESI-FTICR-MS, ESI-MS) im Hinblick auf das Vorhandensein von Sulfolipiden ausgewertet [KHS\_48]. Da es sich bei dieser Substanzklasse um primäre Metaboliten photosynthetisch aktiver Organismen handelt, konnten sie in allen Extrakten massenspektrometrisch (ESI-FTICR-MS, ESI-MS) detektiert werden. Jedoch unterschieden sich die Extrakte in der Präsenz der jeweiligen Sulfolipide. Während in einigen Extrakten die Verbindung **26** (SQG) und **25** (SQMG) detektiert werden konnten, waren in anderen Extrakten nur die Verbindungen **22**, **23** und **24** (SQDG) oder Verbindung **26** (SQG) vorhanden. Auch konnten in einigen Extrakten nur die Verbindung **25** (SQMG) sowie die Verbindungen **22**, **23** und **24** (SQDG) detektiert werden.

Am Beispiel der nachfolgenden Base-Peak Chromatogramme der *S. acuminatus* Extrakte (Abb. 53) ist dargestellt, dass die SQGs und SQDGs eindeutig Peaks im Retentionszeitbereich von 0,51 – 0,59 min bzw. 9,4 – 9,6 min zugeordnet werden konnten. Eine eindeutige Peakzuordnung der SQMG war nicht möglich.

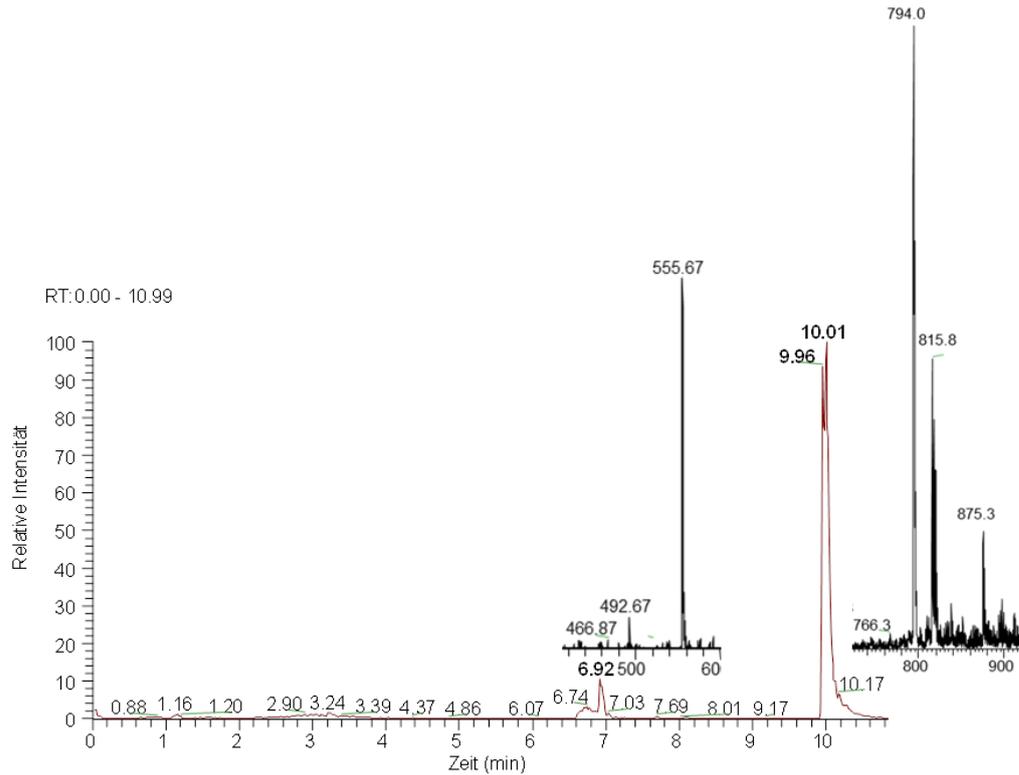


**Abb. 53:** Base-Peak Chromatogramme der *S. acuminatus* Extrakte im negativen Ionenmodus [KHS\_48]

Wie am Beispiel der Chromatogramme der *S. acuminatus* Extrakte (Abb. 53) zu sehen ist, wiesen die Extrakte mit SQDG-Peak keinen bzw. nur einen geringen SQG-Peak auf. Betrachtet man die QC-Inhibierungen der Extrakte, so weisen die Extrakte mit SQDG's eine deutlich höhere Inhibierung auf als die Extrakte mit SQG-Peak.

Für die Isolierung der Sulfolipide wurde eine von Naumann (2009) publizierte Methode zur Aufreinigung von Sulfolipiden unter der Verwendung von NH<sub>2</sub>-Kartuschen (SPE) angewendet [298]. Ausgewählt hierfür wurde der methanolische Extrakt *S. acuminatus* eSP, von denen 25 mg auf konditionierte NH<sub>2</sub>-Kartuschen aufgegeben und eine zweistufige Elution vorgenommen wurde (s. Kap.6.8.4.1). Anschließend erfolgte ein Waschschrift (Folch Wash), um enthaltene Salze wie z.B. Ammoniumacetat zu entfernen und die Sulfolipide in die organische Methanol/Dichlormethan Phase zu überführen. Die so gewonnene Fraktion (6,5 mg) wurde mittels UPLC-ESI-MS sowie ESI-API-MS auf das Vorhandensein von Sulfolipiden überprüft. Als Referenz wurde auch hierbei der SQDG-Standard (Lipid Products) hinzugezogen [KHS\_70 / KHS\_71 / KHS\_72 / KHS\_74].

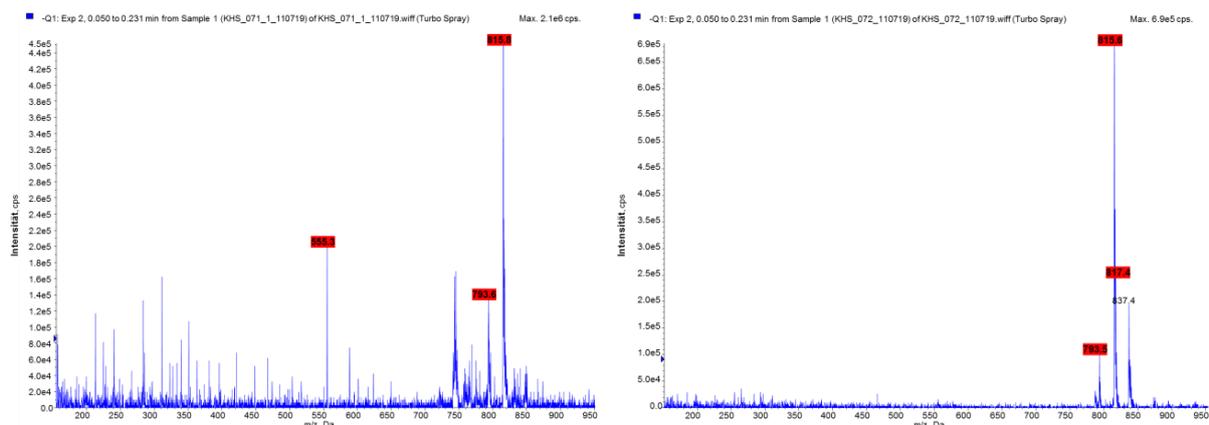
Die massenspektrometrische Untersuchung der Sulfolipid-Fraktion mittels UPLC-ESI-MS im negativen Ionenmodus zeigte im Base-Peak Chromatogramm (Abb. 54) einen Peak bei 9,9 – 10,0 min sowie bei 6,9 min. Des Weiteren sind kleine Peaks über den gesamten Retentionszeitbereich zu erkennen, welche auf Nebenverbindungen hindeuten.



**Abb. 54:** Base-Peak Chromatogramm und MS<sup>1</sup>Massenspektrum der Sulfolipid-Fraktion aus *S. acuminatus* eSP [KHS\_74]

Das MS<sup>1</sup>-Massenspektrum zeigt hierbei für die Retentionszeit von 6,9 min ein Molekülion [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  555, welches der Verbindung **25** entspricht. Der Peak bei der Retentionszeit von 9,9 – 10 min zeigt im MS<sup>1</sup>-Massenspektrum die Molekülionen [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  794 und 815. Es handelt sich somit um den Peak der SQDG, welcher bereits in den Base-Peak Chromatogrammen der *S. acuminatus* Extrakte (Abb. 53) als SQDG-Peak identifiziert wurde.

In nachfolgender Abb. 55 sind die mittels ESI-API-MS aufgenommenen Massenspektren der Sulfolipid-Fraktion im Vergleich zum SQDG-Standard dargestellt.



**Abb. 55:** ESI-API-MS Spektrum der Sulfolipid-Fraktion aus *S. acuminatus* eSP (links) im Vergleich zum SQDG Standard ESI-API-MS Spektrum (rechts) im negativen Ionenmodus [KHS\_071\_1\_110719 / KHS\_072\_110719]

Die Sulfolipid-Fraktion enthält wie auch der SQDG-Standard die Hauptverbindungen **22** mit [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  815 und **24** mit [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  793. Weiterhin ist in der Sulfolipid-Fraktion auch die Verbindung **25** mit [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  555 enthalten. Das im Standard enthaltene SQDG mit [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  837, welches mit einer Eicosapentaensäure (C20:5) sowie einer Palmitolein-

säure (C16:1) verestert ist, konnte in der aufgereinigten Fraktion nicht detektiert werden. Im Vergleich zum ESI-API-MS Spektrum des SQDG-Standards zeigt das Massenspektrum der Sulfolipid-Fraktion Sulfolipide und weitere bisher nicht identifizierte Verbindungen.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Fraktion sowie deren nachfolgend dargestellte dünnschichtchromatographische Analyse zeigten, dass mittels der  $\text{NH}_2$ -Aufreinigungsmethode Sulfolipide aus dem methanolischen Extrakt von *S. acuminatus* eSP aufgereinigt werden konnten.

Die dünnschichtchromatographische Analyse der Sulfolipid-Fraktion im Vergleich zum SQDG-Standard erfolgte an Kieselgel 60 unter der Verwendung des Laufmittelsystems DC1.

Der durch die Reaktion mit Orcinol visualisierte Spot der gereinigten Fraktion entspricht im Retentionsverhalten dem des SQDG-Standards mit einem  $R_f$ -Wert von 0,79 (Abb. 56).

Um zu bestätigen, dass die aus der Mikroalge *S. acuminatus* isolierten Sulfolipide ebenso wie der SQDG-Standard die QC inhibieren, wurden die Sulfolipid-Fraktion und der SQDG-Standard in zwei Konzentrationen im QC-Assay getestet.

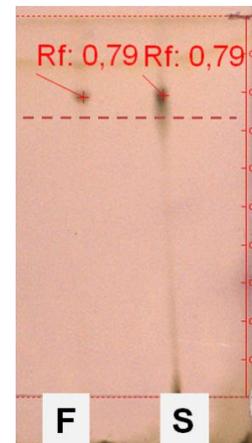


Abb. 56: Analytische DC (Kieselgel 60, DC1., der Fraktion (F) von *S. acuminatus* eSP und dem SQDG-Standard (S) [KHS\_81]

In nachfolgender Abb. 57 sind die ermittelten QC-Inhibierungen der Sulfolipid-Fraktion und des SQDG-Standards dargestellt.

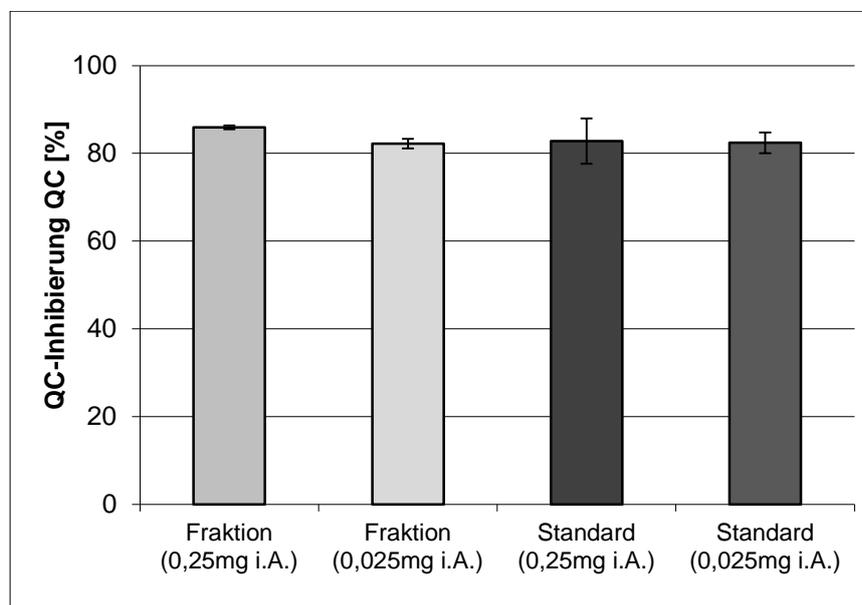


Abb. 57: QC-Inhibierung der Sulfolipid-Fraktion aus *S. acuminatus* eSP und des SQDG Standards [KHS\_73].

Sowohl die Sulfolipid-Fraktion als auch der SQDG-Standard konnten die QC in beiden Konzentrationen (0,25 mg/mL und 0,025 mg/mL i.A.) mit 86 % / 82 % und 83 % / 82 % inhibieren. Die Ergebnisse des QC-Assays bestätigten, dass es sich bei den Sulfolipiden um potentielle QC-Inhibitoren handelt.

## 5.5. Charakterisierung weiterer Algenmetabolite

Im nachfolgenden Kapitel soll gezeigt werden, dass die angewendete AcorA-Methode die Charakterisierung weiterer, nicht aktivitätsrelevanter Metaboliten ermöglicht. Aufgrund der vorhandenen massenspektrometrischen Daten (ESI-FTICR-MS, UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>) können Metaboliten aus den komplexen Algenextrakten charakterisiert und Aussagen über das Metabolitenspektrum der Extrakte getroffen werden.

Aus den methanolischen Extrakten *S. producto-capitatus* eWP und *S. pectinatus* mSP konnten Verbindungen der Substanzklasse der Galaktolipide mittels der vorhandenen UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>- und ESI-FTICR-MS-Daten identifiziert und charakterisiert sowie deren Strukturen verifiziert werden.

Die Vorgehensweise zur Charakterisierung weiterer Algenmetaboliten mittels der vorhandenen massenspektrometrischen Daten gestaltete sich hierbei wie folgt:

Zunächst wurden die UPLC-Chromatogramme im Hinblick auf wiederkehrende Peakmuster ausgewertet, dann den eluierten Verbindungen die entsprechenden  $m/z$  Werte zugeordnet und anhand der ESI-FTICR-MS-Daten für die Verbindungen mögliche Elementarzusammensetzungen kalkuliert. Weiterhin wurden die vorhandenen MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Daten für weitere Strukturcharakterisierungen herangezogen und mögliche Strukturvorschläge erarbeitet.

Bei der Auswertung der UPLC-Basepeak-Chromatogramme fiel bei allen Extrakten ein wiederkehrendes Peakmuster im Retentionszeitbereich von 2,8 – 3,8 min auf (s. Abb. 58).

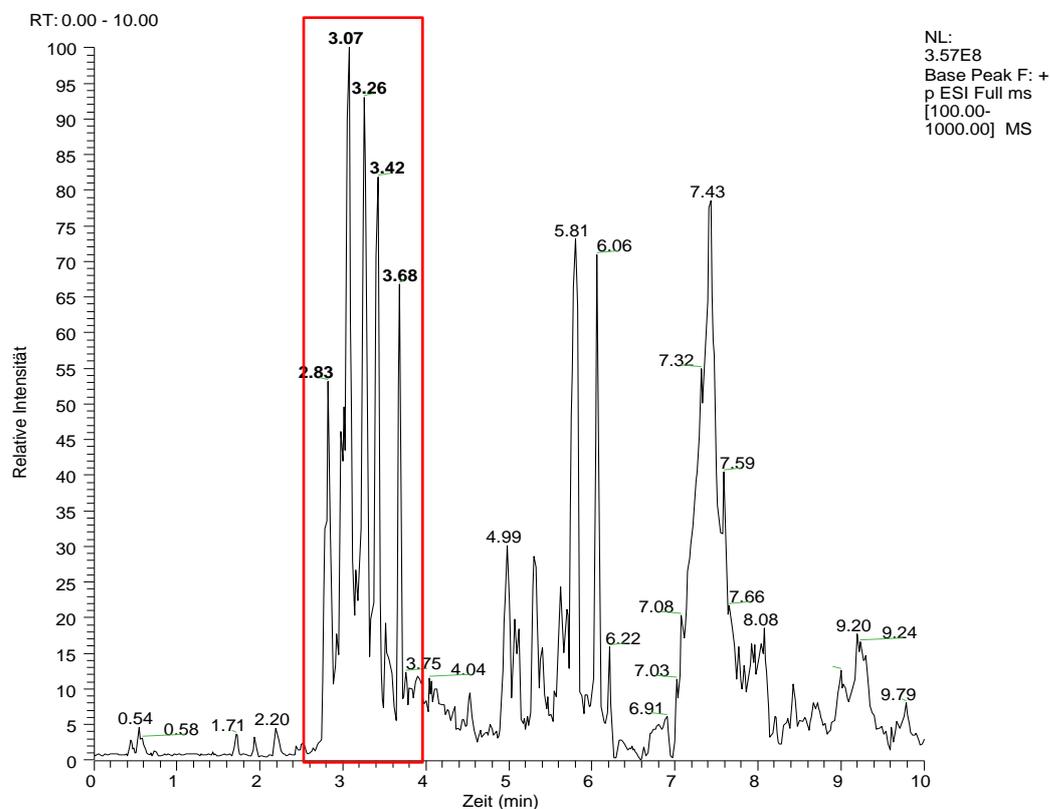
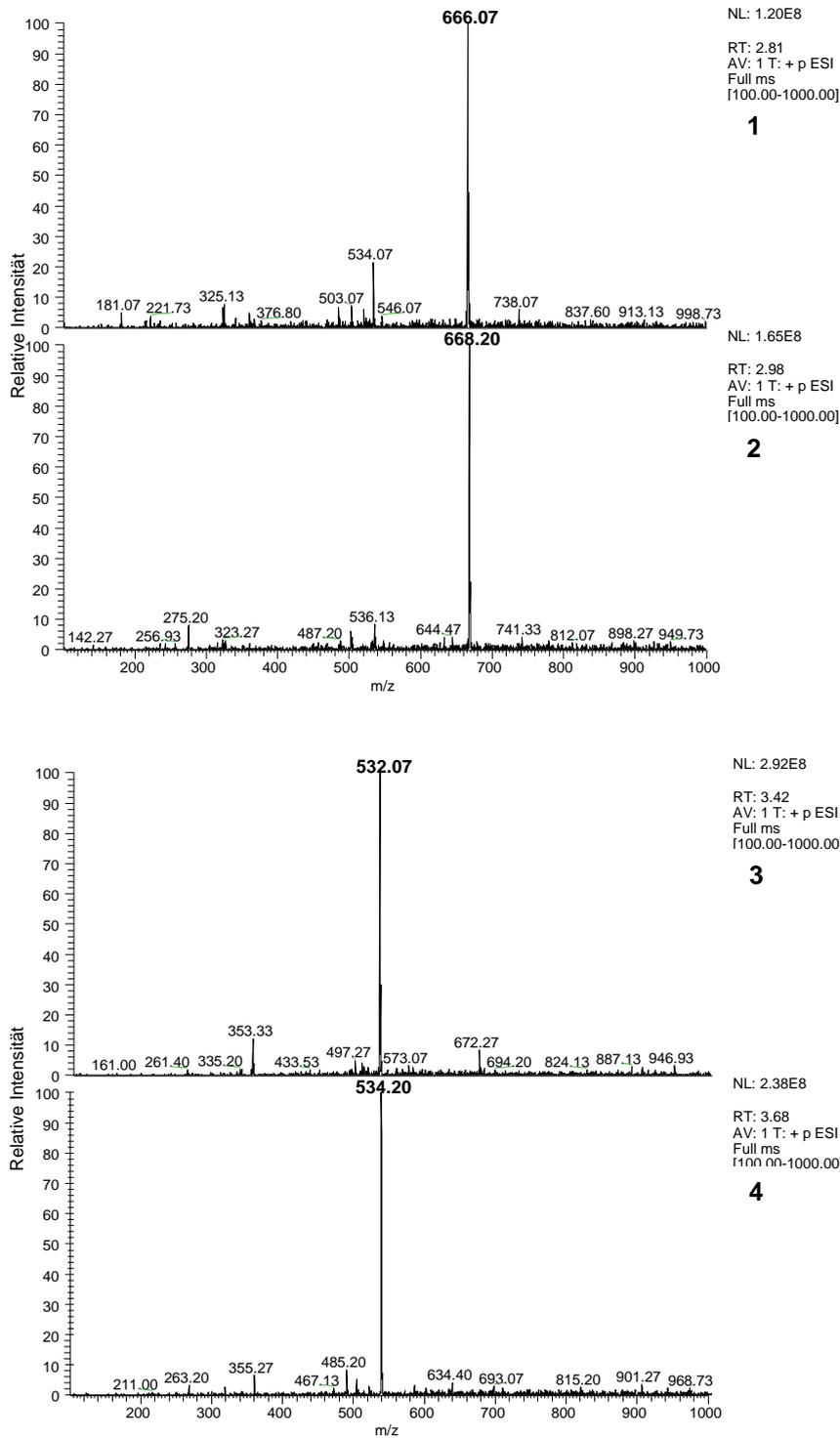


Abb. 58: Base-Peak-Chromatogramm des methanolischen *S. producto-capitatus* eWP Extraktes [KHS\_48\_1]

## 5. Ergebnisse & Diskussion

Die in diesem Retentionszeitbereich eluierten Verbindungen wiesen folgende MS<sup>1</sup>-Spektren, welche nachfolgend in Auswahl (Abb. 59) dargestellt sind, auf.



**Abb. 59:** MS<sup>1</sup>-Spektren des aus dem Base-Peak Chromatogramm (Abb. 58) detektierten Peaks bei  $t_R$ : 2,81 min (1), bei  $t_R$ : 2,98 min (2), bei  $t_R$ : 3,42 min (3), bei  $t_R$ : 3,68 min (4) unter (+)ESI-Bedingungen [KHS\_48\_01\_pMS]

Wie die MS<sup>1</sup>-Spektren in Abb. 59 zeigen, konnten den [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>-Ionen der eluierten Verbindungen folgende *m/z* Werte zugeordnet werden:

- t<sub>R</sub>: 2,81 min – *m/z* [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>666 – Verbindung **27**,
- t<sub>R</sub>: 2,98 min – *m/z* [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>668 – Verbindung **28**,
- t<sub>R</sub>: 3,07 min – *m/z* [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>504 – Verbindung **29**,
- t<sub>R</sub>: 3,26 min – *m/z* [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>506 – Verbindung **30**,
- t<sub>R</sub>: 3,42 min – *m/z* [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>532 – Verbindung **31**,
- t<sub>R</sub>: 3,68 min – *m/z* [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>534 – Verbindung **32**.

Aus den zugehörigen [M+Na]<sup>+</sup>-Ionen der hochauflösenden ESI-FTICR-MS Analysen konnten folgende mögliche Elementarzusammensetzungen der Verbindungen kalkuliert werden:

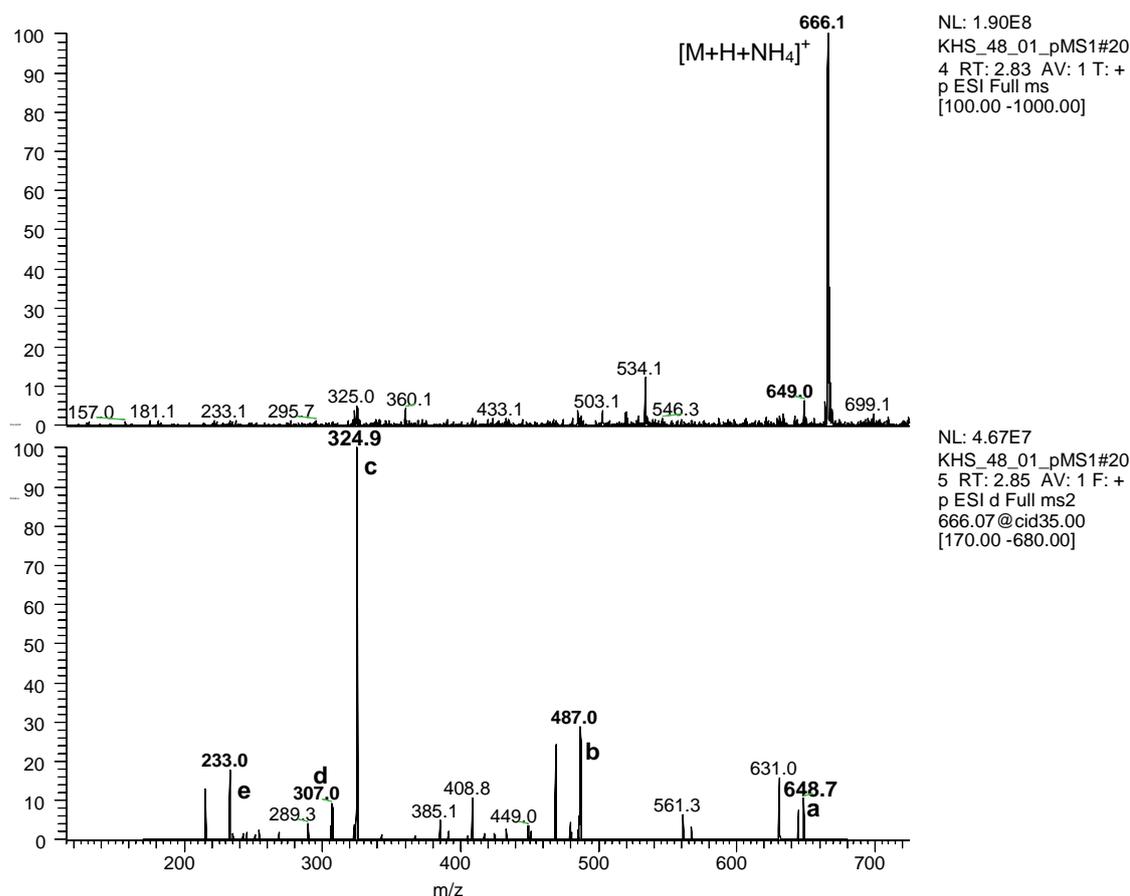
- **Verbindung 27:** 666 / (666,37203 [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> calc. for C<sub>31</sub>H<sub>55</sub>O<sub>14</sub>N<sub>1</sub> 666,36953),
- **Verbindung 28:** 668 / (668,38410 [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> calc. for C<sub>31</sub>H<sub>57</sub>O<sub>14</sub>N<sub>1</sub> 668,38518),
- **Verbindung 29:** 486 / (509,27232 [M+Na]<sup>+</sup> calc. for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> 509,27210),
- **Verbindung 30:** 488 / (511,28791 [M+Na]<sup>+</sup> calc. for C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> 511,28775),
- **Verbindung 31:** 514 / (537,30387 [M+Na]<sup>+</sup> calc. for C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> 537,30340),
- **Verbindung 32:** 516 / (539,31914 [M+Na]<sup>+</sup> calc. for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> 539,31905).

Da die Analysen der Extrakte mittels einer *data dependent MS-Methode* in einem Massenbereich *m/z* 100 – 1000 Da durchgeführt wurde, bei der eine automatische Fragmentierung der Metaboliten mit Intensitäten > 105 a.i. in simultanen MS/MS-Experimenten erfolgten, standen MS<sup>2</sup>-Daten zur Erarbeitung von Strukturvorschlägen zur Verfügung. Weiterhin konnten MS<sup>3</sup>-Daten aus der ebenfalls automatischen Fragmentierung der Tochterionen in simultanen MS<sup>3</sup>-Experimenten für die Strukturcharakterisierung herangezogen werden.

**Verbindung 27 und 28**

Anhand der vorhandenen MS<sup>2</sup>-Daten der UPLC-ESI-MS Analysen des *S. producto-capitatus* eWP Extraktes konnten die Verbindung **27** und **28** mit einer Retentionszeit von 2,8 bzw. 2,9 min in ihrer Struktur charakterisiert werden.

In der nachfolgenden Abb. 60 sind die Massenspektren der Verbindung **27** mit dem Molekülion  $[M+H+NH_4]^+$  bei  $m/z$  666 sowie die entstandenen Fragmentionen zu sehen.



**Abb. 60:** MS<sup>1</sup>-Spektrum des  $[M+H+NH_4]^+$  Ions mit  $m/z$  666 der Verbindung **27** unter (+)ESI-Bedingungen (1); MS<sup>2</sup>-Spektrum (2) unter Bildung des  $[M+H]^+$  Ions [a]  $m/z$  649 sowie der Fragmentionen [b]  $m/z$  487, [c]  $m/z$  325, [d]  $m/z$  307 und des Fragmentions [e] mit  $m/z$  233. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (+)ESI eingesetzt [KHS\_48\_01\_pMS1].

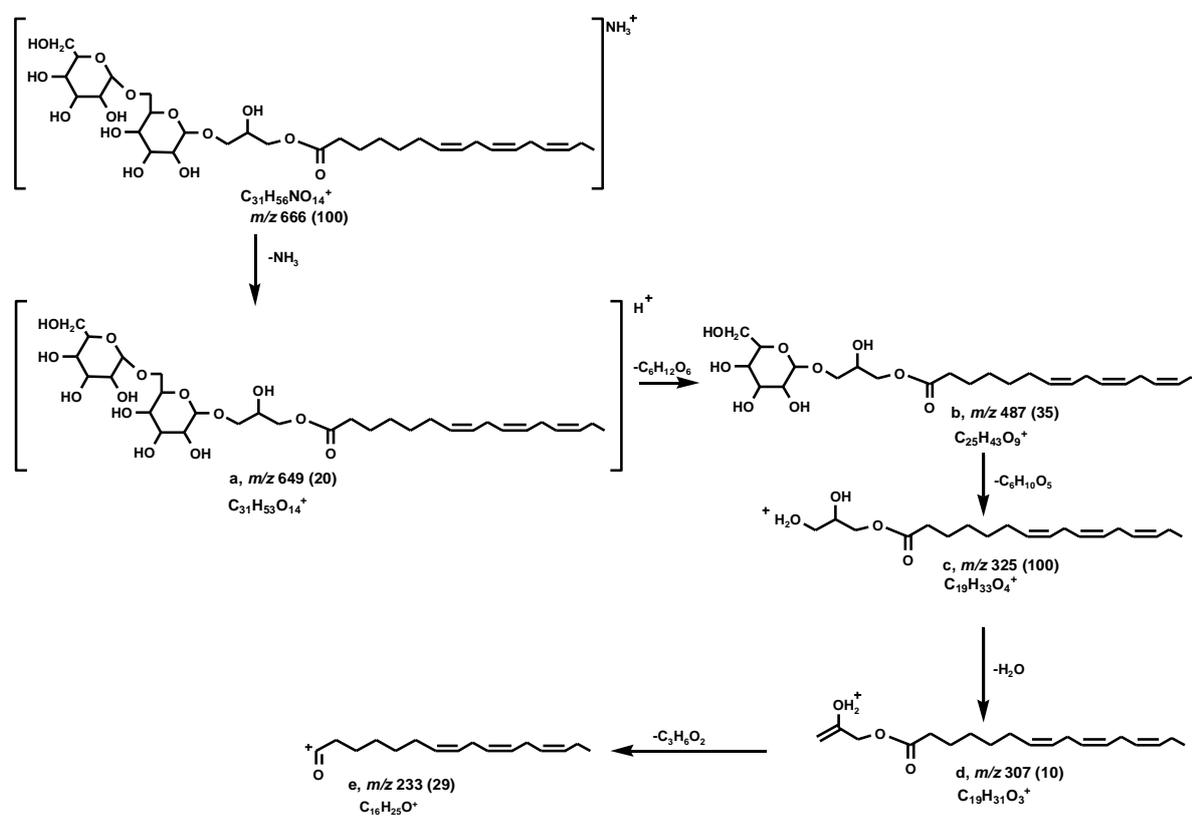
Ausgehend von der für die Verbindung **27** detektierten Molekülmasse mit  $m/z$  649,0 konnte in der Ionenfalle die Bildung der MS<sup>2</sup>-Fragmentionen [b] bei  $m/z$  487,0 und [c] bei  $m/z$  324,9 induziert werden. Bei der Entstehung der Fragmentionen [b] und [c] kommt es jeweils zu einem Neutralverlust von 162. Dies deutet auf zwei Zuckermoleküle (Hexosen) hin, welche schrittweise abgespalten wurden. Das Fragmention [c] ( $m/z$  324,9) stellt nach Abspaltung der zwei Zuckermoleküle, den mit einer Fettsäurekette veresterten Glycerinrest dar, welches unter Wasserabspaltung zu Fragmention [d] und dann weiter zu einer C16:3 Fettsäure [e] gespalten wird. Verbindungen, welche aus einem oder mehreren Zuckermolekülen (vorrangig Galaktose) bestehen und über Glycerin mit einer oder zwei Fettsäuren verestert sind, können der Substanzklasse der Glykolipide (Galaktolipide) zugeordnet werden. Die Biosyn-

these der Galaktolipide geht von Glycerin-3-phosphat und UDP-Galaktose aus. Hierbei ist das Galaktolipid Digalaktosyldiacylglycerin (1,2-Di-O-acyl-3-O--D-Galaktopyranosyl-(16)-D-Galaktopyranosyl-sn-Glycerin; DGDG) sowie das Monogalaktosyldiacylglycerin (1,2-Di-O-acyl-3-D-D-Galaktopyranosyl-sn-Glycerin; MGDG) die am weitesten verbreiteten Lipide photosynthetischer Organismen. Sie sind vorrangig in den Chloroplastenmembranen aufzufinden [338,339].

Aufgrund der massenspektrometrischen Daten lassen sich in Bezug auf die Fettsäuren die Länge der Kohlenwasserstoffkette und das Vorhandensein von Einfach- und Doppelbindungen, jedoch nicht eine Positionierung der Doppelbindungen vornehmen.

Bei der Verbindung **27** handelt es sich somit wahrscheinlich um ein Galaktolipid, welches aus zwei Galaktoseeinheiten verestert über Glycerin mit einer C16:3 Fettsäure besteht.

Aus der Gesamtheit der massenspektrometrischen Daten konnten somit die in Abb. 61 dargestellten Strukturen postuliert werden.



**Abb. 61:** Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung **27** unter (+)ESI-Bedingungen

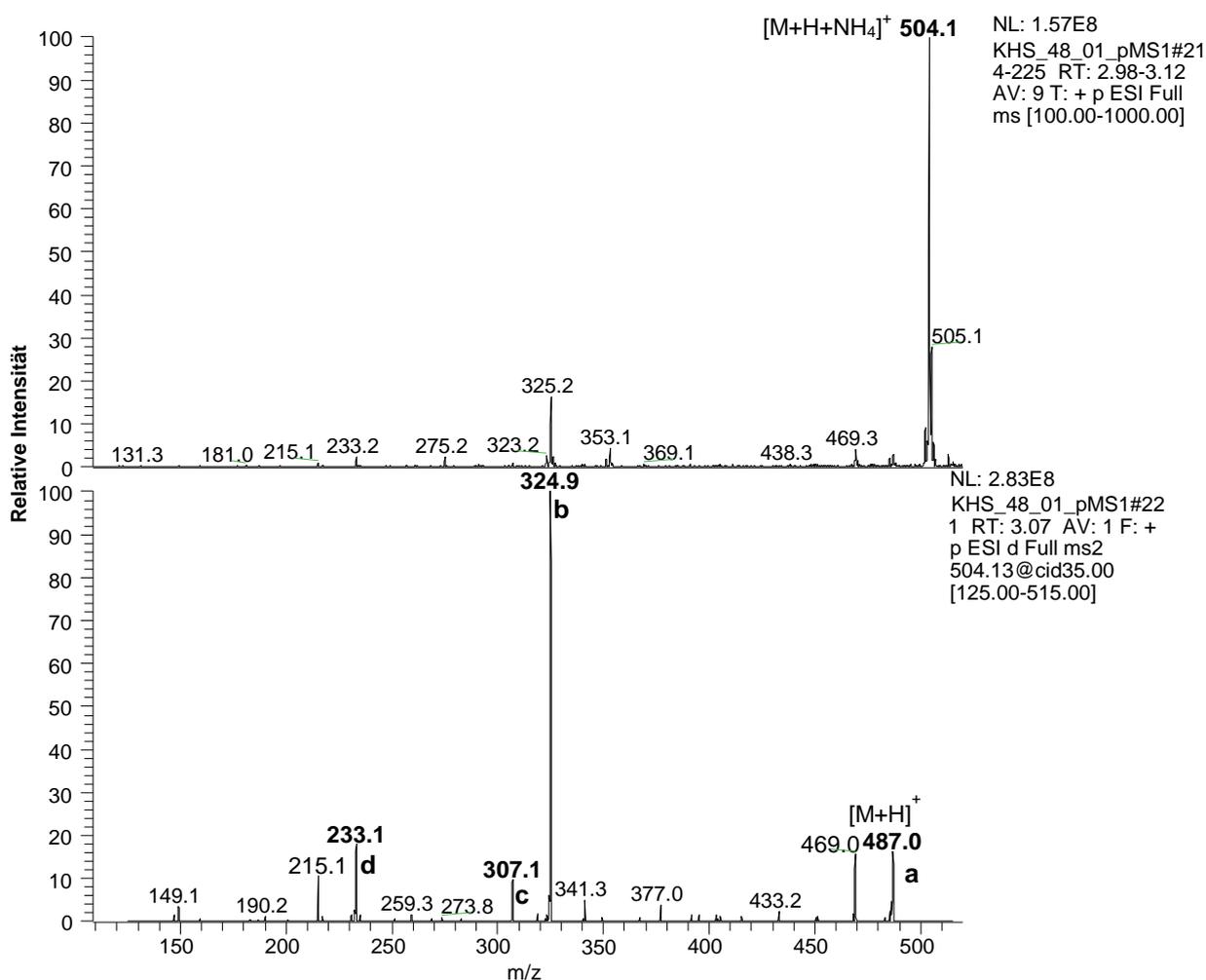
Die Verbindung **28** zeigte in den MS<sup>2</sup>-Spektren (nicht dargestellt) das gleiche Fragmentierungsverhalten unter Bildung der Fragmentionen [b]  $m/z$  489, [c]  $m/z$  327, [d]  $m/z$  309, sowie [e]  $m/z$  235. Aufgrund von 2 H-Atomen zusätzlich, im Vergleich zu Verbindung 17, wiesen das  $[M+H]^+$ -Ion sowie die Fragmentionen auch eine um 2 höhere Molmasse auf. Jedoch konnten auch bei dieser Verbindung die neutralen Verluste von 162 bei der Entstehung der Fragmentionen [b] und [c], die auf die Abspaltung von Galaktose hinweisen, detektiert werden. Nach Wasserabspaltung entsteht auch bei dieser Verbindung das Fragmention [d], wel-

ches auf eine C16-Fettsäure mit 2 Doppelbindungen hinweist. Bei der Verbindung **28** mit der Summenformel  $C_{31}H_{56}O_{14}$  handelt es sich somit wahrscheinlich ebenfalls um ein Galaktolipid.

### Verbindung 29 und 30

Für die Verbindung **29** und **30** konnten ebenfalls anhand der vorhandenen MS<sup>2</sup>-Daten der UPLC-ESI-MS-Analysen des *S. producto-capitatus* eWP Extraktes aufgrund des Fragmentierungsverhaltens Strukturvorschläge abgeleitet werden.

In Abb. 62 sind die Massenspektren der Verbindung **29** mit dem Molekülion  $[M+H+NH_4]^+$  bei  $m/z$  504 sowie die entstandenen Fragmentionen zu sehen.

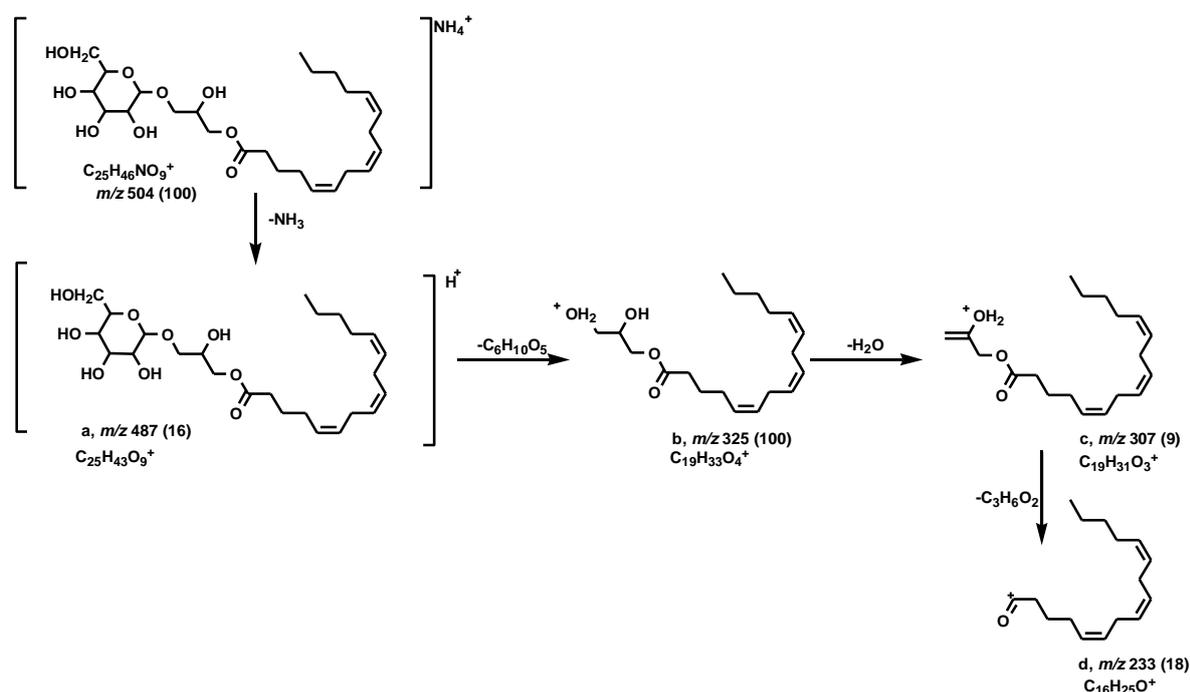


**Abb. 62:** MS<sup>1</sup>-Spektrum des  $[M+H+NH_4]^+$  Ions mit  $m/z$  504 der Verbindung **29** unter (+)ESI-Bedingungen (1); MS<sup>2</sup>-Spektrum (2) unter Bildung des  $[M+H]^+$  Ions [a]  $m/z$  487, sowie der Fragmentionen [b]  $m/z$  325, [c]  $m/z$  307 und [d]  $m/z$  233. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (+)ESI eingesetzt [KHS\_48\_01\_pMS1]

Ausgehend von der für die Verbindung **29** detektierten Molekülmasse  $[M+H+NH_4]^+$  mit  $m/z$  487,0 konnte in der Ionenfalle die Bildung der MS<sup>2</sup>-Fragmentionen [b] bei  $m/z$  324,9 und [c] bei  $m/z$  307,1 induziert werden. Die Entstehung des Fragmention [b] ( $m/z$  324,9 mit einem Neutralverlust von 162, entstand ebenso bei der Verbindung **27** und lässt sich ebenso auf

die Abspaltung eines Galaktosemoleküls zurückzuführen. Das Fragmentation [c] ( $m/z$  307,1), welches auch bei Verbindung **27** detektiert werden konnte, stellt nach der Abspaltung des Zuckermoleküls den mit einer Fettsäurekette veresterten Glycerinrest dar. Dieses fragmentiert unter Wasserabspaltung weiter zu Fragmentation [d], einer C16:3 Fettsäure. Wie auch bei den Verbindungen **27** und **28** kann anhand der massenspektrometrischen Daten keine eindeutige Positionierung der Doppelbindungen vorgenommen werden. Es handelt sich bei dieser Verbindung **29** wahrscheinlich wiederum um ein Galaktolipid, welches jedoch nur aus einer Galaktoseeinheit, verestert über Glycerin mit einer C16:3 Fettsäure, besteht.

Aus den massenspektrometrischen Daten konnten somit die in Abb. 63 dargestellten Strukturen postuliert werden.



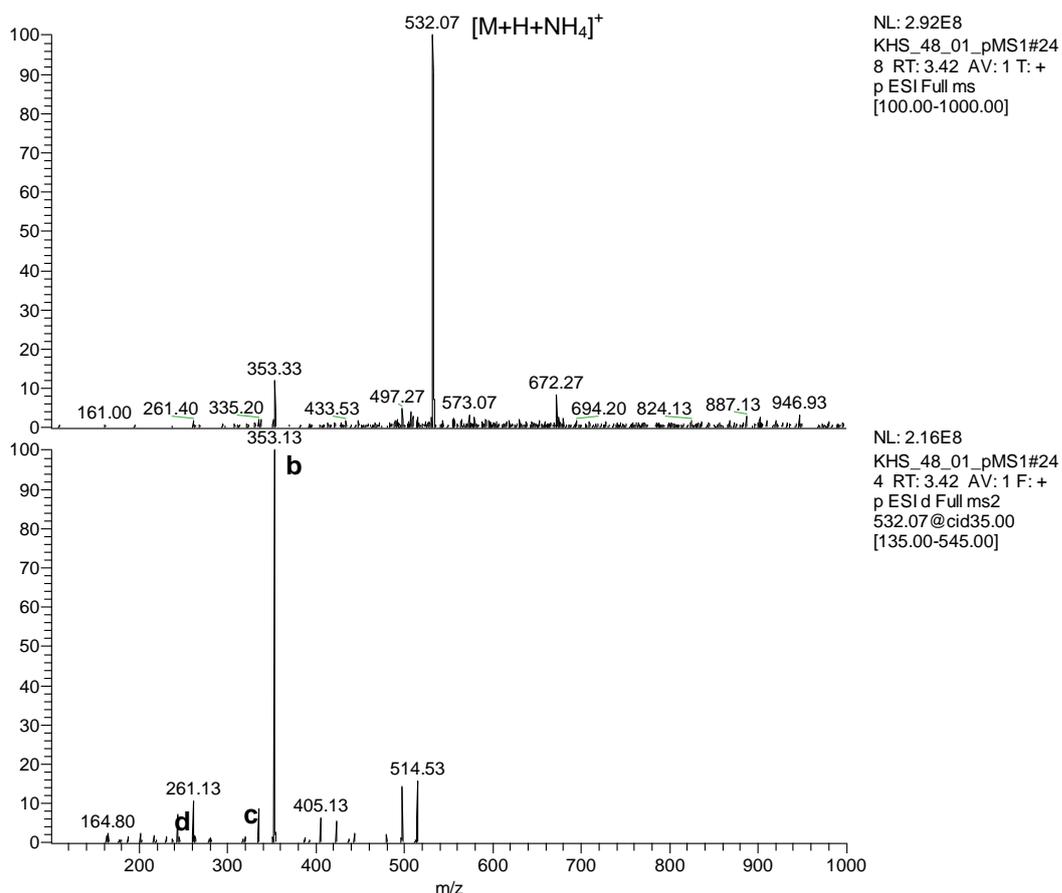
**Abb. 63:** Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung **29** unter (+)ESI-Bedingungen

Wie Verbindung **29** zeigte auch Verbindung **30** in den  $MS^2$ -Spektren (nicht dargestellt) das gleiche Fragmentierungsverhalten unter Bildung der Fragmentationen [b]  $m/z$  327, [c]  $m/z$  309, sowie [e]  $m/z$  235. Die für diese Verbindung kalkulierte Summenformel  $C_{25}H_{44}O_9$  weist also 2 H-Atome mehr im Molekül auf, so dass das  $[M+H]^+$ -Ion sowie die Fragmentation auch eine um 2 höhere Molmasse aufwiesen. Jedoch konnten auch bei dieser Verbindung die neutralen Verluste von 162 bei der Entstehung der Fragmentationen [b] und [c], die auf die Abspaltung von Galaktose hinweisen, detektiert werden. Nach Wasserabspaltung entsteht ebenso bei dieser Verbindung das Fragmentation [d], welches auf eine C16-Fettsäure mit 2 Doppelbindungen hinweist. Bei der Verbindung **28** mit der Summenformel  $C_{31}H_{56}O_{14}$  handelt es sich somit wahrscheinlich auch um ein Galaktolipid.

**Verbindung 31 und 32**

Die Verbindung **31** und **32** konnten ebenfalls anhand der vorhandenen MS<sup>2</sup>-Daten des *S. producto-capitatus* eWP Extraktes und des daraus abgeleiteten Fragmentierungsverhaltens in ihrer möglichen Struktur verifiziert werden.

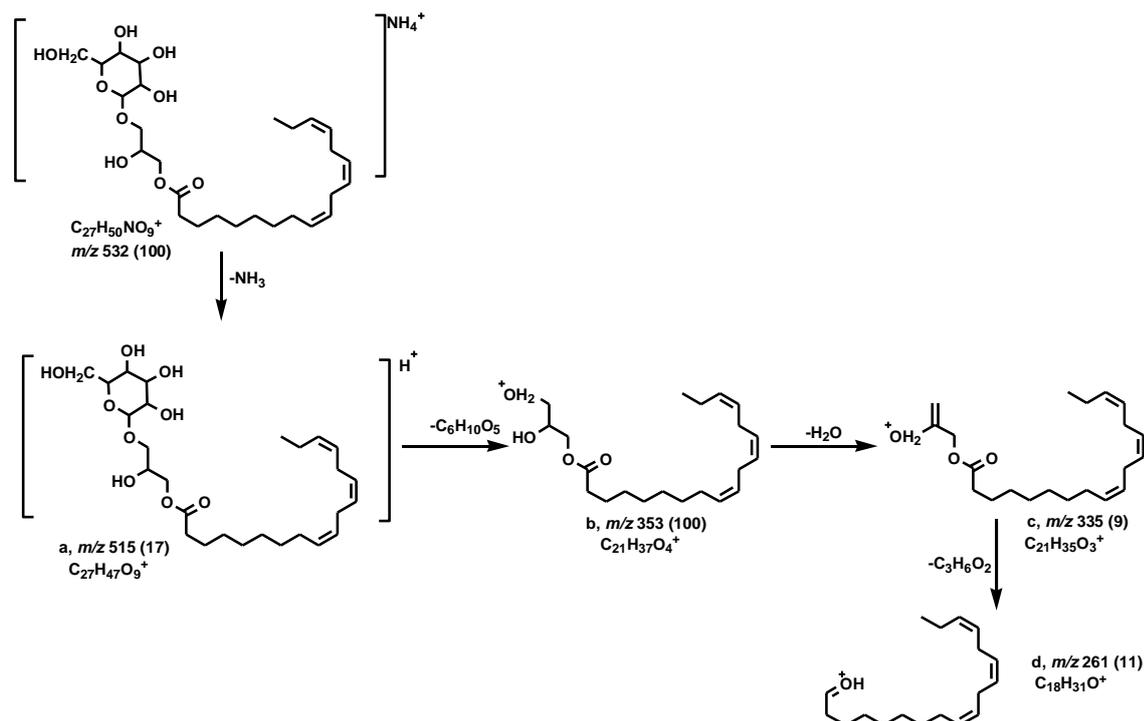
Die Abb. 64 zeigt die Massenspektren der Verbindung **31** mit dem Molekülion  $[M+H+NH_4]^+$  bei  $m/z$  532 sowie den induzierten Fragmentationen im MS<sup>2</sup>.



**Abb. 64:** MS<sup>1</sup>-Spektrum des  $[M+H+NH_4]^+$  Ions mit  $m/z$  532 der Verbindung **31** unter (+)ESI-Bedingungen (1); MS<sup>2</sup>-Spektrum (2) unter Bildung des  $[M+H]^+$  Ions [a]  $m/z$  515, sowie der Fragmentionen [b]  $m/z$  353, [c]  $m/z$  335, [d]  $m/z$  261. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (+)ESI eingesetzt [KHS\_48\_01\_pMS1].

Ausgehend von der für die Verbindung **31** detektierten Molekülmasse  $[M+H+NH_4]^+$  mit  $m/z$  532,1 konnten die Fragmentionen [b] bei  $m/z$  353,1 und [c] bei  $m/z$  335,2 detektiert werden. Wie bei den Verbindungen **29** und **30** deuten auch dieses zum einen auf den Verlust eines Galaktosemoleküls mit einem Neutralverlust von 162 sowie die Abspaltung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls hin. Somit stellt das detektierte Fragmention [c], welches ebenfalls bei der Verbindung **27** detektiert werden konnte, den mit einer Fettsäurekette veresterten Glycerinrest dar. Nach Abspaltung des Glycerinrestes (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) entsteht als Fragmention [d] eine C18:3-Fettsäure. Wie auch bei den Verbindungen **27** – **30** kann anhand der massenspektrometrischen Daten keine eindeutige Positionierung der Doppelbindungen vorgenommen werden. Die aus den massenspektrometrischen Daten abgeleitete Fragmentierung in nachfolgender Abbildung schließt daraufhin, dass es sich bei der Verbindung **31** ebenfalls um ein Galaktoli-

pid, welches aus einer Galaktoseeinheit mit einer C18:3 Fettsäure z.B. Linolensäure besteht, handelt.



**Abb. 65:** Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung **31** unter (+)ESI-Bedingungen.

Die Verbindung **32** mit  $[\text{M}+\text{H}+\text{NH}_4]^+$  bei  $m/z$  534 besitzt in den  $\text{MS}^2$ -Spektren (nicht dargestellt) ein gleiches Fragmentierungsverhalten wie die Verbindung **31** unter Bildung der Fragmentationen [b] mit  $m/z$  355, [c]  $m/z$  337, sowie [d]  $m/z$  263, auf. Die kalkulierte Summenformel  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_9$  weist also 2 H-Atome mehr im Molekül auf, so dass das  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion sowie die Fragmentationen auch eine um 2 höhere Molmasse besitzen. Der ebenso detektierte Neutralverlust von 162 bei der Entstehung des Fragmentation [b], der auf die Abspaltung von Galaktose hinweist, sowie die Abspaltung eines Wassermoleküls (Fragmentation [c]) und des Glycerinrestes  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$  zu Fragmentation [d], untermauert die Annahme, dass es sich ebenfalls um ein Galaktolipid handelt. Das entstandene Fragmentation [d] weist darauf hin, dass die Verbindung ebenfalls eine C18-Fettsäure, jedoch mit 2 Doppelbindungen, enthält. Auch bei dieser Verbindung können die Positionen der vorhandenen Doppelbindungen nicht anhand der vorhandenen Daten bestimmt werden.

Bei den mittels der massenspektrometrischen Daten der Korrelations-Analyse charakterisierten, nicht aktivitätsrelevanten Verbindungen **27** – **32** handelt es sich um Galaktolipide, welche aus einem bzw. zwei Galaktosemolekülen bestehen und an der sn-3-Position mit einem Glycerol verbunden sind. Die Galaktolipide sind vermutlich, wie in der Literatur beschrieben, an der sn-1 und sn-2 Position mit den Fettsäuren verestert [340]. Bei den Fettsäuren handelt es sich um C18:3 und C18:2 sowie C16:3 und C16:2 Fettsäuren. Mit diesen Fettsäuren veresterte Galaktolipide bilden den Hauptbestandteil plastidärer Membranen [341]. C16- und C18-ungesättigte und gesättigte Fettsäuren sind die in Algen, insbesondere in Chlorophyta, am häufigsten detektierten Fettsäuren [342–344]. Galaktolipide werden, wie auch Sulfolipide und Phospholipide, den Glycerolipiden zugeordnet. Sie werden in Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) unterschieden, wobei MGDG's aus-

schließlich in der Thylakoidmembran der Chloroplasten, DGDG's aber auch in der extraplastidalen Membran zu finden sind [345]. Sie stellen also eine wichtige Klasse der Membranlipide dar. Bisher konnten schon zahlreiche MGDG's und DGDG's aus Rot-, Braun- und Grünalgen wie z.B. *Anfelia tobuchiensis* (Rhodophyta), *Ulva fenestrata* (Chlorophyta), *Laminaria japonica* (Chlorophyta), *Sargassum pallidum* (Phaeophyta), *Sargassum thunbergii* (Phaeophyta), *Exophyllum wentii* (Rhodophyta) und *Chondria armata* (Rhodophyta) isoliert werden. Weiterhin wurden für diese Lipide diverse bioaktive Eigenschaften beschrieben, wie z.B. eine anti-tumorale Aktivität von MGDG's aus *Chlorella vulgaris* [317].

Dieses Kapitel der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, dass der massenspektrometrische Datensatz zur Identifizierung nicht aktivitätsrelevanter Algenmetaboliten herangezogen werden kann. Es können somit weitere Metabolite identifiziert werden und wenn diese bekannte bioaktive Eigenschaften besitzen, können die Algenextrakte gezielt in weiteren Bioassays getestet werden.

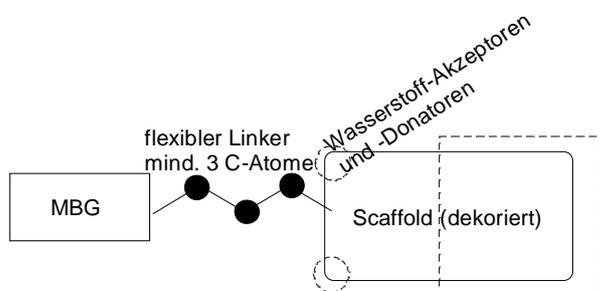
## 5.6. Diskussion der erzielten Ergebnisse und durchgeführten Arbeiten

### 5.6.1. Sulfolipide – neue QC-inhibierende Verbindungen aus Mikroalgen

Ziel der Arbeit war die Identifizierung, Charakterisierung und Isolierung QC-inhibierender Verbindungen aus Mikroalgen. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen 5 Verbindungen aus Mikroalgen als QC-Inhibitoren zu identifizieren. Bei den Verbindungen handelt es sich um die Sulfolipide 1-O-palmitoyl-2-O-linolenyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**22**), 1-O-linolyl-2-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**23**), 1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**24**), 1-O-palmitoyl-3-O(6'-sulfo- $\alpha$ -quinovopyranosyl)-glycerol (**25**) und 1-O-(6-Deoxy-6-sulfo-glucopyranosyl)-glycerol (**26**). Der Nachweis für eine tatsächliche QC-inhibierende Wirkung der Sulfolipide konnte durch eine erfolgreiche Isolierung und anschließende Testung der Verbindungen (Kap. 5.4.4 und 5.4.5) erbracht werden.

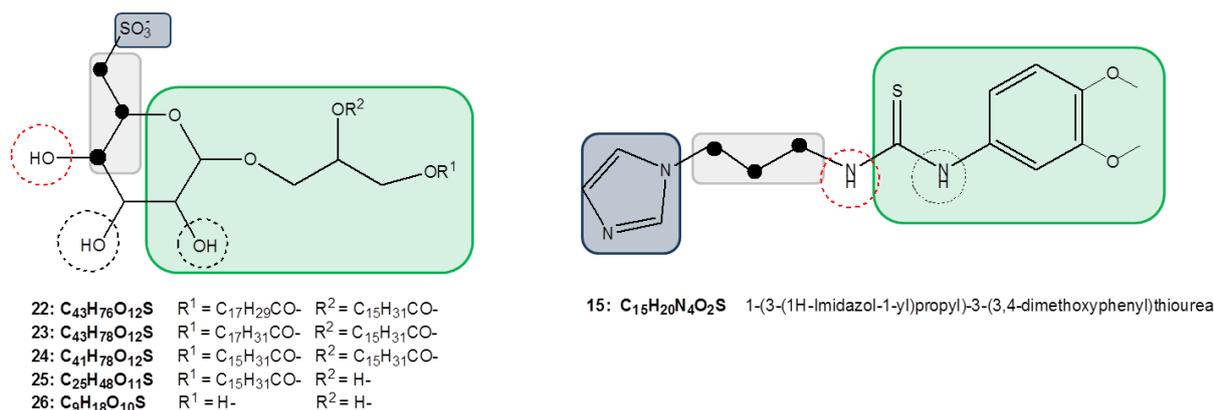
Eine QC-Inhibierende Aktivität dieser Substanzklasse ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die bekannten QC-Inhibitoren sind heterozyklische Verbindungen. In Arbeiten von *Buchholz et al., 2006, 2009* [238,273] wurden Untersuchungen zu Substrukturen von QC-Inhibitoren durchgeführt. Aus diesen kann abgeleitet werden, dass für QC-Inhibitoren folgende Substrukturen mit pharmakophoren Eigenschaften notwendig sind (Abb. 66):

- Metallbindungsgruppe (MBG)
- flexibler Linker mit Mindestlänge (Propyl-Linker)
- Core-Struktur (Scaffold) dekoriert mit funktionellen Gruppen an bestimmten Positionen z.B. 3,4-Dimethoxyphenyl-thioharnstoff, welche zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Enzymtasche eingehen können



**Abb. 66:** Strukturelle Merkmale eines QC-Inhibitors

Auch die als QC-inhibierend identifizierten Sulfolipide (**22-26**) weisen vergleichbare strukturelle Merkmale eines QC-Inhibitors auf. In nachfolgender Abbildung sind die Strukturen eines bekannten QC-Inhibitor (**15**) und der Sulfolipide im Hinblick auf die charakteristischen strukturellen Merkmale eines QC-Inhibitors vergleichend gegenüber gestellt.



**Abb. 67:** Vergleich der strukturellen Merkmale des QC-Inhibitors 1-(3-(1H-Imidazol-1-yl)propyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)thiourea (**15**) mit den als QC-inhibierend identifizierten Sulfolipiden (**22-26**) [blau: MBG; grau: flexibler Linker; grün: Core-Struktur (Scaffold); rot: Wasserstoffbrückendonator]

Wie in Abb. 67 zu sehen, weisen die identifizierten Sulfolipide die strukturellen Merkmale (Substrukturen) eines QC-Inhibitors auf. Hierbei fungiert das negativ geladene Sulfonat an der 6-Hydroxyl-Position der Glucose wahrscheinlich als Metallbindegruppe. Diese Annahme kann durch die Dockingstudien unterstützt werden, da Dockingkonformationen für alle Sulfolipide erhalten wurden in denen die Sulfonat-Gruppe am Zinkion in der aktiven Tasche des Enzyms koordiniert vorlag. Damit könnten erstmals Sulfonate als neue Metallbindungsgruppe für QC's identifiziert worden sein. Als Core-Struktur (Scaffold) fungiert vermutlich die Glucose. Sie enthält als funktionelle Gruppen zahlreiche Hydroxygruppen (-OH) sowie ein Glyceridgerüst, welches Acylreste enthalten kann. Die Hydroxygruppen können hierbei als Wasserstoff-Akzeptoren und -Donatoren fungieren und ermöglichen in der Enzymtasche gerichtete Wechselwirkungen. Die durchgeführten Dockingstudien unterstützen diese Hypothese, da Dockingkonformationen erhalten wurden in denen Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Lys144, His206, Trp329, Glu202 und Asp159 eingehen. Das die Glucose Substruktur als mögliche Core-Struktur (Scaffold) für QC-Inhibitoren fungieren kann, ist bis dato nicht beschrieben. Die von *Buchholz et al., 2006* [238] beschriebene notwendige flexible Linker-Struktur zwischen Metallbindegruppe und Core-Struktur findet sich ebenfalls in den Sulfolipiden wieder. Ausgehend von der Metallbindegruppe verbindet er diese mit dem Grundgerüst (Scaffold) und weist eine optimale Länge von 3 Methyleneinheiten bis zur 5-Hydroxygruppe der Glucose auf. Beim QC-Inhibitor (**15**) besitzt er ebenfalls eine Länge von 3 Methyleneinheiten bis zur NH-Gruppe der Core-Struktur. Sowohl die 5-Hydroxygruppe als auch die NH-Gruppe fungieren hierbei als Wasserstoffbrückendonatoren zwischen der Metallbindegruppe und der Core-Struktur.

Da die identifizierten Sulfolipide die für QC-Inhibitoren notwendigen Substrukturen mit pharmakophoren Eigenschaften aufweisen, könnten Sie neue Leitstrukturen für QC-Inhibitoren darstellen.

Die Anforderungen in Bezug auf die Verwendung chemischer Verbindungen als Wirkstoffe definierte der Chemiker *Christopher Lipinski* als „Rule of Five“ und spezifizierte sie [346–348]. Hiernach sollten die Verbindungen folgende Eigenschaften aufweisen: nicht mehr als fünf Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. OH- oder NH-Gruppen), nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. Sauerstoff- oder Stickstoffatome), ein Molekulargewicht von < 500 g/mol sowie einen Verteilungskoeffizienten (Oktanol-

Wasser-Verteilungskoeffizient,  $-\log P$ ) von maximal 5. Neben diesen Eigenschaften sollten die Verbindungen weiterhin einen TPSA-Wert (Topological Polar Surface Area)  $< 70 \text{ \AA}^2$  besitzen, um im medizinisch-chemischen Sinne optimal im Falle der QC-Inhibitoren durch die Blut-Hirn-Schranke zu permeieren.

In der nachfolgenden Tabelle sind die geforderten Eigenschaften für den QC-Inhibitor (**15**) sowie die Sulfolipide (**22-26**) dargestellt.

**Tab. 13:** Rule of five und TBSA-Wert bezogen auf QC-Inhibitor (**15**) und die QC-inhibierenden Sulfolipide (**22-26**)

Verbindung	Werte der Verbindungen	Rule of five
<b>Sulfolipide (22-26)</b>	318 g/mol (26) – 818 g/mol (22) 3 – 5 (OH-Gruppen) 10 (Sauerstoffatome) -4,95 (26) – 8,71 (22) 173,93 $\text{\AA}^2$ (26) – 186,13 $\text{\AA}^2$ (22)	$< 500 \text{ g/mol}$ $< 5$ Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. OH- oder NH-Gruppen) $< 10$ Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. Sauerstoff- oder Stickstoffatome) $-\log P$ TPSA-Wert $< 70 \text{ \AA}^2$
<b>QC-Inhibitor (15)</b>	320,41 g/mol 2 (NH-Gruppen) 4 (Stickstoffatome) 0,95 60,35 $\text{\AA}^2$	$< 500 \text{ g/mol}$ $< 5$ Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. OH- oder NH-Gruppen) $< 10$ Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. Sauerstoff- oder Stickstoffatome) $-\log P$ TPSA-Wert $< 70 \text{ \AA}^2$

Nach den „Rule of Five“ sowie den Anforderungen an einen TPSA-Wert  $< 70 \text{ \AA}^2$  stellen die Sulfolipide keine Leitstrukturen im medizinisch-chemischen Sinne dar.

Es müsste also zunächst eine Optimierung der Strukturen vorgenommen werden. Hierfür könnten Liganden- und Strukturbasierte Methoden eingesetzt werden. Dabei könnten neue pharmakophore Substrukturen durch Ligandenbasierte Ansätze gefunden werden. So könnten z.B. die Fettsäuren der Sulfolipide durch für die QC spezifischere Interaktionspartner substituiert werden. Medizinisch-chemische Untersuchungen im Hinblick auf einen optimierten TPSA-Wert könnten ebenfalls erfolgen. Weiterhin sollte über ITC-Messungen geprüft werden, ob es sich bei der Interaktion Sulfolipid-QC um ein enthalpisch getriebenes System handelt, da die Enthalpie bestimmend für spezifische Wechselwirkungen ist.

Wenn auch die identifizierten Sulfolipide nicht im eigentlichen Sinne Leitstrukturen darstellen, so könnten Sie trotzdem einen neuen Ausgangspunkt bei der Entwicklung neuer QC-Inhibitoren darstellen.

### 5.6.2. Identifizierung und Charakterisierung der QC inhibierenden Sulfolipide

Algen sind bereits seit vielen Jahren als Produzenten komplexer und hochdiverser Verbindungen mit zahlreichen biologischen Aktivitäten einschließlich spezifischer Enzymhemmender und neuroprotektiver Eigenschaften bekannt. Bei der Identifizierung von biologisch aktiven Naturstoffen aus Algen, wie in dieser Arbeit vorgenommen, mussten einige Besonderheiten berücksichtigt und auftretende Schwierigkeiten gelöst werden. Des Weiteren war zu berücksichtigen, dass *„bei der Gewinnung von Naturstoffen die Beschaffung des biologischen Materials, die Auffindung und Isolierung aus einer inaktiven oder sogar die biologische Testung störenden Matrix und die Gewinnung ausreichender Mengen zur chemischen und pharmakologischen Charakterisierung bzw. für die klinische Nutzung problematisch sind. Besonders attraktiv sind Naturstoffe dann, wenn die biologische Quelle erneuerbar bzw. sogar in Kultur modifizierbar ist“* [282].

Die Auswahl der Algen erfolgte daher zum einen nach ihrer biologischen Aktivität und zum anderen nach ihrer Kultivierbarkeit unter Verwendung eines definierten Kultivierungsmediums unter reproduzierbaren Bedingungen in Photobioreaktoren, so dass das biologische Material „erneuerbar“ und in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Wie die Ergebnisse unter Kap. 5.1 zeigen, konnten die ausgewählten Algen erfolgreich kultiviert werden. Da das Spektrum der gebildeten Inhaltstoffe von der Wachstumsphase in der sich die Algen befinden abhängen können, wurde sowohl Biomasse aus der exponentiellen Wachstumsphase als auch aus der stationären Phase gewonnen. Die Extraktion der Metaboliten erfolgte nach mechanischem Zellaufschluss mit Mörser & Pistill auf Basis einer erschöpfenden Fest-Flüssig-Extraktion. Hierbei wurden Extraktionsmittel mit unterschiedlichen Polaritäten verwendet. Somit konnte gewährleistet werden, dass mit dem Lösungsmittel *n*-Hexan die unpolaren, mit dem Lösungsmittel Methanol die polaren und mit dest. H<sub>2</sub>O die hydrophilen Metaboliten extrahiert werden konnten. Die Wahl dieser Extraktionsmittel sowie das angewandte einstufige und mehrstufige Extraktionsverfahren erfolgten aufgrund von Forschungsarbeiten zur Isolierung bioaktiver Metaboliten aus Algen der AG Algenbiotechnologie der HS Anhalt [349–352] und werden auch in anderen Arbeiten [353] [354] genutzt. Extraktionsverfahren

wie die Soxhlet-Extraktion, die beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE) oder die überkritische CO<sub>2</sub>-Extraktion kommen bei der Gewinnung von definierten Wertstoffen wie Carotinoiden ( $\beta$ -Carotin, Astaxanthin), Lipiden, Fettsäuren, Kohlenwasserstoffen oder Kohlenhydraten (Polysaccharide) zum Einsatz, jedoch nicht bei der Isolierung unbekannter biologisch aktiver Metabolite [355].

Da Algen photosynthetisch aktive Organismen sind, besitzen Sie die Photosynthese-Pigmente Chlorophyll, welche mit dem Lösungsmittel Methanol extrahiert werden. Die gewonnenen Methanol-Extrakte enthalten daher hohe Chlorophyllgehalte. Diese absorbieren im blauen Spektralbereich von  $\sim 420-480\text{ nm}$  (Chlorophyll a) und im roten Spektralbereich von  $\sim 630-680\text{ nm}$  (Chlorophyll b). Darüber hinaus weisen Sie eine geringe Autofluoreszenz im Bereich von  $\sim 670-685\text{ nm}$  auf. Für spektroskopische Bioassays sowie chromatographische Analysemethoden ist die Gegenwart von Chlorophyll daher störend, so dass eine Chlorophyll-Eliminierung vorgenommen wurde. Die in der Literatur beschriebenen Methoden [356,357] der Chlorophyll-Fällung erbrachte jedoch sehr geringe Ausbeuten (Abb. 16), sind zeitaufwendig sowie schlecht reproduzierbar, so dass im Rahmen dieser Arbeit eine Chlorophyll-Entfernung unter Verwendung von SPE-Festphasenkartuschen etabliert wurde. Auf Basis einer Applikationsvorschrift von Macherey&Nagel (MN Appl. No. 300010; „Removal of chlorophyll from plant cells“) erfolgte die Chlorophyll-Eliminierung aus den methanolischen Algenextrakten. Nach Literaturrecherchen hat die in dieser Arbeit etablierte Methode ein Alleinstellungsmerkmal in Bezug auf die Chlorophyll-Entfernung mittels Festphasenextraktion aus Algen. Im Vergleich zu anderen Methoden [356,357] ist mit ihr eine schnelle und reproduzierbare Chlorophyll-Entfernung mit sehr guten Ausbeuten realisierbar.

Insgesamt wurden 72 Extrakte erzeugt, welche für die Testung im QC-Assay zur Verfügung standen. Da für eine erfolgreiche Suche nach biologisch aktiven Verbindungen in komplexen Naturstoffgemischen sowohl die Testsysteme als auch die Suchstrategie an die besonderen Bedingungen der Naturstoffchemie angepasst werden müssen [282], erfolgte eine Optimierung der Assay-Bedingungen an die Algenextrakte.

Ausgehend von den im Screening ermittelten QC-inhibierenden Aktivitäten wurde eine bioaktivitätsgeleitete Isolierung (bioassay guided isolation) durchgeführt. Ausgewählt wurden hierfür die chlorophyllfreien methanolischen Extrakte, da sie die aktivste Klasse der getesteten Extrakte darstellten. Trotz Anwendung verschiedener chromatographischer Methoden kam es zu einer Verteilung der QC-hemmenden Aktivitäten über mehrere Fraktionen und/oder zum Verlust der Aktivitäten in den Fraktionen. Begründet werden kann die Verteilung der Aktivität über mehrere Fraktionen mit der schlussendlich identifizierten Struktur der QC-inhibierenden Verbindungen. Da es sich bei den QC-inhibierenden Verbindungen **22 – 26** um Sulfolipide handelt, die keine Fettsäure [Verbindung **26**], eine Fettsäure [Verbindung **25**] oder zwei unterschiedliche Fettsäuren [Verbindung **22 – 24**] enthalten, weisen diese unterschiedliche Retentionszeiten wie in Abb. 20, Abb. 22 und Abb. 23 zu sehen ist, auf. Weiterhin konnten mit den verwendeten chromatographischen Methoden keine ausreichende Trennung aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der aktiven Verbindungen (polarer Grundkörper der Sulfochinovose und unpolare Fettsäureketten) erreicht werden. Eine zu geringe Extraktausgangsmenge von 2 mg, und folglich zu geringe Konzentration der Sulfolipide bei der 1. Fraktionierung mittels HPLC, kann dazu geführt haben, dass von den aktiven methanoli-

schen Extrakten *S. producto-capitatus* mSP, *S. rubescens* mWP, *S. pectinatus* mSP und *T. wisconsinensis* mWP lediglich Fraktionen von *T. wisconsinensis* mWP und *S. pectinatus* mSP QC-inhibierende Aktivitäten aufwiesen (Abb. 20). Der Verlust der QC-inhibierenden Aktivität der Fraktionen und Unterfraktionen kann weiterhin darauf beruhen, dass die Konzentration der QC-inhibierenden Sulfolipide infolge der unzureichenden chromatographischen Trennung und der damit verbundenen Verteilung auf mehrere Fraktionen und Unterfraktionen, zu gering war um eine Hemmung der QC zu bewirken. Somit konnten bei den chromatographisch aufgetrennten Unterfraktionen, wie z.B. bei 5.4.1/Fraktion 22, keine QC-inhibierenden Aktivitäten mehr detektiert werden. Eine Erhöhung der Ausgangsextraktmenge und somit eine Erhöhung der QC-inhibierenden Verbindungen im Extrakt sowie die Verwendung einer weiteren säulenchromatographischen Methode an Sephadex G-15 führte zwar zu deutlich aktiveren Fraktionen (Abb. 23), jedoch kam es auch hier bei der weiteren Fraktionierung zum Verlust der QC-Inhibierung der Unterfraktionen.

Eine bioaktivitätsgeleitete Isolierung der QC-inhibierenden Verbindung konnte nicht erreicht werden, so dass als alternative und erfolgsversprechende Methode die Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) angewendet wurde. Bei dieser Methode handelt es sich, wie unter 5.4.1 bzw. 5.4.2.2 beschrieben, um einen Reverse Metabolomics Ansatz, der auf der Korrelation von Metabolitenprofilen mit Bioaktivitätsprofilen von Extrakten beruht. Die Metabolitenprofile der Algenextrakte wurden mittels zweier MS-Methoden (UPLC-ESI-MS und ESI-FTICR-MS) sowohl im negativen als auch positiven Ionenmodus erzeugt und mit den Bioaktivitätsdaten aus dem QC-Assay korreliert. Im Ergebnis wurde, nach statistischer Datenanalyse, eine „Hitliste“ erzeugt, die die statistisch, signifikante Korrelationen von MS-Signalen ( $m/z$ ) in Bezug auf die QC-Inhibierung zeigt (5.4.2.2). Es werden ganzheitlich alle im Extrakt messbaren Metaboliten erfasst. Im Vergleich zu anderen Bioaktivitätsvorhersagemethoden wie QCAR, PCA oder PLSA sind für die Durchführung dieser chemoinformatischen Analyse Grundkenntnisse auf dem Gebiet der multivariaten Statistik bzw. Datenanalyse ausreichend. Die erzeugte Hitliste hingegen enthält eine Vielzahl von MS-Signalen ( $m/z$ ), welche in Bezug auf Cluster ausgewertet werden muss. Arbeiten von Michels (2011) und Heinke (2015) [283,284] zeigten, dass Peakcluster auf „richtig positive“ Hits hindeuten, diese jedoch nicht zwangsläufig in der Hitliste aufeinanderfolgen und aus Isotopenpeaks, Fragmenten und Adukten bestehen können. Die Auswertung und Annotation der AcorA-Hitlisten ist daher bei Extrakten, die im Hinblick auf ihre Verbindungen nicht bzw. kaum charakterisiert sind und darüber hinaus sehr komplex sind, sehr aufwendig. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten AcorA-Hitlisten (5.4.2.2) umfassten im positiven Ionenmodus 326 Peaks (Korrelationskoeffizient  $>0,6$ ) der UPLC-ESI-MS Daten, 79 Peaks (Korrelationskoeffizient  $>0,5$ ) der ESI-FTICR-MS Daten sowie im negativen Ionenmodus 131 Peaks (Korrelationskoeffizient  $>0,6$ ) der UPLC-ESI-MS Daten und 27 Peaks (Korrelationskoeffizient  $>0,5$ ) der ESI-FTICR-MS Daten. Der Datensatz im negativen Ionenmodus fällt hierbei deutlich kleiner aus, da im negativen Ionenmodus deutlich weniger Adukte gebildet werden als im positiven Ionenmodus (zusätzlich noch K- und Na-Adukte). Somit umfasst der Datensatz des positiven Ionenmodus mehr Signale, die zu einer Verbindung gehören, und fällt insgesamt größer aus. Weiterhin sind deutlich weniger Signale von Verunreinigungen im negativen Ionenmodus detektierbar und das Grundrauschen sowie Störsignale fallen geringer aus. Insgesamt ist

somit der Datensatz der massenspektrometrischen Messungen im negativen Ionenmodus spezifischer und einfacher auswertbar, da weniger Signale/Peaks, die zu einer Verbindung gehören, clustern.

Aufgrund der Verwendung eines UPLC-ESI-MS Systems konnten die Extrakte (s. Abb. 72) chromatographisch aufgetrennt werden, wobei durch die online-Kopplung die chromatographische Auflösung im MS erhalten blieb. Die Retentionszeiten der einzelnen MS-Signale ( $m/z$ ) erleichterten hierbei die Erkennung von Peakclustern, die zu einer Verbindung gehören und somit gleiche Retentionszeiten besitzen. Die Durchführung von zwei massenspektrometrischen Methoden und anschließender Korrelation erleichterten weiterhin die Identifikation aktivitätsrelevanter Peakcluster durch Vergleich. Wenn Peakcluster bei beiden MS-Methoden identifiziert wurden, unterstützte dies die Annahme, dass es sich tatsächlich um aktivitätsrelevante Verbindungen handelte. Wie in Tab. 9 zu sehen, wurden in dieser Arbeit übereinstimmende, signifikante Peakcluster bei der Korrelation der Daten der beiden durchgeführten MS-Methoden, der UPLC-ESI-MS<sup>n</sup> und ESI-FTICR-MS, erhalten. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Peakclustern A1, A2, B1-B3, C1-C3 sowie D1, D2 und D4 um aktivitätsrelevante Verbindungen handelt.

Der weitere Vorteil bei der Verwendung zweier massenspektrometrischer Methoden besteht darin, dass anhand der exakten Massen aus den hochauflösenden ESI-FTICR-MS-Daten für die als aktivitätsrelevant identifizierten Verbindungen **19 – 24** die Summenformeln kalkuliert werden konnten. Mit den Daten der UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>-Messungen standen erste Fragmentierungsspektren zur Verfügung. Anhand dieser Fragmentierungsspektren und weiterer gezielter MS<sup>n</sup>-Fragmentierungsuntersuchungen konnte dann eine erfolgreiche schrittweise strukturelle Charakterisierung der einzelnen aktivitätsrelevanten Verbindungen erfolgen. Die kombinierte Durchführung von AcorA mit zwei massenspektrometrischen Methoden erlaubte so die Charakterisierung aktivitätsrelevanter Metabolite aus den komplexen Algenextrakten ohne vorherige Reinigung und Isolierung. Entscheidend für eine erfolgreiche Identifizierung und Charakterisierung ist hierbei die Güte der massenspektrometrischen Datensätze.

Wie in Kap. 5.5 gezeigt, kann der umfangreiche massenspektrometrische Datensatz weiterhin genutzt werden um nicht aktivitätsrelevante Metabolite zu identifizieren um somit Charakterisierungen der untersuchten Extrakte vorzunehmen.

Mittels AcorA konnten zum einen im positiven Ionenmodus die Verbindungen **19 – 21** sowie im negativen Ionenmodus die Verbindungen **22 – 26** als aktivitätsrelevant identifiziert werden. Hierbei handelt es sich bei den Verbindungen **19 – 20** um Porphyrinderivate, bei Verbindung **21** um Phaeophytin sowie bei den Verbindungen **22 – 26** um die Sulfolipide 1-O-palmitoyl-2-O-linolenyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**22**), 1-O-linoly-2-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**23**), 1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(6'-deoxy-6'-sulfo-D-glycopyranosyl)-glycerol (**24**), 1-O-palmitoyl-3-O-(6'-sulfo- $\alpha$ -quinovo-pyranosyl)-glycerol (**25**) und 1-O-(6-Deoxy-6-sulfoglucopyranosyl)-glycerol (**26**).

Für eine erste Einschätzung der möglichen spezifischen Inhibierung der QC durch die identifizierten Verbindungen wurden Docking Studien der Verbindungen **20 – 26** durchgeführt. Diese zeigten, dass das Ringsystem (Porphyrinring) der Verbindungen **20** und **21** nicht in das aktive Zentrum (active site) der QC passt und vom Dockingprogramm lediglich vor der Öffnung des aktiven Zentrums platziert wurde. Eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum der

QC und einer spezifischen Inhibierung kann somit vermutlich ausgeschlossen werden. Bei diesen beiden Verbindungen handelt es sich somit wahrscheinlich um „falsch positive“ aktivitätsrelevante Verbindungen, wobei mögliche unspezifische Inhibierungen der QC nicht ausgeschlossen werden können. Ohne vorherige Isolierung der mittels AcorA identifizierten Verbindungen konnten mögliche „falsch positive“ aktivitätsrelevante Verbindungen identifiziert werden. Warum die Verbindungen **19 – 21** eine Korrelation mit der QC-Aktivität im positiven Ionenmodus bei beiden verwendeten massenspektrometrischen Methoden aufwiesen, kann nicht abschließend und gesichert begründet werden. Jedoch könnte ein Zusammenhang zwischen den falsch positiv korrelierten Porphyrinderivaten (**19, 20**) sowie Phaeophytin (**21**) und den aktivitätsrelevanten Sulfolipiden (**22 – 26**) über die Photosynthese bestehen an der sie beteiligt sind. Bei Phaeophytin (**21**) handelt es sich um ein Chlorophyll-Molekül, dem das zentrale Magnesiumion fehlt. Es stellt ebenso wie die Verbindungen **19** und **20** ein Derivat des Porphyrins dar, wobei die Biosynthese der Chlorophylle dem Schema der Biogenese der Porphyrine folgt und wie alle Porphyrine von 5-Aminolävulinsäure ausgeht. Lokalisiert sind die Porphyrinderivate einschließlich des Chlorophylls in der Thylakoidmembran der Chloroplasten, wo sie durch den lipophilen Phytol-Rest verankert sind. Phaeophytine spielen eine wichtige Rolle in der Photosynthese und sind für die Elektronenweitergabe im Reaktionszentrum des Photosystems II zuständig. Hierbei werden vom angeregten Chlorophyll a Elektronen zunächst auf Phaeophytin übertragen, welches diese weiter auf mit verschiedenen Proteinen assoziierte Plastochinone überträgt. Plastochinon wird dann zu Plastochinol reduziert, wobei das Plastochinol/Plastochinon Redoxsystem den Cytochrom-b<sub>6</sub>/f-Komplex reduziert. Die beiden Plastochinonmoleküle werden im weiteren Verlauf am Cytochrom b<sub>6</sub>-f-Komplex umgesetzt, wobei dieser 2 Elektronen vom Plastochinol übernimmt. Der Multiproteinkomplex des Photosystems II ist in der Thylakoidmembran von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien lokalisiert und katalysiert den Prozess der lichtinduzierten Oxidation von Wasser zu Sauerstoff [358,359]. Die Bestandteile der Thylakoidmembran bilden neben den beiden ungeladenen Galaktolipiden Monogalactosyldiacylglycerid (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerid (DGDG) auch Phosphatidylglyceride (PG) und die negativ geladenen Sulfolipide, wobei diese die laminaire Lipidphase der Membran stabilisieren [314]. Da die Sulfolipide fast ausschließlich in der Thylakoidmembran lokalisiert sind, wurde ihnen wiederholt eine bedeutende Rolle bei der Photosynthese zugeschrieben [360] und konnte durch Untersuchungen zur Korrelation des Sulfolipidgehaltes in Abhängigkeit der Photosynthese gestützt werden [361,362]. Weiterhin zeigten Untersuchungen verschiedener photosynthetisch aktiver Algen, wie z. B. *Chlamydomonas reinhardtii*, dass die Sulfolipide SQDG für die uneingeschränkte Funktion des Photosystems II notwendig sind. So konnte in SQDG-Mutanten über die Messung der Sauerstoffbildung im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der Photosystem II-Aktivität nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine stabilisierende Wirkung der SQDG für die aktive Konformation des Photosystems II, besonders für das D1-Polypeptid, das für eine maximale Aktivität des Photosystems II im Zusammenhang mit dem Elektronentransport notwendig ist, bestätigt. Weiterhin sind SQDG endogene Bindungspartner für die Untereinheiten des im Photosystem II-verankerten Cytochrom b<sub>6</sub>/f (Cyt b<sub>6</sub>/f)-Komplexes [298,363,364]. Somit spielen Sulfolipide ebenso wie Phaeophytin eine direkte Rolle beim Elektronentransport im Photosystem II mit einem Bezug zum Cytochrom b<sub>6</sub>-f-Komplex. Es

könnte somit ein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen Sulfolipiden und Porphyrinderivaten einschließlich Phaeophytin vorliegen, so dass sich in Abhängigkeit der Porphyrinderivat- bzw. Phaeophytin-Konzentration auch die Sulfolipid-Konzentration ändert. Somit würde ebenso für die Porphyrinderivate und Phaeophytin ein proportionaler Zusammenhang zwischen MS-Signal und Bioaktivität, der Grundlage von AcorA ist, bestehen und eine „*falsch positive*“ Korrelation resultieren.

Diese Arbeit konnte bestätigen, dass Algen in der Lage sind enzyminhibierende Verbindungen zu synthetisieren und die Anwendung der Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) eine sehr gute Methodik zur Identifizierung und Charakterisierung bioaktiver, insbesondere enzyminhibierender, Verbindungen aus komplexen Mikroalgenextrakten darstellt.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant/Hersteller</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Citronensäure	VWR International
CoSO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Fe-EDTA	Sigma Aldrich
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Carl Roth
KNO <sub>3</sub>	Carl Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
NaOH	VWR International
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	VWR International
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Orcinol	Sigma Aldrich
Tris-HCL	Sigma-Aldrich
Seesand, reinst	Sigma-Aldrich
Vanillin	VWR International
ZnSO <sub>4</sub>	Carl Roth
<b>Lösungsmittel, Säuren und Wasser</b>	<b>Lieferant/Hersteller</b>
Acetonitril	destiliert IPB/NWC; VWR International
Aceton	destiliert IPB/NWC; VWR International
Dichlormethan	VWR International
Ethanol	destiliert IPB/NWC; VWR International
Ethylacetat	VWR International
Ethylformiat	VWR International
Isopropanol	VWR International
Methanol	destiliert IPB/NWC; VWR International
<i>n</i> -Hexan	VWR International
Toluol	VWR International
Acetonitril (LC-MS grade)	Baker
CH <sub>3</sub> COOH (LC-MS grade)	Baker
CH <sub>3</sub> COOH	VWR International
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	VWR International
dest.; bidest. Wasser	destiliert / Ionenaustauscher (Millipore)
bidest. H <sub>2</sub> O (LC-MS grade)	Baker

<b>Chromatographie Materialien</b>	<b>Lieferant/Hersteller</b>
CHROMABOND® SA (SCX)	Macherey&Nagel
CHROMABOND® C18ec	Macherey&Nagel
CHROMABOND® NH2 Polypropylensäulen	Macherey&Nagel
Sephadex G-15	Pharmacia
Kieselgel 60 <sub>F254</sub> Aluminiumfolien	Merck, Macherey&Nagel
RP18 HSS T3 1,8 µm, 1,0 x 100 mm	Waters
RP-18 Säule (IPB/NWC Säulennr. 52)	
RP-18 Säule (IPB/NWC Säulennr. 174)	

<b>Referenzsubstanzen, Enzyme, Substrate</b>	<b>Lieferant/Hersteller</b>
SQDG-Standard	Lipid Products
Phaeophytin-Standard	LGC-Standard
Glutaminyl-7-amino-4-methyl-coumarin (Gln-AMC)	Bachem AG/ Probiodrug AG
Pyroglutaminylamino-peptidase (pGAP) (EC 3.4.19.3)	Bachem AG / Probiodrug AG
humane Glutaminylylase (hQC) (EC 2.3.2.5)	Probiodrug AG

**Geräte:**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
2 L Blasensäulenreaktoren (Sonderanfertigungen)	Rettberg
Photobioreaktor PBR 100 GS/PL	IGV GmbH
Coulter Counter Multisizer 3	Beckmann
FluoStar Multiplate Reader	BMG-Labtech
Vakuumrotationsverdampfer Re111	Büchi
Fraktionssammler Retriever II	ISCO
Eppizentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge 3K30	Sigma
Ultraschallbad Super RK510-H	Sonorex
IR-Dancer 360	Hettich
Vortexer Genie2	Scientific Industries
Gefriertrocknungsanlage	Dieter Piatkowski
Acquity UPLC HSS/ LCQ Deca XP MAX	Waters / Thermo Finnigan
FTICR Massenspektrometer Bruker Apex III 70e	Bruker Daltonics
API-150EX Massenspektrometer	Applied Biosystems
HPLC System (ProStar® 218, Pro Star 330 PDA-Detektor, Fraktionssammler 701)	Varian
JASCO J-560 Spektrophotometers	JASCO

## 6.2. Kultivierung der Mikroalgen

### 6.2.1. Verwendete Mikroalgenspezies

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mikroalgen (Tab. 14) unter den in Kap. 5.1.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Stämme gehen aus der Sammlung für Algen Göttingen (SAG) hervor.

**Tab. 14:** Verwendete Mikroalgen

Algenabteilung	Mikroalgenspezies	Stammnummer
Chlorophyta	<i>Scenedesmus rubescens</i> (Kessler, 1995)	SAG 5.95
	<i>Scenedesmus producto-capitatus</i> (Hegewald, 1980)	SAG 21.81
	<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Hegewald, 1980)	SAG 38.81
	<i>Scenedesmus pectinatus</i> (Hegewald, 1975)	SAG 2003
	<i>Tetradesmus wisconsinensis</i> (Neuhaus, 1999)	SAG 3.99
Eustigmatophyta	<i>Eustigmatos magnus</i> (Schlösser, 1989)	SAG 36.89

### 6.2.2. Verwendete Medien und Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung der Mikroalgen im Labor- und im Technikumsmaßstab wurde das Setlik-Medium (Tab. 15) verwendet.

**Tab. 15:** Zusammensetzung des Setlik-Mediums

Nährsalze	Eingesetzte Menge [mg/L]
KNO <sub>3</sub>	2020,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340,00
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	990,00
Fe-EDTA	18,50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	10,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,09
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	1,20
CoSO <sub>4</sub>	1,40
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	1,24
ZnSO <sub>4</sub>	1,43
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	1,84

Die Nährsalze wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert.

Um den Einfluss der Nährstoffe sowie weiterer Parameter wie Licht, Temperatur usw. auf die Metabolitenbildung auszuschließen, wurde sowohl einheitliches Nährmedium verwendet als auch die Einhaltung gleicher Kultivierungsbedingungen realisiert.

Die Kulturführung aller Mikroalgen im 2 L Blasensäulenreaktor erfolgte bei einer Temperatur von 28°C und wurde bei einer Lichtintensität von 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  durchgeführt.

Die Kultivierungen im 100 L PBR fanden ebenfalls bei einer Temperatur von 28°C $\pm$  3°C statt. Aufgrund baulicher Voraussetzung des PBR wurde eine Lichtintensität von 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  bei OD < 20 und eine Lichtintensität von 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  des Lichtmoduls bei OD > 20 verwendet. Weiterhin erfolgte die pH-Regelung auf pH = 7 durch eine gesteuerte Zugabe von CO<sub>2</sub> in die Algenkultur.

### **6.2.3. Kultivierung im Labormaßstab (Vorkultur/Inokulum)**

Die Kultivierung der Mikroalgen im 2 L Blasensäulenreaktoren wurden zum einen zur Adaptation der einzelnen Mikroalgenpezies an das Setlik-Medium, der Aufnahme der Wachstumsverläufe in diesem Medium sowie zur Anzucht des Inokulums für die Kultivierungen im 100 L PBR durchgeführt.

Die Kultivierungen wurden steril unter den in Kap. 6.2.2 festgelegten Kultivierungsbedingungen sowie einer kontinuierlichen Begasung unter Zusatz von 2 % CO<sub>2</sub> ausgeführt.

Die Aufnahme der Wachstumsverläufe der einzelnen Mikroalgenpezies erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen in Doppelbestimmung.

Die Anzucht des Inokulums erfolgte in vier 2 L Blasensäulenreaktoren über einen Zeitraum von 14 Tagen.

### **6.2.4. Kultivierung im Technikumsmaßstab**

Die Mikroalgen wurden zur Gewinnung von hinreichend Biomasse in einem tubularen Photobioreaktor PBR 100 GS/PL der Firma IGV GmbH mit einem Reaktorvolumen von 100 L kultiviert. Die Steuerung der Pumpendrehzahl, der Temperatur sowie des pH-Wertes erfolgte mittels einer Biostat Steuereinheit der Firma Braun, wobei folgende Parameter: - Temperatur 28°C  $\pm$  3°C; pH = 7; Pumpendrehzahl 1750 rpm - gesetzt wurden. Das Reaktorsystem besitzt eine Durchflusszelle, in welcher sowohl eine Temperatur- und pH-Sonde als auch eine Sonde zur Messung der optischen Dichte (OD) und eine pO<sub>2</sub>-Sonde integriert waren. Es erfolgte eine inline Messung der Parameter Temperatur, pH-Wert, OD und Pumpendrehzahl. Diese wurden mittels der Software MFSC win über den gesamten Kultivierungszeitraum aufgezeichnet.

Nach der Temperierung des Kultivierungsmediums im Reaktor erfolgte die Zugabe von 4-6 L Inokulum, so dass die Kultivierung mit einer Anfangskonzentration von 8-10 % OD gestartet werden konnte. Die Kultivierung wurde im modifizierten fed-batch Verfahren durchgeführt, so dass nach der Ernte der Biomasse in der exponentiellen Wachstumsphase eine Zugabe von neuem Nährmedium stattfand und die Kultivierung bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase fortgesetzt wurde. Aus einem Kultivierungsansatz konnte somit Biomasse der exponentiellen Wachstumsphase und der stationären Wachstumsphase gewonnen werden.

## 6.2.5. Prozessbegleitende Analytik

### 6.2.5.1. Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch in Doppelbestimmung. Hierfür wurde jeweils 10 mL Algensuspension in Zentrifugengläser gegeben und 10 min bei 4000 rpm, 20°C in einer Zentrifuge 3K30 der Firma Sigma abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Biomassepellet mit 10 mL dest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und einer erneuten Zentrifugation unterzogen. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes wurden die Zentrifugenröhrchen 24 h bei 105°C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurden diese ausgewogen, so dass durch die ermittelte Masse, bezogen auf das eingesetzte Probenvolumen, die Biomassetrockenkonzentration in g/L errechnet werden konnte.

### 6.2.5.2. Bestimmung Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Coulter Counter Multisizer 3 der Firma Beckmann. Hierfür wurden zu 20 mL Coulter Isoton II Diluent der Firma Beckmann, abhängig von der Zelldichte 100 – 500 µL der zu untersuchenden Algensuspension gegeben und intensiv vermischt. Die Messung der Gesamtzellzahl im Bereich von 2 bis 60 µm, die Zellgrößenverteilung sowie der Mittelwert, der Median und die maximale Zellgröße erfolgte mittels digitalem Impedanzmessverfahren des Gerätes.

### 6.2.5.3. Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate

Die Berechnung der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  [d<sup>-1</sup>] erfolgte aus einem halblogarithmisch aufgetragenem Wachstumsdiagramm nach folgender Gleichung:

Formel 1:

$$\mu_{\max} = \left( \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)} \right)$$

$x_0$	Biomassekonzentration Beginn exponentielle Wachstumsphase
$x_t$	Biomassekonzentration Ende exponentielle Wachstumsphase
$t$	Prozesszeit exponentielle Wachstumsphase

## 6.2.6. Ernte der Biomasse

Die Gewinnung der Biomasse erfolgte diskontinuierlich in der exponentiellen sowie der stationären Wachstumsphase mittels Tellerseparator OTC-2-02 der Firma Westfalia. Die Biomasse wurde manuell aus dem Separator entnommen und in Aluminiumschalen überführt. Anschließend erfolgte die Lyophilisation der Biomasse in einer Gefriertrocknungsanlage der Firma Christ (Typ  $\beta$ 1-16).

### 6.3. Zellaufschluss und Extraktion

Die lyophilisierte Algenbiomasse wurde mit Seesand im Verhältnis 1:2 mit Mörser und Pistill unter Verwendung von Lösungsmittel aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte 10 min bei RT.

Zur Extraktion der freigesetzten intrazellulären Substanzen wurden zwei Extraktionsmethoden auf Basis einer Fest-Flüssig-Extraktion angewendet. 72 Extrakte aus den 6 zu untersuchenden Mikroalgen wurden gewonnen.

#### 6.3.1. Dreistufige Extraktion

Im dreistufigen Extraktionsverfahren wurde 10 g Algenbiomasse nach Zellaufschluss stufenweise mit den Lösungsmitteln *n*-Hexan, Methanol und dest. Wasser extrahiert (Abb. 68).

Beginnend mit dem Lösungsmittel *n*-Hexan wurde die Biomasse dreimal mit jeweils 100 mL Lsm. / 1 g BM 1 h unter Rühren auf dem Magnetrührer bei RT extrahiert. Die Abtrennung der flüssigen Extraktphase von der Biomasse erfolgte mittels Zentrifugation bei 2000 rpm und RT. Die Extrakte aus den drei Extraktionsschritten mit *n*-Hexan wurden vereint und die Biomasse der 2. Extraktionsstufe mit Methanol zugeführt. Die 2. und 3. Extraktionsstufe mit Methanol und Wasser wurde analog in drei Schritten durchgeführt. Die gewonnenen *n*-Hexan, Methanol- und Wasser-Extrakte wurden mittels Vakuum-Rotationsverdampfer der Firma Brandt sowie Combi-Dancer der Firma Zinser Analytic (Wasser Extrakt) bis zur Trockne eingengt und bei 4°C gelagert.

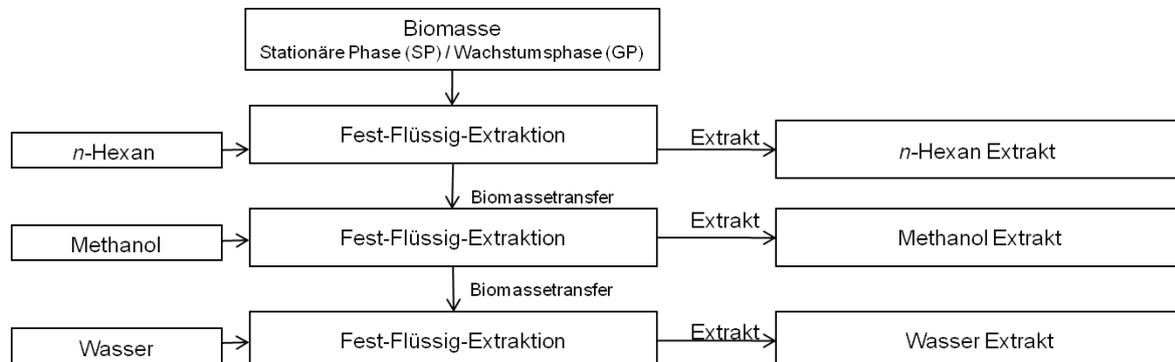


Abb. 68: Schematische Darstellung der dreistufigen Extraktion

#### 6.3.2. Einstufige Extraktion

Im einstufigen Extraktionsverfahren wurde jeweils 10 g Algenbiomasse nach Zellaufschluss mit den Lösungsmitteln *n*-Hexan, Methanol und Wasser extrahiert (Abb. 69).

In drei Schritten erfolgte die Extraktion mit jeweils 100 mL Lsm. / 1 g BM 1 h unter Rühren auf dem Magnetrührer bei RT. Die Abtrennung der flüssigen Extraktphase von der Biomasse erfolgte mittels Zentrifugation bei 2000 rpm und RT, so dass die Biomasse in dem 2. und 3. Extraktionsschritt analog extrahiert werden konnte. Die Extrakte aus den drei Extraktionsschritten wurden vereint und mittels Vakuum-Rotationsverdampfer der Firma Büchi sowie Combi-Dancer der Firma Zinser Analytic (Wasser-Extrakt) bis zur Trockne eingengt und bei 4°C gelagert.

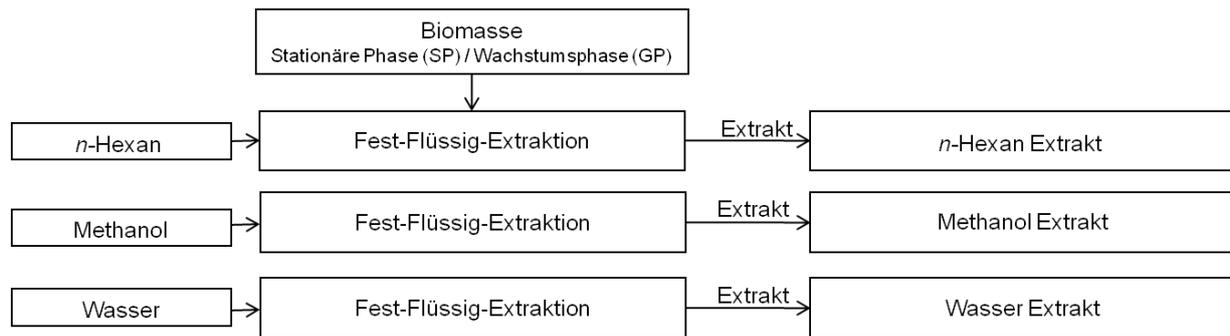


Abb. 69: Schematische Darstellung der einstufigen Extraktion

## 6.4. Extraktaufarbeitung / Probenvorbereitung

### 6.4.1. Chlorophyll-Entfernung

#### 6.4.1.1. Chlorophyllfällung modifiziert nach Greilinger und Gross

Zur Entfernung von Chlorophyll aus den methanolischen Algenextrakten erfolgte eine Chlorophyll-Fällung modifiziert nach Gross *et al.* (1991) und Greilinger (2002) [356,357]. Dazu wurden die Extrakte 1:2 (v/v) mit 0,2 M Citronensäure-Citratpuffer sowie 0,4425 M NaOH versetzt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend in einer Filtereinheit (Porengröße 0,45 µm) abfiltriert. Zur Abtrennung der Salze wurden die chlorophyllfreien Extrakte über Chromabond® C18ec Kartusche (500 mg/3 mL bzw. 1000 mg/6 mL, Macherey&Nagel) aufgereinigt. Die Konditionierung der Kartuschen erfolgte mit 2 VE 100 % Methanol und 2 VE 50 % MeOH. Nach dem Probenauftrag erfolgte ein Waschschrift unter Verwendung von 2 VE H<sub>2</sub>O. Die Elution erfolgte mittels 2 VE 70%igem MeOH und 4 VE 100%igem MeOH bis zur Farblosigkeit des Eluates. Beide Eluate wurden vereint und wurden mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

#### 6.4.1.2. Chlorophyll-Eliminierung mittels SA-Kartuschen

Die Eliminierung von Chlorophyll erfolgte unter der Verwendung von CHROMABOND® SA (SCX) der Firma Macherey&Nagel.

Die SA-Kartuschen wurden mit 0,5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beschichtet und mit 1 VE Dichlormethan / Aceton (3:1, v/v) konditioniert. Anschließend erfolgte die Aufgabe des methanolischen Extraktes. Das chlorophyllfreie Fluat wurde in Glasprobengefäßen aufgefangen.

Die chlorophyllfreien Extrakte wurde anschließend über Chromabond® C18ec Kartusche (500 mg/3 mL bzw. 1000 mg/6 mL, Macherey&Nagel) aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 100 % MeOH.

### 6.4.2. Festphasenextraktion (SPE)

Die Vorbereitung der Proben für alle analytischen Analysen (UPLC-ESI-MS, ESI-MS, ESI-FTICR-MS HPLC,) erfolgte unter Verwendung von Chromabond® C18ec Kartusche (500 mg/3 mL bzw. 1000 mg/6 mL, Macherey&Nagel) und Elution mit 100 % MeOH.

## 6.5. Enzymbasierter Glutaminylzyklase-Assay

Das Screening der *n*-Hexan, Methanol- und der wässrigen Extrakte auf eine Inhibierung der katalytischen Aktivität der Glutaminylzyklase (QC) wurde mittels eines von der Probiobdrug AG entwickelten spektralphotometrischen Enzym-Assays (Abb. 70) durchgeführt.

Hierbei wird das fluorogene Peptidsubstrat Glutaminyl-7-amino-4-methyl-coumarin (Gln-AMC) von der zugegebenen humanen QC am Glutaminrest zyklisiert. Dabei entsteht das Intermediat Pyroglutaminyl-amino-methyl-coumarin. Dieses Intermediat wird mittels zugegebenen Hilfsenzym, der Pyroglutaminylamino-peptidase (pGAP), in Pyroglutaminsäure und Aminomethylcoumarin gespalten. Die Freisetzung des fluorogenen 7-Amino-4-Methylcoumarins (AMC) wird kontinuierlich über einen definierten Zeitraum gemessen. Dabei wird AMC bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt und die daraus resultierende Emission bei 460 nm gemessen [365].

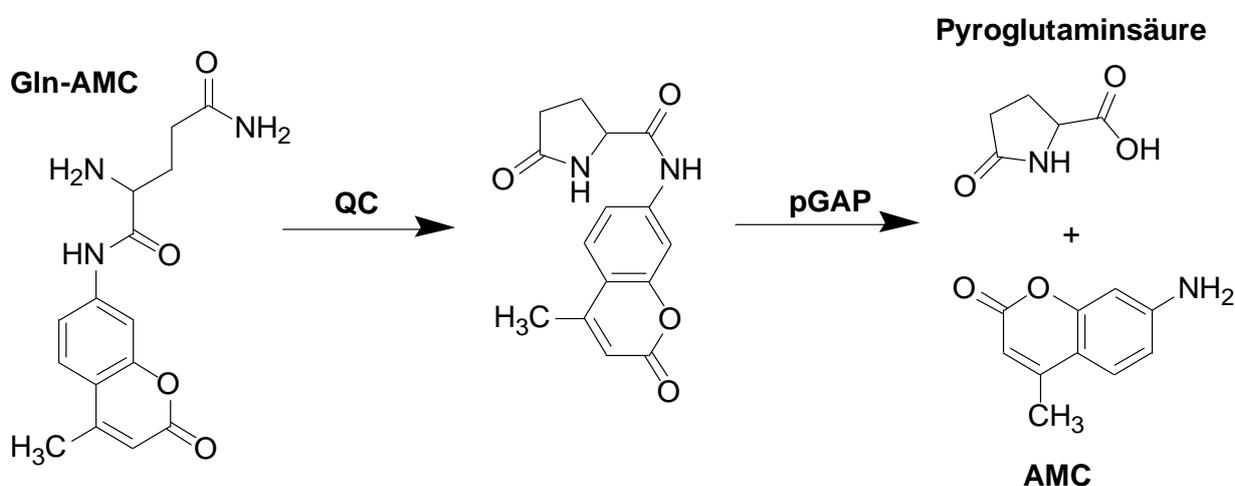


Abb. 70: Reaktionsprinzip des QC-Assays

### 6.5.1. Eingesetzte Enzyme

Im QC-Assay wurden die humane Glutaminylzyklase (hQC) und als Hilfsenzym die Pyroglutaminylpeptidase (pGAP) verwendet. Als Substrat wurde das synthetische Substrat Glutaminyl-7-Amino-4-methylcoumarin (Gln-AMC) eingesetzt.

Die verwendeten Enzyme sind in nachfolgender Tab. 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Verwendete Enzyme im QC-Assay

	hQC	pGAP
Familie	Acyltransferase	Cysteinprotease
EC-Nummer	EC 2.3.2.5	EC 3.4.19.3
Quelle	rekombinant human <i>Pichia pastoris</i>	rekombinant human <i>E. coli</i>
Proteingehalt	0,7 mg/mL	25 unit/mL
Eingesetzte Verdünnung	1:300 i.A.	0,25 mM
Substrat	Gln-AMC	Pyr-AMC
Herkunft	Probiobdrug AG	Bachem AG

### 6.5.2. Bestimmung der Enzym-Aktivitäten

Die Bestimmung der Enzym-Aktivitäten wurde über kontinuierliche Messungen an einem FluoStar Multiplate Reader der Firma BMG-Labtech (Germany) in transparenten 96-well Mikrotiterplatten (NUNC, Costar Corning Incorporated, Acton, MA, USA), als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Wahl der Enzymverdünnung erfolgte so, dass sich der Umsatz des Substrates über den gesamten Messzeitraum im linearen Bereich befand. Die Berechnung der Enzymaktivitäten wurde mittels des aus den Zeit-Umsatz-Kurven ermittelten Anstieges über die Software FluoStar-Optima durchgeführt. Die Berechnung der  $K_m$ -Werte sowie die Anpassung der Inhibierungskurven erfolgte durch nicht lineare Regression über einen 4-Parameter-Fit mit den Programmen GraFit 5 und GraphPad Prism 4. nach folgenden Gleichungen:

**Formel 2:**

GraFit5

$$y = \frac{a}{\left[1 + 10^{\left(s \cdot \ln\left(\text{abs}\left(\frac{x}{T}\right)\right)\right)}\right]} + \text{back}$$

**Formel 3:**

GraphPad Prism 4

$$y = B + \frac{T-B}{1+10^{(\log IC_{50}) \cdot H}}$$

B, back	Minimale Aktivität i.d.R. = 0
T, abs	Maximale Aktivität, entspricht Aktivität ohne Inhibitor/Extrakt
A	Wertebereich
H	Steigerung

### 6.5.3. Ermittlung des kinetischen Parameters $K_m$

Die Ermittlung des  $K_m$ -Wertes der Glutaminylylzyklase erfolgte über nicht lineare Regression mit dem Programm GraFit 5. Der  $K_m$ -Wert wurde aus zehn Substratkonzentrationen im Bereich von  $5,0 \cdot 10^{-4}$  -  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M ermittelt.

**Formel 4:**

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

V	Umsatzgeschwindigkeit
$V_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$S_0$	Substratkonzentration
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante

### 6.5.4. Aktivitätstoleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln

Zu Beginn des Screenings wurde der Einfluss der organischen Lösungsmittel n-Hexan und Methanol auf die Enzymaktivität der Enzyme untersucht.

Da der Einsatz von n-Hexan aufgrund der Unlöslichkeit im Reaktionsansatz des Assays ausgeschlossen werden konnte, wurde das Lösungsmittel DMSO als Lösungsmittel für die ur-

sprünglichen *n*-Hexan-Extrakte gewählt. Die Untersuchung des Einflusses der Lösungsmittel DMSO und Methanol auf die Enzymaktivität erfolgte in Dreifachbestimmung. Ausgehend von einer maximal eingesetzten Konzentration von 40 % Lösungsmittel i.A. sind zehn 1:2 Verdünnungen hergestellt worden.

Da der Einsatz organischer Lösungsmittel möglicherweise eine Veränderung der  $K_m$ -Werte bedingt, wurden diese mit den ermittelten Lösungsmittelanteilen unter realen Messbedingungen erneut ermittelt.

### 6.5.5. Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Der  $IC_{50}$ -Wert (die mittlere inhibitorische Konzentration) beschreibt die Konzentration einer inhibitorischen Substanz, die die Enzymaktivität *in vitro* um 50 % (halbmaximale Inhibition) senken kann.

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte in Dreifachbestimmung wobei sich die Reaktionsansätze wie unter 6.5.6 beschrieben zusammensetzten und mindestens sechs Verdünnungen vermessen wurden. Die Berechnung erfolgte mittels GraphPad Prism 4.

### 6.5.6. QC-Assay Testsystem

Der Assay wurde in transparenten 96-Well-Mikrotiterplatten (NUNC, Costar Corning Incorporated, Acton, MA, USA), als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Messansätze betragen ein Gesamtvolumen von 250  $\mu$ L pro Well. Diese setzen sich aus 100  $\mu$ L 0.25 mM Substrat, 50  $\mu$ L 0,2 mg/mL Probe und 25  $\mu$ L Hilfsenzyme pGAP zusammen. Da die QC-Aktivität pH-abhängig ist, wurden jedem Messansatz 50  $\mu$ L Tris-Puffer (0.1 M; pH 8) zugesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte nach 10 minütiger Inkubation bei 30 °C durch Zugabe von 25  $\mu$ L QC.

Die Messungen bzw. die Zunahme des freien AMC wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von 12 min (~27 Zyklen) bei einer Temperatur von 30 °C an einem FluoStar Multiplate Reader der Firma BMG-Labtech bei  $\lambda_{ex}$ =380 nm und  $\lambda_{em}$ =460 nm gemessen. [Schilling *et al.*, 2002; 2004].

Als positiv werden die Hits definiert, die eine Enzyminhibierung größer als 20 % aufweisen.

In Vorversuchen wurde der Einfluss der zu untersuchenden Extrakte auf die Aktivität des Hilfsenzym pGAP mit dem Substrat Pyr-AMC überprüft. Der Ansatz setzte sich aus 100  $\mu$ l Substrat, 100  $\mu$ l Extrakt und 50  $\mu$ l Enzym zusammen. Die Substratkonzentration im Ansatz lag bei  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Als Puffer wurde 0,1M Tris + 1mM DTE pH 8 verwendet. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 30 °C, wurde die kontinuierliche Zunahme des freien AMC über einen Zeitraum von 12 min (~27 Zyklen) bei gleicher Temperatur gemessen.

## 6.6. Massenspektrometrie

### 6.6.1. UPLC-ESI-Ion trap MS<sup>n</sup>

Die massenspektrometrische Analyse nach chromatographischer Auftrennung der komplexen Extrakte mit einer Acquity UPLC-Anlage der Firma Waters an einer RP18-Säule (Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu$ m, 1x100mm, Waters) erfolgte mittels einer Ionenfalle LCQ Deca XP

MAX der Firma Thermo Finnigan. Die Proben wurden bei positiver und bei negativer Ionisierung in getrennten Messungen analysiert. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray Ionisation (ESI) bei einer Sprayspannung von 4 kV, einer Kapillartemperatur von 275°C und einer Kapillarspannung von 27 V unter Verwendung von Stickstoff als Schutzgas (Flussrate 35 – 40 arb. units).

Die chromatographischen Auftrennungen an einer RP18 HSS T3 1,8 µm, 1,0 x 100 mm (SerialNo: 01183023815308; Waters) Säule wurden bei einer Säulentemperatur von 40°C und der Verwendung eines Gradientensystems aus bidest. H<sub>2</sub>O und Acetonitril (Fa. Baker) unter Zusatz von 0,2 % CH<sub>3</sub>COOH (Fa. Baker) bei einer Flussrate von 0,150 mL/min durchgeführt. Die Injektion der Proben erfolgte im „Partial Injection with Needle Overfill“-Modus mit einem Injektionsvolumen von 1 µL in eine 10 µL Probenschleife mittels des Autosamplers des Acquity UPLC Systems. Die Detektion der Metaboliten erfolgte mittels eines PDA-Detektors in einem Bereich von 210 – 400 nm sowie bei den selektiven Wellenlängen  $\lambda = 270, 254$  und 220 nm.

#### Gradientensystem

A = dest.H<sub>2</sub>O, 0.2 % CH<sub>3</sub>COOH

B = Acetonitril, 0.2 % CH<sub>3</sub>COOH

U1:

Zeit [min]	0	0.2	2.0	5.0	7.5	8.2	9.0	12.0
A [%]	95	95	30	1	0	0	95	95
B [%]	5	5	70	99	100	100	5	5

Jeder Messung folgte ein „Spüllauf“ (Injektion von Methanol).

#### Data dependent MS<sup>2</sup>-Messungen

Die Analyse der komplexen Extrakte erfolgte mittels einer data dependent MS<sup>2</sup> Methode (DDIT – data dependent ion tree) in einem Massenbereich  $m/z$  100 – 1000 Da. Hierbei erfolgte eine automatische Fragmentierung der Metaboliten mit Intensitäten > 105 a.i. in simultanen MS/MS-Experimenten, wobei pro Scan die Auswahl der intensivsten Peaks erfolgte. Es erfolgte ebenfalls eine automatische Fragmentierung der entstandenen Tochterionen in simultanen MS<sup>3</sup>-Experimenten bei einer Mindestintensität von 5000 a.i.. Hierbei wurde ein Massenbereich von  $m/z$  80 – 1000 Da mit einer Isolierungsweite von +/- 2 Da gewählt. Die Fragmentierungen wurden bei einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 35 % durchgeführt.

Die Messungen der komplexen Extrakte für die Datenanalysen erfolgten dreifach.

#### Fragmentierungsuntersuchungen

Gezielte Fragmentierungen wurden bei normalisierter Kollisionsenergie von 35 bzw. 45 % und einer Isolierungsweite von 2 Da in individuellen MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup> und MS<sup>4</sup> Experimenten vorgenommen. Die Einstellungen für die Ionenfalle (Aktivierung Q = 0,250 und Aktivierungszeit = 30,000 ms) erfolgte nach den Standardeinstellungen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Xcalibur 2.0 (Fa. Thermo Scientific).

### **6.6.2. ESI-FTICR MS**

Eine hochauflösende massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels eines Fourier Transformation Ionenzyklotronresonanz (FTICR) Massenspektrometer Bruker Apex III 70e der Firma Bruker Daltonics, welches mit einer Infinity<sup>TM</sup> Zelle und einem 7.0 Tesla Magneten ausgestattet ist. Die Injektion der methanolischen Proben erfolgte über Direkteinlass mittels einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 120  $\mu\text{L}/\text{h}$ . Die Ionisierung wurde mit einer APOLLO-Electrospray Ionenquelle der Firma Agilent („off-axis“ Spray) bei einer Kapillarspannung von 4,2 kV erzeugt (Capillary Exit 100 V, Skimmer 1:15 V und Skimmer 2:6 bzw. 10 V). Als Zerstäubergas wurde Stickstoff verwendet.

Die Auswertung der Massenspektren und die Berechnung der Summenformeln erfolgte mit der XMass – Software Version 6.1.2 der Firma Bruker Daltonics.

Die Messungen der komplexen Extrakte für die Datenanalysen erfolgten dreifach.

### **6.6.3. ESI-API-MS**

Die Aufnahme der ESI-Massenspektren erfolgte mittels eines API-150EX Massenspektrometers mit einer „Turbo Ion Spray“-Ionenquelle der Firma Applied Biosystems. Die Probeninjektion (10  $\mu\text{L}$ ) erfolgte über Direkteinlass in einen kontinuierlichen Fluss eines MeOH/H<sub>2</sub>O Gemisch (6:4; v/v) bei einer Fließgeschwindigkeit von 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

## **6.7. Datenanalyse**

Die Datenanalyse erfolgte mittels der Software R Version 2.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing).

Die massenspektrometrischen „Rohdaten“ aus den UPLC-ESI-MS<sup>n</sup>- und FTICR-MS Messungen wurden vor Beginn der Datenanalyse in das mzXML- bzw. cdf-Dateiformat transformiert.

Die Datenfiles der FTICR-MS Messungen wurden mit dem Konvertierungsprogramm der Firma Thermo in das cdf-Dateiformat umgewandelt.

Die Konvertierung der UPLC-ESI-MS Datenfiles erfolgte mittels der Software ProteoWizard in ein mzXML-Dateiformat.

### **6.7.1. Peakpicking und Alignment**

Die Durchführung des Peakpickings und Alignments erfolgte mittels XCMS nach den im Anhang 1) beschriebenen Skripten.

Die Datenausgabe erfolgt als alignierte Datenmatrix.

### **6.7.2. Korrelationsanalyse (AcorA)**

Für die Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) wurden die massenspektrometrischen Metabolitenprofile (UPLC-ESI-MS; FTICR-MS) mit den Bioaktivitätsdaten der Bioassays unter Verwendung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ( $\alpha = 5\%$ ) korreliert. Das hierfür verwendete Skript ist unter 2) im Anhang beschrieben.

## 6.8. Isolierung und Aufreinigung

### 6.8.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die flüssigkeitschromatographische Trennung erfolgte mittels HPLC System der Firma Varian bestehend aus zwei Varian ProStar® 218 Modulen, einem Pro Star 330 PDA-Detektor, einen Fraktionssammler Model 701 und der Software „Varian Star chromatography Work station“ Version 6.0. Das System verfügte über einen analytischen und einen präparativen Kapillarenkreislauf sowie über eine analytische und eine präparative Durchflusszelle im PDA-Detektor, so dass das System zur analytischen oder präparativen Trennung eingesetzt werden konnte. Je nach Trennaufgabe wurden folgende Trennsysteme verwendet:

**HC1.** Stationäre Phase: RP-18; Säulennr. 52; Flussrate: 1 mL/min, ggf. Fraktionierung: alle 90 s,  
Mobile Phase: A: H<sub>2</sub>O / B: ACN

Gradientensystem:

Zeit [min]	0,0	30,0	40,0
A [%]	99	0	0
B [%]	1	100	100

**HC2.** Stationäre Phase: RP-18; Säulennr. 174; Flussrate: 10 mL/min, ggf. Fraktionierung: alle 90 s,  
Mobile Phase: A: H<sub>2</sub>O / B: ACN

Gradientensystem:

Zeit [min]	0,0	30,0	40,0
A [%]	99	0	0
B [%]	1	100	100

**HC3.** Stationäre Phase: RP-18; Säulennr. 52; Flussrate: 0,4 mL/min,  
Mobile Phase: A: H<sub>2</sub>O / B: ACN

Gradientensystem:

Zeit [min]	0,0	15,0
A [%]	50	0
B [%]	50	100

### 6.8.2. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die säulenchromatographische Trennung erfolgte an Sephadex G-15 (Firma Pharmacia) in einer zylindrischen Glassäule (VL=700 mL; Länge= 100 cm, Ø 5 cm). Die Konditionierung wurde mit 2 SV 70 %igem Methanol durchgeführt. Als mobile wurde 70 %iges Methanol verwendet. Die Flussrate betrug 1,5 mL/min. Die Fraktionierung erfolgte unter Verwendung eines Fraktionssammlers aller 5,28 min (8 mL) in 95 Fraktionen. Der Nachlauf aus 3 SV wurde als 96. Fraktion gesammelt.

### 6.8.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünnschichtchromatographischen Analysen erfolgten auf Kieselgel 60<sub>F254</sub> Aluminiumfolien der Firma Merck sowie Macherey&Nagel.

Als Laufmittelsysteme wurde die nachfolgend als DCX bezeichnete mobile Phase verwendet:

DC1. Ethylacetat : Methanol : 1 M CH<sub>3</sub>COOH (24:6:1, v/v/v)

DC2. Toluol : Ethylformiat : 1 M HCOOH (10:5:3, v/v/v)

Die Detektion der Banden erfolgte visuell bei Tageslicht sowie bei Wellenlängen von  $\lambda = 254$  nm und  $\lambda = 366$  nm.

#### 6.8.3.1. Sprühreagenz Vanilin-Schwefelsäure

Die Herstellung des Vanillin-Schwefelsäure Reagenz zum Nachweis für eine Vielzahl von Verbindungen wie Alkohole, Steroide, Phenole erfolgte unter Verwendung von 1,2 g Vanillin, 210 mL MeOH, 25 mL Eisessig und 10 mL 98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, welche unter Kühlung vorsichtig zusammen gegeben wurden.

Das Reagenz wurde auf die entwickelten DC-Folien aufgesprüht und mit dem warmen Luftstrom eines Föns getrocknet.

#### 6.8.3.2. Sprühreagenz Orcinol

Als Nachweisreagenz für glycospezifische Strukturen wurde das Sprühreagenz Orcinol verwendet.

Die Herstellung dieses Reagenz erfolgte unter Verwendung von 1,66 g Fe<sub>3</sub>Cl\*6H<sub>2</sub>O in 100 ml 10 %iger Schwefelsäure (Lösung A) welche im Verhältnis 10:1 mit Lösung B, bestehend aus 0,6 g Orcinol in 10 mL EtOH, gemischt wurde.

Für die Farbreaktion wird die Orcinollösung auf die DC-Platte gesprüht und anschließend 10 min bei 100°C entwickelt.

### 6.8.4. Aufreinigung der Sulfolipide

#### 6.8.4.1. Aufreinigung mittels NH<sub>2</sub>-Kartuschen

Die Aufreinigung der Sulfolipide erfolgte nach einer Methode von Naumann (2009). Hierbei wurden aminopropylmodifizierte Kieselgel-Kartuschen (NH<sub>2</sub>-Kartuschen) der Firma Macherey&Nagel mit 3 mL/500 mg und 6 mL/1000 mg eingesetzt. Die Konditionierung der Kartuschen erfolgte in mehreren Schritten unter der Verwendung von 2 mL MeOH, 2 mL H<sub>2</sub>O, 4 mL 0,1M HCL (für 1h auf Säule), 2 mL H<sub>2</sub>O, 2 mL MeOH, 2 mL DCM/Isoprop./MeOH (15:30:50 v/v/v). Pro Kartusche erfolgte ein Probenauftrag von 20 mg gelöst in DCM/MeOH (1:1; v/v).

Bei Verwendung von 6 mL/1000 mg Kartuschen wurden die Volumina der verwendeten Lösungsmittel sowie der aufgetragenen Probe verdoppelt.

Die Elution erfolgte in 2 Schritten, wobei zunächst die ungeladenen Substanzen mit 9 ml DCM/Isopropanol/MeOH 15:30:50 (v/v/v) eluiert wurden. Anschließend wurden in einem

2. Elutionsschritt mit 5 mL DCM/ACN/Isoprop./MeOH/ 0,1M NH<sub>4</sub>Ac (10:10:10:50:15; v/v/v/v/v) die Sulfolipide eluiert.

Der Fraktion 2 wurde mittels Vakuum-Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entzogen.

### 6.8.4.2. Folch Wash (Entsalzung)

Die mittels NH<sub>2</sub>-Kartuschen gewonnenen Sulfolipid Fraktionen wurden mittels Folch Wash entsalzt. Hierbei wurden zu den in Spitzkolben eingeeengten Fraktionen ein Lösemittelgemisch aus DCM/MeOH/0,1 NaAc-Puffer pH=4,0 (8:4:3, v/v/v) zugegeben und kräftig mehrere Minuten geschüttelt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C entstand ein Zweiphasensystem, wobei sich die Sulfolipide in der unteren lipophilen Phase anreicherten. Diese untere Sulfolipid-Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in einen Rundkolben überführt und bis zur Trockne mittels Vakuum-Rotationsverdampfer eingeeengt.

## 6.9. Molecular Modellig

In Docking Studien wurden Verbindungen auf ihre Fähigkeit im aktiven Zentrum der humanen QC zu binden, untersucht. Die Durchführung der Studien erfolgte von Dr. S. Aust mit dem Programm *GOLD V4.0.1*. unter Verwendung der nachfolgenden Parameter:

- Protein: humane QC (3pbb.pdb, Kette A ohne Inhibitor)
- active site: 15 Å um Zinkatom
- 30 Docking-runs im Standard Modus
- Scoringfunktion: GoldScore (je höher der Score-Wert desto stärker die Ligand-Enzymbindung)

## 6.10. UV/Vis Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mittels eines JASCO J-560 Spektrophotometers aufgenommen. Die Messungen der Proben erfolgten in 1 cm Standard-Quarzküvetten gegen das Lösungsmittel im Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software V500W.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift Psychiatr.* **1907**, *64*, 146–148.
2. Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Gemma-Claire, A.; Wu, Y.-T.; Prina, M. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Dis. Int.* 2015, *84*.
3. Delrieu, J.; Ousset, P. J.; Caillaud, C.; Vellas, B. "Clinical trials in Alzheimer's disease": immunotherapy approaches. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 186–193.
4. Galimberti, D.; Scarpini, E. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2011**, *4*, 203–216.
5. Kreuzberger, M. Neuronale Verteilung des Enzyms Glutaminylzyklase im Kortex und der hippocampalen Formation des humanen Gehirns, Universität Leipzig, 2015.
6. Schilling, S.; Hoffmann, T.; Manhart, S.; Hoffmann, M.; Demuth, H.-U. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* **2004**, *563*, 191–6.
7. Cynis, H.; Schilling, S.; Bodnár, M.; Hoffmann, T.; Heiser, U.; Saido, T. C.; Demuth, H.-U. Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 1618–25.
8. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 15–61.
9. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 35–94.
10. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170–244.
11. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. a; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 160–258.
12. Sakai, R.; Swanson, G. T. Recent progress in neuroactive marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 273–309.
13. Hoek, C. Van Den; Jahns, H. M.; Mann, D. G. *Algen.*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1993.
14. Metting, B.; Pyne, J. W. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8*, 386–394.
15. Borowitzka, M. a. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 743–756.
16. Cardozo, K. H. M.; Guaratini, T.; Barros, M. P.; Falcão, V. R.; Tonon, A. P.; Lopes, N. P.; Campos, S.; Torres, M. a; Souza, A. O.; Colepicolo, P.; Pinto, E. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 60–78.
17. Lindequist, U.; Schweder, T. Marine Biotechnology. In *Biotechnology*; Rehm, H. J.; Reed, G. (Hrsg), Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp. 441–484.
18. Kelecom, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2002**, *74*, 151–170.
19. Ishihajra, M.; Mori, N.; Taira, T.; Toyama, S. Purification and. *Food Sci. Technol. Res.* **2000**, *6*, 161–165.
20. Ishihara, M.; Shiroma, T.; Taira, T.; Tawata, S. Purification and characterization of extracellular cysteine protease inhibitor, ECPI-2, from *Chlorella* sp. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 166–71.
21. Chang, W.-P.; Koelsch, G.; Wong, S.; Downs, D.; Da, H.; Weerasena, V.; Gordon, B.; Devasamudram, T.; Bilcer, G.; Ghosh, A. K.; Tang, J. In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J. Neurochem.* **2004**, *89*, 1409–16.
22. Gunasekera, S. P.; Miller, M. W.; Kwan, J. C.; Luesch, H.; Paul, V. J. Molassamide, a depsipeptide serine protease inhibitor from the marine cyanobacterium *Dichothrix utrahensis*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *74* ASAP.
23. Joe, M. J.; Kim, S. N.; Choi, H. Y.; Shin, W. S.; Park, G. M.; Kang, D. W.; Kim, Y. K. The inhibitory effect of eckol and dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1735–1739.

24. Xiancui, L.; Rongli, N.; Xiao, F.; Lijun, H.; Lixin, Z. Macroalage as a source of alpha-glucosidase inhibitors. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* **2005**, *23*, 354–356.
25. Smit, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* **2004**, *16*, 245–262.
26. Ryu, G.; Park, S. H.; Kim, E. S.; Choi, B. W.; Ryu, S. Y.; Lee, B. H. Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 796–799.
27. Barwell, C. J.; Blunden, G.; Manandhar, P. D. Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of  $\alpha$ -amylase, lipase and trypsin. *J. Appl. Phycol.* **1989**, *1*, 319–323.
28. Vale, C.; Botana, L. M. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6060–6066.
29. Taori, K.; Matthew, S.; Rocca, J. R.; Paul, V. J.; Luesch, H. Lyngbyastatins 5–7, Potent Elastase Inhibitors from Floridian Marine Cyanobacteria, *Lyngbya* spp. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1593–1600.
30. Tonk, L.; Welker, M.; Huisman, J.; Visser, P. M. Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. *Harmful Algae* **2009**, *8*, 219–224.
31. Bister, B., Keller, S., Baumann, H. I., Nicholson, G., Weist, S., Jung, G.; Jüttner, F. Cyanopeptolin 963A, a chymotrypsin inhibitor of *Microcystis* PCC 7806. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1755–1757.
32. Reshef, V.; Carmeli, S. New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7361–7369.
33. Nara, T.; Kamei, Y.; Tsubouchi, A.; Annoura, T.; Hirota, K.; Iizumi, K.; Dohmoto, Y.; Ono, T.; Aoki, T. Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. *Parasitol. Int.* **2005**, *54*, 59–64.
34. Stirk, W. A.; Reinecke, D. L.; Van Staden, J. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *19*, 271–276.
35. Yoon, N. Y.; Chung, H. Y.; Kim, H. R.; Choi, J. S. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish. Sci.* **2008**, *74*, 200–207.
36. Yoon, N. Y.; Lee, S.-H.; Kim, S.-K. Phlorotannins from *Ishige okamurae* and their acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory effects. *J. Funct. Foods* **2009**, *1*, 331–335.
37. Suganthy, N.; Karutha Pandian, S.; Pandima Devi, K. Neuroprotective effect of seaweeds inhabiting South Indian coastal area (Hare Island, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve): Cholinesterase inhibitory effect of *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata*. *Neurosci. Lett.* **2010**, *468*, 216–219.
38. Jung, H. A.; Oh, S. H.; Choi, J. S. Molecular docking studies of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* with BACE1 inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3211–3215.
39. Mehta, P. D.; Pirttilä, T. Biological markers of Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* **2002**, *56*, 74–84.
40. Leuchtweis, A. F. Aktivierung des zerebralen Metabolismus durch passive audiovisuelle Stimulation. Technische Universität München, **2007**.
41. Selkoe, D. J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **1999**, *399*, A23–A31.
42. Selkoe, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–768.
43. Jellinger, K. A. Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) - Eine aktuelle Übersicht. *J. für Neurol. Neurochirurgie und Psychiatr.* **2005**, *6*, 9–18.
44. Deutschl, G.; Maier, W. Methodenreport und Evidenztabelle zur S3-Leitlinie " Demenzen "; **2009**.
45. Wallesch, C.-W.; Förstl, H. Demenzen.; *Gerog Thieme Verlag Stuttgart*, **2005**.
46. Moser, U.; Kaser, S.; Winkler, D. Therapie der Alzheimer-Demenz: Status quo und Zukunftsperspektiven. *J. für Neurol. Neurochirurgie und Psychiatr.* **2010**, *11*, 72–78.
47. Huang, Y.; Mucke, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* **2012**, *148*, 1204–1222.

48. Prince, M. A.; Albanese, E.; Guerchet, M.; Prina, M.; Richard Pender, C.; Ferri, C.; Mazzotti, D. R.; Piovezan, R. D.; Padilla, I.; Luchsinger, J. World Alzheimer Report 2014 Dementia and Risk Reduction an Analysis of Protective and Modifiable Factors Supported. **2014**.
49. Deutsche Alzheimer Gesellschaft (DAIzG) [www.deutsche-alzheimer.de](http://www.deutsche-alzheimer.de) (accessed Jan 1, 2014).
50. Wimo, A.; Prince, M. World Alzheimer Report 2010: the global economic impact of dementia. *Alzheimer's Dis. Intern.* **2010**.
51. Petersen, R. C.; Smith, G. E.; Waring, S. C.; Ivnik, R. J.; Kokmen, E.; Tangelos, E. G. Aging, memory and mild cognitive impairment. *Psychogeriatr.* **1997**, *9*, 65–69.
52. Ball, M. J. Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol.* **1977**, *37*, 111–118.
53. Whitehouse, P.; Price, D.; Struble, R.; Clark, A.; Coyle, J.; Delon, M. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **1982**, *215*, 1237–1239.
54. Davies, C. a.; Mann, D. M. a.; Sumpter, P. Q.; Yates, P. O. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **1987**, *78*, 151–164.
55. Gómez-Isla, T.; Price, J. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 4491–4500.
56. Galimberti, D.; Scarpini, E. Progress in Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **2012**, *259*, 201–211.
57. Casey, G. Alzheimer's and other dementias. *Kai Tiaki Nurs. New Zeal.* **2012**, *18*, 20-24.
58. Price, D. L.; Sisodia, S. S.; Borchelt, D. R. Alzheimer disease--when and why? *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 314–316.
59. Poeck, K.; Hacke, W. Demenzkrankheiten. In *Neurologie*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2006**, 546–557.
60. McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* **1984**, *34*, 939–944.
61. Plaque Bild [www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/aktuelles.htm?showid=3183](http://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/aktuelles.htm?showid=3183);
62. Bild Tangle [https://www.alz.org/braintour/plaques\\_tangles.asp](https://www.alz.org/braintour/plaques_tangles.asp).
63. Braak, H.; Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **1991**, *82*, 239–259.
64. Braak, H.; Braak, E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol. Aging* **1995**, *16*, 271–278.
65. Mrak, R. E.; Sheng, J. G.; Griffin, W. S. T. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum. Pathol.* **1995**, *26*, 816–823.
66. Haass, C.; Selkoe, D. J. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* **1993**, *75*, 1039–1042.
67. Shankar, G. M.; Bloodgood, B. L.; Townsend, M.; Walsh, D. M.; Selkoe, D. J.; Sabatini, B. L. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2866–2875.
68. Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. A $\beta$  oligomers—a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172–1184.
69. Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E.; Smith, I.; Regan, C. M. Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 837–842.
70. Irvine, G.; El-Agnaf, O.; Shankar, G. M.; Walsh, D. M. Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Mol. Med.* **2008**, *14*, 451–464.
71. Weingarten, M. D.; Lockwood, A. H.; Hwo, S. Y.; Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 1858–1862.
72. Goedert, M.; Spillantini, M. C.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R. A. Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and localization in Neurofibrillan Tangles of Alzheimer ' s Disease is found. *Neuron* **1989**, *3*, 519–526.
73. Ksiazek-Reding, H.; Liu, W. K.; Yen, S. H. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* **1992**, *597*, 209–219.

74. Köpke, E.; Tung, Y. C.; Shaikh, S.; Alonso, A. D. C.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I. Microtubule-associated protein tau: Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24374–24384.
75. Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **1996**, *383*, 550–553.
76. Alzheimer. *Spektrum der Wiss. Spez. Biol. - Medizin - Kult.* **2012**, *3*.
77. Tanzi, R. E.; Gusella, J. F.; Watkins, P. C.; Bruns, G. A.; St George-Hyslop, P.; Van Keuren, M. L.; Neve, R. L. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **1987**, *235*, 880–884.
78. Goldgaber, D.; Lerman, M. I.; McBride, O. W.; Saffiotti, U.; Gajdusek, D. C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* **1987**, *235*, 877–880.
79. Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Müller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **1987**, *325*, 733–736.
80. Robakis, N. K.; Ramakrishna, N.; Wolfe, G.; Wisniewski, H. M. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4190–4194.
81. Yoshikai, S. I.; Sasaki, H.; Doh-ura, K.; Furuya, H.; Sakaki, Y. (1991). Genomic organization of the human-amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* **1991**, *102*, 291–292.
82. Haass, C.; Hung, a Y.; Selkoe, D. J. Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 3783–3793.
83. Wertkin, A. M.; Turner, R. S.; Pleasure, S. J.; Golde, T. E.; Younkin, S. G.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9513–9517.
84. Lorenzo, A.; Yuan, M.; Zhang, Z.; Paganetti, P. A.; Sturchler-Pierrat, C.; Staufenbiel, M.; Yankner, B. A. Amyloid  $\beta$  interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 460–464.
85. Shaked, G. M.; Kummer, M. P.; Lu, D. C.; Galvan, V.; Bredesen, D. E.; Koo, E. H. A $\beta$  induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597–624). *FASEB J.* **2006**, *20*, 1254–1256.
86. Trapp, B. D.; Hauer, P. E. Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development. *J. Neurosci. Res.* **1994**, *37*, 538–550.
87. Dawbarn, D.; Allen, S. J. *Neurobiology of Alzheimer's disease*; Oxford University Press USA., **2007**.
88. Kamal, A.; Stokin, G. B.; Yang, Z.; Xia, C. H.; Goldstein, L. S. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* **2000**, *28*, 449–459.
89. Kamal, A.; Almenar-Queralt, A.; LeBlanc, J. F.; Roberts, E. A.; Goldstein, L. S. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing  $\beta$ -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* **2001**, *414*, 643–648.
90. Matsuda, S.; Matsuda, Y.; D'Adamio, L. Amyloid  $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP), but not A $\beta$ PP-like protein 2, is bridged to the kinesin light chain by the scaffold protein JNK-interacting protein 1. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38601–38606.
91. Lazarov, O.; Morfini, G. A.; Lee, E. B.; Farah, M. H.; Szodorai, A.; DeBoer, S. R.; Price, D. L. Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 2386–2395.
92. Haass, C.; Schlossmacher, M. G.; Hung, A. Y.; Vigo-Pelfrey, C.; Mellon, A.; Ostaszewski, B. L.; Teplow, D. B. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **1992**, *359*, 322–325.
93. Cook, D. G.; Forman, M. S.; Sung, J. C.; Leight, S.; Kolson, D. L.; Iwatsubo, T.; Doms, R. W. Alzheimer's A $\beta$  (1–42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1021–1023.

94. Selkoe, D. J. Deciphering the genesis and fate of amyloid  $\beta$ -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 1375–1381.
95. Esch, F. S.; Keim, P. S.; Beattie, E. C.; Blacher, R. W.; Culwell, A. R.; Oltersdorf, T.; Ward, P. J. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **1990**, *248*, 1122–1124.
96. Chow, V. W.; Mattson, M. P.; Wong, P. C.; Gleichmann, M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* **2010**, *12*, 1–12.
97. Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D.; Jacobson-Croak, K.; et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein  $\beta$ -secretase from human brain. *Nature* **1999**, *402*, 537–540.
98. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., ... & Luo, Y. Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* **1999**, *286*, 735–741.
99. Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., ... & Carter, D. B. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase activity. *Nature* **1999**, *402*, 533–537.
100. Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., ... & Younkin, S. G. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **1994**, *264*, 1336–1340.
101. Hardy, J. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* **1996**, *94*, 13–17.
102. Glabe, C. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **2001**, *17*, 137–145.
103. Mori, H.; Takio, K.; Ogawara, M.; Selkoe, D. J. Mass spectrometry of purified amyloid  $\beta$ -protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17082–17086.
104. Jawhar, S.; Wirths, O.; Bayer, T. a Pyroglutamate amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ): a hatchet man in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38825–38832.
105. Jawhar, S.; Wirths, O.; Schilling, S.; Graubner, S.; Demuth, H.-U.; Bayer, T. a Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A $\beta$  formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 4454–4460.
106. Schilling, S.; Zeitschel, U.; Hoffmann, T.; Heiser, U.; Francke, M.; Kehlen, A.; Holzer, M.; Hutter-Paier, B.; Prokesch, M.; Windisch, M.; Jagla, W.; Schlenzig, D.; Lindner, C.; Rudolph, T.; Reuter, G.; Cynis, H.; Montag, D.; Demuth, H.-U.; Rossner, S. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A $\beta$  and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1106–1111.
107. Russo, C.; Violani, E.; Salis, S.; Venezia, V.; Dolcini, V.; Damonte, G.; Benatti, U.; D'Arrigo, C.; Patrone, E.; Carlo, P.; Schettini, G. Pyroglutamate-modified amyloid  $\beta$ -peptides - A $\beta$ N3(pE) - strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 1480–1489.
108. Cynis, H.; Scheel, E.; Saido, T. C.; Schilling, S.; Demuth, H. U. Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: Evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7405–7413.
109. Marcello, A., Wirths, O., Schneider-Axmann, T., Degerman-Gunnarsson, M., Lannfelt, L., Bayer, T. A. Reduced levels of IgM autoantibodies against N-truncated pyroglutamate A $\beta$  in plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2011**, *32*, 1379–1387.
110. Wirths, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeyer, A., Jawhar, S., Lucassen, P.J., Kalimo, H. Pyroglutamate A $\beta$  pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J. Neural Transm.* **2010**, *117*, 85–96.
111. Wirths, O., Erck, C., Martens, H., Harmeyer, A., Geumann, C., Jawhar, S., ... & Degerman-Gunnarsson, M. Identification of Low Molecular Weight Pyroglutamate A $\beta$  Oligomers in Alzheimer Disease: a novel tool for therapy and diagnosis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41517–41524.
112. Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 383–388.
113. Golde, T.E., Schneider, L.S., Koo, E. H. Anti-a $\beta$  therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron* **2011**, *69*, 203–213.

114. Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353–356.
115. Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185.
116. Selkoe, D. J. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1060–1065.
117. Casas, C., Sergeant, N., Itier, J. M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Drobecq, H. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A $\beta$  42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1289–1300.
118. McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Vbeyreuther, K., Masters, C. L. Soluble pool of A $\beta$  amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1999**, *46*, 860–866.
119. Wirths, O.; Multhaup, G.; Bayer, T. A. A modified  $\beta$ -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the  $\beta$ -amyloid peptide—the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* **2004**, *91*, 513–520.
120. Christensen, D. Z.; Kraus, S. L.; Flohr, A.; Cotel, M. C.; Wirths, O.; Bayer, T. A. Transient intraneuronal A $\beta$  rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol.* **2008**, *116*, 647–655.
121. Bayer, T. A.; Wirths, O. Intracellular accumulation of amyloid-Beta-a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **2010**, *2*, 8.
122. Klein, W. L. Abeta toxicity in Alzheimer's disease: Globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. Int.* **2002**, *41*, 345–352.
123. Hardy, J. Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, *3*, 71–73.
124. Harmeier, A., Wozny, C., Rost, B. R., Munter, L. M., Hua, H., Georgiev, O., Beyermann, M.; Hildebrand, P. W.; Weise, C.; Schaffner, W. Role of amyloid- $\beta$  glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 7582–7590.
125. Bayer, T. A.; Wirths, O. Intraneuronal A $\beta$  as a trigger for neuron loss: can this be translated into human pathology? *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 857–861.
126. Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J. D. Correlation between elevated levels of amyloid  $\beta$ -peptide in the brain and cognitive decline. *J. Am. Med. Assoc.* **2000**, *283*, 1571–1577.
127. Wirths, O.; Bayer, T. A. Die modifizierte Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz - intraneuronales Abeta induziert Neurodegeneration. *Neuroforum* **2009**, *3*, 76–82.
128. Bianchetti, A.; Ranieri, P.; Margiotta, A.; Trabucchi, M. Pharmacological treatment of Alzheimer's Disease. *Aging Clin. Exp. Res.* **2005**, *18*, 158–162.
129. Courtney, C.; Farrell, D.; Gray, R.; Hills, R.; Lynch, L.; Sellwood, E.; Edwards, S.; Hardayman, W.; Raftery, J.; Crome, P.; Lendon, C.; Shaw, H.; Bentham, P. Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *AD2000 Collab. Group, Lancet* **2004**, *363*, 2105–2115.
130. Jann, M. W.; Shirley, K. L.; Small, G. W. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 719–739.
131. Sugimoto, H.; Ogura, H.; Arai, Y.; Limura, Y.; Yamanishi, Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, *89*, 7–20.
132. ArzneimittelProfil Neurologie; 2008.
133. Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *68*, 209–245.
134. Kar, S., Slowikowski, S.P., Westaway, D., Mount, H. T. Interactions between  $\beta$ -amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.* **2004**, *29*, 427–441.
135. Santos, M.D., Alkondon, M., Pereira, E.F., Aracava, Y., Eisenberg, H.M., Maelicke, A., Albuquerque, E. X. The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1222–1234.

136. Samochocki, M., Höffle, A., Fehrenbacher, A., Jostock, R., Ludwig, J., Christner, C.; Lübbert, H. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 1024–1036.
137. Nissen, C., Nofzinger, E.A., Feige, B., Waldheim, B., Radosa, M.P., Riemann, D., Berger, M. Differential effects of the muscarinic M1 receptor agonist RS-86 and the acetylcholine-esterase inhibitor donepezil on REM sleep regulation in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 1294–1300.
138. Ehret, A., Birthelmer, A., Rutz, S., Riegert, C., Rothmaier, A. K., Jackisch, R. Agonist-mediated regulation of presynaptic receptor function during development of rat septal neurons in culture. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1071–1082.
139. Akasofu, S., Kosasa, T., Kimura, M., Kubota, A. Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen–glucose deprivation. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *472*, 57–63.
140. Takada, Y., Yonezawa, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Sugimoto, H., Akaike, A. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 772–777.
141. Volz, A. Beeinflussung von  $\beta$  -Amyloid-Ablagerungen durch Extrakte von *Humulus lupulus* , *Hypericum perforatum* und *Valeriana officinalis* im Mausmodell der Alzheimer Demenz. Universität Rostock, **2012**.
142. Finzelberg GmbH. Johanniskraut zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen. DE202009018261U1, **2009**.
143. Iwata, N., Higuchi, M., Saido, T. C. Metabolism of amyloid- $\beta$  peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *108*, 129–148.
144. Brody, D. L.; Holtzman, D. M. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, *31*, 175–193.
145. Muyliaert, D., Kremer, A., Jaworski, T., Borghgraef, P., Devijver, H., Croes, S., Van Leuven, F. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , or a link between amyloid and tau pathology? *Genes, Brain Behav.* **2008**, *7*, 57–66.
146. Voderholzer, U., Arolt, V. Therapie psychischer Erkrankungen: state of the art 2007/2008. *Elsevier, Urban&FischerVerlag*, **2008**.
147. Pahnke, J., Krohn, M., Scheffler, K. The role of blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer dementia-implications for immunological therapies for plaque dissolution. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* **2009**, *77*, 21–24.
148. Krohn, M.; Lange, C.; Hofrichter, J.; Scheffler, K.; Stenzel, J.; Steffen, J.; Schumacher, T.; Brüning, T.; Plath, A.; Alfen, F.; Schmidt, A.; Winter, F.; Rateitschak, K.; Wree, A.; Gsponer, J.; Walker, L. C.; Pahnke, J. Cerebral amyloid-  $\beta$  proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 3924–3931.
149. Glasky, A.J., Melchior, C.L., Pirzadeh, B., Heydari, N., Ritzmann, R. F. Effect of AIT-082, a purine analog, on working memory in normal and aged mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *47*, 325–329.
150. Engelhart, M.J., Geerlings, M. I., Ruitenberg, A., van Swieten, J.C., Hofman, A., Witteman, J.C., Breteler, M. M. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 3223–3229.
151. Ritchie, C.W., Bush, A.I., Masters, C. L. Metal-protein attenuating compounds and Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 1585–1592.
152. Volicer, L.; Stelly, M.; Morris, J.; McLaughlin, J.; Volicer, B. J. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **1997**, *12*, 913–919.
153. Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lütjohann, D., Keller, P., Hennerici, M. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 5856–5861.
154. Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I., Grady, D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *J. Am. Med. Assoc.* **1998**, *279*, 688–695.
155. Bishop, K.M., Hofer, E.K., Mehta, A., Ramirez, A., Sun, L., Tuszyński, M., Bartus, R. T. Therapeutic potential of CERE-110 (AAV2-NGF): targeted, stable, and sustained NGF delivery and trophic activity on rodent basal forebrain cholinergic neurons. *Exp. Neurol.* **2008**, *211*, 574–584.

156. Alzforum: Biomedical Research Forum. <http://www.alzforum.org>, **12/2015**
157. U.S. National Institutes of Health (Datenbank Klinische Studien). <https://clinicaltrials.gov>, **12/2015**
158. Yi, P.; Schrott, L.; Castor, T. P.; Alexander, J. S. Bryostatins vs. TPPB: dose-dependent APP processing and PKC- $\alpha$ , - $\delta$ , and - $\epsilon$  isoform activation in SH-SY5Y neuronal cells. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 234–44.
159. Pando, M., Marcade, M., Peillon, H., Rayer, A., Drouin, D., Desire, L. An alpha-secretase stimulator drug for cognitive disorders associated with neurodegeneration. In *12th congress of the European Federation of Neurological Societies*; **2008**, Madrid, Spanien.
160. Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Grbovic, O. Calpain activity regulates the cell surface distribution of amyloid precursor protein. Inhibition of calpains enhances endosomal generation of beta-cleaved C-terminal APP fragments. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36415–36424.
161. Bateman, R.J., Siemers, E.R., Mawuenyega, K.G., Wen, G., Browning, K. R.; Sigurdson, W. C.; Yarasheski, K. E.; Friedrich, S. W.; Demattos, R. B.; May, P. C.; Paul, S. M.; Holtzman, D. M. A gamma-secretase inhibitor decreases amyloid- $\beta$  production in the central nervous system. *Ann. Neurol.* **2009**, *66*, 48–54.
162. Albright, C.F., Dockens, R., Olson, R.E., Meredith, J., Slemmon, R., Lentz, K., Wang, J.; Denton, R.; Pilcher, G.; Zacaek, R.; Macor, J. E.; Wong, O.; Gu, H.; Berman, R.; Tong, G. BMS-708163, a potent and selective  $\gamma$ -secretase inhibitor, decreases CSF A $\beta$  at safe and tolerable doses in animals and humans. In *International Conference on Alzheimer's Disease*; **2008**, Chicago, Illinois, USA.
163. Wang, J., Ho, L., Pasinetti, G. M. The Development of NIC5-15, a natural anti-diabetic agent, in the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2005**, *1*, 62.
164. Schneeberger, A., Mandler, M., Otava, O., Zauner, W., Mattner, F., Schmidt, W. Development of affitope vaccines for Alzheimer's disease (AD)—from concept to clinical testing. *J. Nutr. Heal. Aging* **2009**, *13*, 264–267.
165. Ryan, J.M., & Grundman, M. Anti-amyloid- $\beta$  immunotherapy in Alzheimer's disease: ACC-001 clinical trials are ongoing. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *17*, 243.
166. Vellas, B.; Black, R.; Thal, L. J.; Fox, N. C.; Daniels, M.; McLennan, G.; Tompkins, C.; Leibman, C.; Pomfret, M.; Grundman, M.; AN1792 (QS-21)-251 Study Team Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 144–151.
167. Kingwell, K. Alzheimer disease: Amyloid- $\beta$  immunotherapy CAD106 passes first safety test in patients with Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2012**, *8*, 414.
168. WHO Trials Registry. [http://www.who.int/ictrp/trial\\_reg/en/index1.html](http://www.who.int/ictrp/trial_reg/en/index1.html), **12/2015**
169. Hughes, R.A.C., Dalakas, M. C., Cornblath, D.R., Latov, N., Weksler, M.E., Relkin, N. Clinical applications of intravenous immunoglobulins in neurology. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *158*, 34–42.
170. Dodel, R.; Rominger, A.; Bartenstein, P.; Barkhof, F.; Blennow, K.; F?rster, S.; Winter, Y.; Bach, J. P.; Popp, J.; Alferink, J.; Wiltfang, J.; Buerger, K.; Otto, M.; Antuono, P.; Jacoby, M.; Richter, R.; Stevens, J.; Melamed, I.; Goldstein, J.; Haag, S.; Wietek, S.; Farlow, M.; Jessen, F. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: A phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 233–243.
171. Aisen, P.S., Vellas, B. Passive immunotherapy for Alzheimer's disease: what have we learned, and where are we headed?. *J. Nutr. Health Aging* **2013**, *17*, 49-50.
172. Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C.; Luthman, J.; Teplow, D. B.; Younkin, S. G.; Näslund, J.; Lannfelt, L. The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 887–893.
173. Adolfsson, O., Pihlgren, M., Toni, N., Varisco, Y., Buccarello, A. L., Antonello, K., Lohmann, S., Maloney, J. An effector-reduced anti- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) antibody with unique A $\beta$  binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A $\beta$ . *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 9677–9689.
174. Ostrowitzki, S., Deptula, D., Thurfjell, L., Barkhof, F., Bohrmann, B., Brooks, D.J., Loetscher, H. Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 198–207.

175. Sabbagh, M.N., Agro, A., Bell, J., Aisen, P.S., Schweizer, E., Galasko, D. PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2011**, *25*, 206.
176. Hilt, D., Gawryl, M., Koenig, G., E.-6124 S. G. Evp-6124: Safety, Tolerability and cognitive effects of a novel alpha-7 nicotinic receptor agonist in Alzheimer'S disease patients on stable donepezil or rivastigmine therapy. *Alzheimer's Dement.* **2009**, *5*, 32.
177. U.S. Department of Health & Human Service: National Institute on Aging. <https://www.nia.nih.gov/>, **08/2014**
178. Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D. W., Lee, C.D., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Brunden, K. R. ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **2012**, *335*, 1503–1506.
179. Lange, C. Der Einfluss des Blut-Hirn-Schranken ABC-Transporters ABCC1 auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz. *Universität Rostock*, **2012**.
180. Teotico, D.G., Bischof, J.J., Peng, L., Kliewer, S.A., Redinbo, M. R. Structural basis of human pregnane X receptor activation by the hops constituent colupulone. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1512–1520.
181. Cole, G. M., Teter, B., Frautschy, S. A. Neuroprotective effects of curcumin. In *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*; Springer US., **2007**, 197–212.
182. Zhou, S., Lim, L.Y., Chowbay, B. Herbal Modulation of P-Glycoprotein. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36*, 57–104.
183. Dastmalchi, K.; Dorman, H. J. D.; Vuorela, H.; Hiltunen, R. Plants as Potential Sources for Drug Development against Alzheimer ' s Disease. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* **2007**, *1*, 83–104.
184. Bowen, R.L., Verdile, G., Liu, T., Parlow, A.F., Perry, G., Smith, M.A., Atwood, C. S. Luteinizing hormone, a reproductive regulator that modulates the processing of amyloid- $\beta$  precursor protein and amyloid- $\beta$  deposition. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20539–20545.
185. Long-Smith, C. M.; Manning, S.; McClean, P. L.; Coakley, M. F.; O'Halloran, D. J.; Holscher, C.; O'Neill, C. The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid-beta plaque and glial pathology in a mouse model of alzheimer's disease. *NeuroMolecular Med.* **2013**, *15*, 102–114.
186. McClean, P.L., Parthasarathy, V., Faivre, E., Hölscher, C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 6587–6594.
187. Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castaño, E.M., Frangione, B.  $\beta$ -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 822–826.
188. Crouch, P.J., Savva, M.S., Hung, L.W., Donnelly, P.S., Mot, A.I., Parker, S.J., Masters, C. L. The Alzheimer's therapeutic PBT2 promotes amyloid- $\beta$  degradation and GSK3 phosphorylation via a metal chaperone activity. *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 220–230.
189. Ritchie, C.W., Bush, A.I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., Carrington, D. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A $\beta$  amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1685–1691.
190. Zhang, H.Y., Tang, X. C. Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 619–625.
191. Ma, K., Thomason, L.A., McLaurin, J. scyllo-Inositol, preclinical, and clinical data for Alzheimer's disease. *Adv. Pharmacol.* **2011**, *64*, 177–212.
192. Salloway, S., Sperling, R., Keren, R., Porsteinsson, A.P., Van Dyck, C.H., Tariot, P.N., Crans, G. A phase 2 randomized trial of ELND005 , scyllo-inositol , in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **2011**, *77*, 1253–1262.
193. EU Clinical Trials Register. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>, **12/2015**
194. Crowe, A., James, M.J., Lee, V.M.Y., Smith, A.B., Trojanowski, J.Q., Ballatore, C., Brunden, K. R. Aminothienopyridazines and methylene blue affect Tau fibrillization via cysteine oxidation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 11024–11037.
195. Gura, T. Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 894.
196. Sigurdsson, E. M. Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *J. Alzheimer's Dis.* **2008**, *15*, 157–168.

197. Zhang, B., Carroll, J., Trojanowski, J.Q., Yao, Y., Iba, M., Potuzak, J.S., Lee, V. M. Y. The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 3601–3611.
198. Green, K.N., Steffan, J.S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S.S., Thompson, L.M., LaFerla, F. M. Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 11500–11510.
199. Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Kang, D. E. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A $\beta$ 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **2001**, *414*, 212–216.
200. Camacho, I. E.; Serneels, L.; Spittaels, K.; Merchiers, P.; Dominguez, D.; De Strooper, B. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10908–10917.
201. Butchart, J., Brook, L., Hopkins, V., Teeling, J., Püntener, U., Culliford, D., Thomas, R. Etanercept in Alzheimer disease A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Neurology* **2015**, *84*, 2161–2168.
202. Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Saito, K., Seshima, M., Itoh, A., Nabeshima, T. Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice. *Behav. Brain Res.* **2008**, *189*, 100–106.
203. Tabet, N., Feldman, H. Ibuprofen for Alzheimer's disease. *Cochrane Libr.Database of Systematic Reviews* **2003**.
204. Rafii, M.; Walsh, S.; Little, J.; Behan, K.; Reynolds, B.; Ward, C.; Jin, S.; Thomas, R.; Aisen, P. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **2011**, *76*, 1389–1394.
205. Prickaerts, J.; Van Goethem, N. P.; Chesworth, R.; Shapiro, G.; Boess, F. G.; Methfessel, C.; Reneerkens, O. A. H.; Flood, D. G.; Hilt, D.; Gawryl, M.; Bertrand, S.; Bertrand, D.; König, G. EVP-6124, a novel and selective alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 1099–1110.
206. Lermontova, N. N.; Redkozubov, a E.; Shevtsova, E. F.; Serkova, T. P.; Kireeva, E. G.; Bachurin, S. O. Dimebon and tacrine inhibit neurotoxic action of beta-amyloid in culture and block L-type Ca(2+) channels. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2001**, *132*, 1079–1083.
207. Schechter, L.E., Smith, D.L., Rosenzweig-Lipson, S., Sukoff, S.J., Dawson, L.A., Marquis, K., Harder, J. A. Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 1274–1289.
208. Mihalak, K.B., Carroll, F.I., Luetje, C. W. Varenicline is a partial agonist at  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 and a full agonist at  $\alpha$ 7 neuronal nicotinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 801–805.
209. Kalkman, H.O., & Loetscher, E. alpha 2C-Adrenoceptor blockade by clozapine and other antipsychotic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *462*, 33–40.
210. Upton, N.; Chuang, T. T.; Hunter, A. J.; Virley, D. J. 5-HT 6 Receptor Antagonists as Novel Cognitive Enhancing Agents for Alzheimer ' s Disease. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 458–469.
211. Sjögren, M., Gustafsson, K., Syversen, S., Olsson, A., Edman, Å., Davidsson, P., Blennow, K. Treatment with simvastatin in patients with Alzheimer's disease lowers both  $\alpha$ - and  $\beta$ -cleaved amyloid precursor protein. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2003**, *16*, 25–30.
212. Sankowski, R. Effekte des MAP Kinase Inhibitors CNI-1493 auf Amyloid beta behandelte primäre mikrogliäre und neuronale Zellen, Philipps-Universität Marburg, **2012**.
213. Grundman, M., Capparelli, E., Kim, H.T., Morris, J.C., Farlow, M., Rubin, E.H., Schafer, K. A multicenter, randomized, placebo controlled, multiple-dose, safety and pharmacokinetic study of AIT-082 (Neotrofin<sup>TM</sup>) in mild Alzheimer's disease patients. *Life Sci.* **2003**, *73*, 539–553.
214. Rockenstein, E., Torrance, M., Mante, M., Adame, A., Paulino, A., Rose, J.B., Masliah, E. Cerebrolysin decreases amyloid- $\beta$  production by regulating amyloid protein precursor maturation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **2006**, *83*, 1252–1261.

215. Zandi, P.P., Anthony, J.C., Khachaturian, A.S., Stone, S.V., Gustafson, D., Tschanz, J.T., Breitner, J. C. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch. Neurol.* **2004**, *61*, 82–88.
216. Henderson, S.T., Vogel, J.L., Barr, L.J., Garvin, F., Jones, J.J., Costantini, L. C. Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2009**, *6*, 1.
217. Mousavi, M., Hellström-Lindahl, E. Nicotinic receptor agonists and antagonists increase sAPP $\alpha$  secretion and decrease A $\beta$  levels in vitro. *Neurochem. Int.* **2009**, *54*, 237–244.
218. Lowe, D., De Vivo, M., Tripodi, C., Kornecook, T., Kogan, J., Tombaugh, G., Ong, V. MEM 1003, A novel L-type CA $^{2+}$  channel modulator, as a potential therapeutic for Alzheimer's disease. In *International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders*; **2006**, Madrid, Spanien, Abstract P4–437.
219. Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J. T., Puigserver, P. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* **2007**, *26*, 3169–3179.
220. Athar, M.; Back, J. H.; Tang, X.; Kim, K. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 274–283.
221. Nguyen, P.T.H., Kimura, T., Ho, S A., Tran, A.H., Ono, T., Nishijo, H. Ameliorative effects of a neuroprotective agent, T-817MA, on place learning deficits induced by continuous infusion of amyloid- $\beta$  peptide (1–40) in rats. *Hippocampus* **2007**, *17*, 443–455.
222. Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Cole, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892–5901.
223. Frautschy, S.A., Cole, G. M. Why pleiotropic interventions are needed for Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 392–409.
224. Messer, M. Enzymatic cyclization of L-glutamine and L-glutamyl peptides. *Nature* **1963**, *197*, 1299.
225. Messer, M.; Ottesen, M. Isolation and properties of glutamine cyclotransferase of dried papaya latex. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Specialized Sect. Enzymol. Subj.* **1964**, *92*, 409–411.
226. Busby, W. H.; Quackenbush, G. E.; Humm, J.; Youngblood, W. W.; Kizers, J. S. An Enzyme (s) That Converts Glutamyl-peptides into. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8532–8536.
227. Fischer, W. H.; Spiess, J. Identification of a mammalian glutamyl cyclase converting glutamyl into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 3628–3632.
228. Schilling, S. Charakterisierung der humanen Glutamyl-Cyclase im Vergleich mit dem analogen Enzym aus *Carica papaya*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2004**.
229. Wintjens, R.; Belrhali, H.; Clantin, B.; Azarkan, M.; Bompard, C.; Baeyens-Volant, D.; Looze, Y.; Villeret, V. Crystal structure of papaya glutamyl cyclase, an archetype for plant and bacterial glutamyl cyclases. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 457–470.
230. Röser, C. Arbeiten zur Charakterisierung der Glutamylcyclasen aus *Phytophthora infestans*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2008**.
231. Pohl, T.; Zimmer, M.; Mugele, K.; Spiess, J. Primary structure and functional expression of a glutamyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 10059–10063.
232. Song, I.; Chuang, C. Z.; Bateman, R. C. Molecular cloning, sequence analysis and expression of human pituitary glutamyl cyclase. *J. Mol. Endocrinol.* **1994**, *13*, 77–86.
233. Schilling, S., Manhart, S., Hoffmann, T., Ludwig, H.H., Wasternack, C., Demuth, H. U. Substrate specificity of glutamyl cyclases from plants and animals. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1583–1592.
234. Huang, K.-F.; Liu, Y.-L.; Cheng, W.-J.; Ko, T.-P.; Wang, A. H.-J. Crystal structures of human glutamyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 13117–13122.
235. Stelter, M. Klonierung, Expression und Charakterisierung bakterieller Glutamylcyclasen. Hochschule Anhalt-Köthen, **2008**.
236. Booth, R. E.; Lovell, S. C.; Misquitta, S. A.; Bateman, J. R. C. Human glutamyl cyclase and bacterial zinc aminopeptidase share a common fold and active site. *BMC Biol.* **2004**, *2*, 2–10.

237. Zerhouni, S.; Amrani, A.; Nijs, M.; Smolders, N.; Azarkan, M.; Vincentelli, J.; Looze, Y. Purification and characterization of papaya glutamine cyclotransferase, a plant enzyme highly resistant to chemical, acid and thermal denaturation. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1387*, 275–290.
238. Buchholz, M.; Heiser, U.; Schilling, S.; Niestroj, A. J.; Zunkel, K.; Demuth, H.-U. The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 664–677.
239. Gololobov, M.Y., Song, I.S., Wang, W.Y., Bateman, R. C. Steady-state kinetics of glutamine cyclotransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *309*, 300–307.
240. Van Coillie, E.; Proost, P.; Van Aelst, I.; Struyf, S.; Polfliet, M.; De Meester, I.; Harvey, D. J.; Van Damme, J.; Opdenakker, G. Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12672–12680.
241. Abraham, G. N.; Podell, D. N. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Depts. of Medicine and Microbiology, and the Center for Interdisciplinary Research in Immunologic Diseases of the University of Roches. Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *38*, 181–190.
242. Awade, A.C., Cleuziat, P., Gonzales, T.H., Robert Baudouy, J. Pyroglutamate carboxyl peptidase (Pcp): An enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1994**, *20*, 34–51.
243. Ezura, Y.; Kajita, M.; Ishida, R.; Yoshida, S.; Yoshida, H.; Suzuki, T.; Hosoi, T.; Inoue, S.; Shiraki, M.; Orimo, H.; Emi, M. Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminyl cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. *J. Bone Miner. Res.* **2004**, *19*, 1296–1301.
244. Batiwalla, F. M.; Baechler, E. C.; Xiao, X.; Li, W.; Balasubramanian, S.; Khalili, H.; Damle, A.; Ortmann, W. a; Perrone, A.; Kantor, a B.; Gulko, P. S.; Kern, M.; Furie, R.; Behrens, T. W.; Gregersen, P. K. Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* **2005**, *6*, 388–397.
245. Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M., Shimada, H., Ihara, Y., Kawashima, S. Dominant and differential deposition of distinct  $\beta$ -amyloid peptide species, A $\beta$  N3 (pE), in senile plaques. *Neuron* **1995**, *14*, 457–466.
246. Schilling, S.; Lauber, T.; Schaupp, M.; Manhart, S.; Scheel, E.; Böhm, G.; Demuth, H. U. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* **2006**, *45*, 12393–12399.
247. D'Arrigo, C.; Tabaton, M.; Perico, A. N-terminal truncated pyroglutamylyl  $\beta$  amyloid peptide A $\beta$ py3-42 shows a faster aggregation kinetics than the full-length A $\beta$ 1-42. *Biopolymers* **2009**, *91*, 861–873.
248. Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Demuth, H. U. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7072–7078.
249. He, W., Barrow, C. J. The A $\beta$  3-pyroglutamylyl and 11-pyroglutamylyl peptides found in senile plaque have greater  $\beta$ -sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A $\beta$ . *Biochemistry* **1999**, *38*, 10871–10877.
250. Pike, C.J., Overman, M.J., Cotman, C. W. Amino-terminal deletions enhance aggregation of  $\beta$ -amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23895–23898.
251. Saido, T. C. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of  $\beta$ -amyloid. *Neurobiol. Aging* **1998**, *19*, 69–75.
252. Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Cattaneo, A.  $\beta$ -Amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34186–34192.
253. Schilling, S.; Appl, T.; Hoffmann, T.; Cynis, H.; Schulz, K.; Jagla, W.; Friedrich, D.; Wermann, M.; Buchholz, M.; Heiser, U.; von Hörsten, S.; Demuth, H.-U. Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-A $\beta$  formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 1225–1236.
254. Demuth, H.-U.; Schilling, S.; Roßner, S.; Morawski, M.; Hartlage-Rübsamen, M.; Lues, I.; Glund, K. Toxic pGlu-A $\beta$  Is Enhanced and Glutaminyl Cyclase (Qc) Up-Regulated Early in Alzheimer's Disease (Ad): Inhibitors of Qc Blocking pGlu-A $\beta$  Formation Are in Clinical Development. *Alzheimer's Dement.* **2014**, *10*, 149.

255. Demuth, H.-U.; Cynis, H.; Alexandru, A.; Jagla, W.; Graubner, S.; Schilling, S. Inhibition of Glutaminyl Cyclase: Pharmacology and steps towards clinical development. *Alzheimer's Dement.* **2010**, *6*, S571–S572.
256. Demuth, H.U., Schilling, S., Kleinschmidt, M., Rahfeld, J. U., Kehlen, A., Haegele, M. Glutaminyl cyclase as a diagnostic/prognostic indicator for neurodegenerative diseases. **2010**.
257. Höfling, C.; Indrischek, H.; Höpcke, T.; Waniek, A.; Cynis, H.; Koch, B.; Schilling, S.; Morawski, M.; Demuth, H.-U.; Roßner, S.; Hartlage-Rübsamen, M. Mouse strain and brain region-specific expression of the glutaminyl cyclases QC and isoQC. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2014**, *36*, 64–73.
258. Demuth, H.-U.; Hoffmann, T.; Niestroj, A. J.; Schilling, S.; Heiser, U. Medical use of inhibitors of glutaminyl and glutamate cyclases. *WO2004098625 A2*, **2004**.
259. Buchholz, M.; Demuth, H.-U.; Heiser, U.; Niestroj, A. J.; Schilling, S. Inhibitors of glutaminyl cyclase and their use in the treatment of neurological diseases. *WO2004098591 A2*, **2004**.
260. Schilling, S.; Hoffmann, T.; Niestroj, A. J.; Demuth, H.-U.; Heiser, U. Use of effectors of glutaminyl and glutamate cyclases. *WO2005039548 A2*, **2005**.
261. Schilling, S.; Buchholz, M.; Andre Johannes Niestroj, H.-U. D.; Heiser, U. Novel inhibitors of glutaminyl cyclase. *WO2005075436 A2*, **2005**.
262. Michael Thormann, Michael Almstetter, Andreas Tremml, Ulrich Heiser, Mirko Buchholz, A. J. N. 3-hydroxy-1,5-dihydro-pyrrol-2-one derivatives as inhibitors of glutaminyl cyclase for the treatment of ulcer, cancer and other diseases. *WO2008055945 A1*, **2008**.
263. Thormann, M.; Almstetter, M.; Tremml, A.; Heiser, U.; Buchholz, M. Novel inhibitors of glutaminyl cyclase. *WO2008055947 A1*, **2008**.
264. Thormann, M.; Almstetter, M.; Tremml, A.; Heiser, U.; Buchholz, M. Novel inhibitors of glutaminyl cyclase. *WO2008055950 A1*, **2008**.
265. Buchholz, M.; Niestroj, A. J.; Heiser, U.; Ramsbeck, D.; Schilling, S. Novel inhibitors of glutaminyl cyclase. *WO2008065141 A1*, **2008**.
266. Heiser, U.; Buchholz, M.; Sommer, R.; Demuth, H. U. Novel inhibitors. *WO2014140279 A1*, **2014**.
267. Heiser, U.; Sommer, R.; Gaertner, U. T.; Hamann, A.; Almstetter, M.; Thormann, M.; Hoffman, T. Inhibitors of glutaminyl cyclase. *US8962860 B2*, **2015**.
268. Heiser, U.; Gaertner, U.-T.; Demuth, H.-U. Heterocyclic inhibitors of glutaminyl cyclase. *US7897633 B2*, **2011**.
269. Buchholz, M.; Heiser, U.; Hamann, A. Inhibitors of Glutaminyl Cyclase. *US8772508 B2*, **2014**.
270. Schilling, S.; Niestroj, A.; Heiser, U. Inhibitors of glutaminyl cyclase. *US7371871 B2*, **2008**.
271. Hoffmann, T., Schilling, S., Niestroj, A., Demuth, H. U., Heiser, U., & Buchholz, M. Use of effectors of glutaminyl and glutamate cyclases. *US 20070191366 A1*, **2007**
272. Buchholz, M.; Niestroj, A. J.; Heiser, U. Urea derivatives as glutaminyl cyclase inhibitors. *EP2146968 B1*, **2010**.
273. Buchholz, M.; Hamann, A.; Aust, S.; Brandt, W.; Böhme, L.; Hoffmann, T.; Schilling, S.; Demuth, H.-U.; Heiser, U. Inhibitors for human glutaminyl cyclase by structure based design and bioisosteric replacement. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7069–80.
274. Lues, I., Weber, F., Meyer, A., Bühring, U., Hoffmann, T., Kühn-Wache, K., Glund, K. A phase 1 study to evaluate the safety and pharmacokinetics of PQ912, a glutaminyl cyclase inhibitor, in healthy subjects. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2015**, *1*, 182–195.
275. Schilling, S.; Hoffmann, T.; Wermann, M.; Heiser, U.; Wasternack, C.; Demuth, H.-U. Continuous spectrometric assays for glutaminyl cyclase activity. *Anal. Biochem.* **2002**, *303*, 49–56.
276. Fujiwara, K., Tsuru, D. New chromogenic and fluorogenic substrates for pyrrolidonyl peptidase. *J. Biochem.* **1978**, *83*, 1145–1149.
277. Wittwer, M. Untersuchung ausgewählter Mikroalgenextrakte auf human und bakteriell Glutaminylzyklasen inhibierenden Substanzen. Hochschule Anhalt-Köthen, **2010**.
278. Wang, Y.; Wang, X.; Cheng, Y. A computational approach to botanical drug design by modeling quantitative composition-activity relationship. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *68*, 166–172.
279. Dumarey, M.; van Nederkassel, a M.; Deconinck, E.; Vander Heyden, Y. Exploration of linear multivariate calibration techniques to predict the total antioxidant capacity of green tea from chromatographic fingerprints. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1192*, 81–88.

280. Hoai, N. N.; Dejaegher, B.; Tistaert, C.; Nguyen Thi Hong, V.; Rivière, C.; Chataigné, G.; Phan Van, K.; Chau Van, M.; Quetin-Leclercq, J.; Vander Heyden, Y. Development of HPLC fingerprints for *Mallotus* species extracts and evaluation of the peaks responsible for their antioxidant activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 753–763.
281. Rajalahti, T.; Kvalheim, O. M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 280–290.
282. Heilmann, J. Wirkstoffe auf Basis biologisch aktiver. *Chemie unserer Zeit* **2007**, *41*, 376–389.
283. Michels, K. Entwicklung einer LC-MS basierten Methode zur Identifizierung von aktivitätsrelevanten Metaboliten in komplexen Mischungen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2011**.
284. Heinke, R. Mass spectrometry, biological screening and informatics of prenylated natural products, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2015**.
285. Reaxys Datenbank ehem. Beilstein Crossfire. <https://www.reaxys.com>.
286. SciFinder. <https://scifinder.cas.org>.
287. Dictionary of Natural Products - Chemical Database.
288. Chillier, X. F. D.; Berkel, G. J. Van; Gülacar, F. O.; Buchs, A. Characterization of Chlorins within a Natural Chlorin Mixture Using Electrospray / Ion Trap Mass Spectrometry. *Org. Mass Spektrom.* **1994**, *29*, 672–678.
289. Huang, X., Li, M., Xu, B., Zhu, X., Deng, Z., Lin, W. Proteasome and NF- $\kappa$ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. *Molecules* **2007**, *12*, 582–592.
290. Wang, S. Y.; Tseng, C. P.; Tsai, K. C.; Lin, C. F.; Wen, C. Y.; Tsay, H. S.; Sakamoto, N.; Tseng, C. H.; Cheng, J. C. Bioactivity-guided screening identifies pheophytin a as a potent anti-hepatitis C virus compound from *Lonicera hypoglauca* Miq. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *385*, 230–235.
291. Amorim, K., Lage-Yusty, M.A., López-Hernández, J. Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing. *CyTA-Journal Food* **2012**, *10*, 321–324.
292. Islam, M.N., Ishita, I. J., Jin, S. E., Choi, R.J., Lee, C.M., Kim, Y.S., Choi, J. S. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 541–548.
293. Zianni, R.; Bianco, G.; Lelario, F.; Losito, I.; Palmisano, F.; Cataldi, T. R. I. Fatty acid neutral losses observed in tandem mass spectrometry with collision-induced dissociation allows regiochemical assignment of sulfoquinovosyl-diacylglycerols. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 205–215.
294. Benson, A. A.; Daniel, H.; Wiser, R. A Sulfolipid in Plants. *Biochemistry* **1959**, *45*, 1582–1587.
295. Miyano, M.; Benson, A. A. The Plant Sulfolipid. VI. Configuration of the Glycerol Moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 57–59.
296. Lepage, M.; Daniel, H.; Benson, A. A. The Plant Sulfolipid. - Isolation and Properties of Sulfoglycosyl Glycerol. *J Am Chem* **1961**, *3735*, 1958–1960.
297. Matsumoto, Y.; Sahara, H.; Fujita, T.; Shimoza, K.; Takenouchi, M.; Torigoe, T.; Hanashami, S.; Yamazaki, T.; Takahashi, H.; Sugawara, F.; Mizushina, Y.; Ohta, K.; Takahashi, N.; Gasa, S.; Jimbow, K.; Sakaguchi, K.; Sato, N. An immunosuppressive effect by synthetic sulfolipids deduced from sulfoquinovosyldiacylglycerols of sea urchin. *Transplantation* **2002**, *74*, 261–267.
298. Naumann, I. Sulfoquinovosyldiacylglyceride - antiviral aktive Substanzen, Universität Erlangen-Nürnberg, **2009**.
299. Naumann, I.; Klein, B.; Bartel, C.; Darsow, S. J.; Buchholz, R.; Lange, H. A. Identification of sulfoquinovosyldiacylglycerides from *Phaeodactylum tricornutum* by matrix-assisted laser desorption/ionization QTrap time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Rapid Commun. mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2517–2523.
300. Naumann, I.; Darsow, K. H.; Walter, C.; Lange, H. A.; Buchholz, R. Identification of sulfoglycolipids from the alga *Porphyridium purpureum* by matrix-assisted laser desorption / ionisation quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3185–3192.

301. Keusgen, M.; Curtis, J. M.; Ayer, S. W. The use of nicotines and sulfoquinovosyl monoacylglycerols in the analysis of monounsaturated n-3 fatty acids by mass spectrometry. *Lipids* **1996**, *31*, 231–238.
302. Eichenberger, W., Gribi, C. Lipids of *Pavlova lutheri*: cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry*, **1997**, *45*, 1561–1567.
303. Ohta, K., Mizushina, Y.; Hirata, N.; Takemura, M.; Sugawara, F.; Matsukage, A.; Sakaguchi, K. Sulfoquinovosyldiacylglycerol, KM043, a new potent inhibitor of eukaryotic DNA polymerases and HIV-reverse transcriptase type 1 from a marine red alga, *Gigartina tenella*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1998**, *46*, 684–686.
304. Wang, H.; Li, Y.-L.; Shen, W.-Z.; Rui, W.; Ma, X.-J.; Cen, Y.-Z. Antiviral activity of a sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) compound isolated from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Bot. Mar.* **2007**, *50*, 185–190.
305. Gustafson, K. R.; John, H.; Li, C.; Fuller, R. W.; Weislow, O. S.; Rebecca, F.; Snader, K. M.; Patterson, G. M. L.; Boyd, M. R. AIDS-Antiviral Sulfolipids From Cyanobacteria (Blue- Green Algae). *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 1254–1258.
306. Reshef, V.; Mizrachi, E.; Marezki, T.; Silberstein, C.; Loya, S.; Hizi, A.; Carmeli, S. New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1251–1260.
307. Gage, D. A.; Huang, Z. H.; Benning, C. Comparison of sulfoquinovosyl diacylglycerol from spinach and the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Lipids* **1992**, *27*, 632–636.
308. Heinz, E.; Schmidt, H.; Hoch, M.; Jung, K. H.; Binder, H.; Schmidt, R. R. Synthesis of different nucleoside 5'-diphospho-sulfoquinovoses and their use for studies on sulfolipid biosynthesis in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 445–453.
309. Seifert, U.; Heinz, E. Enzymatic characteristics of UDP-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase from chloroplast envelopes. *Bot. Acta* **1992**, *105*, 197–205.
310. Pugh, C. E.; Roy, a B.; Hawkes, T.; Harwood, J. L. A new pathway for the synthesis of the plant sulpholipid, sulphoquinovosyldiacylglycerol. *Biochem. J.* **1995**, *309*, 513–519.
311. Bandurski, R. The mechanism of "active sulfate" formation. *J. Am. Soc.* **1956**, *78*, 6408–6409.
312. Robbins, P.; Lipmann, F. The enzymatic sequence in the biosynthesis of active sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 6409–6410.
313. Mercer, E. I.; Thomas, G. Occurrence of ATP-adenylsulfate 3'-phosphotransferase in the chloroplasts of higher plants. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 2281–2285.
314. Webb, M. S.; Green, B. R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1991**, *1060*, 133–158.
315. Benning, C. Biosynthesis and Function of the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 53–75.
316. Gordon, D. M.; Danishefsky, S. J. Synthesis of a Cyanobacterial Sulfolipid : Confirmation of Its Structure , Stereochemistry , and Anti-HIV- 1 Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *51*, 659–663.
317. de Souza, L. M.; Sasaki, G. L.; Romanos, M. T. V.; Barreto-Bergter, E. Structural characterization and anti-HSV-1 and HSV-2 activity of glycolipids from the marine algae *Osmundaria obtusiloba* isolated from Southeastern Brazilian coast. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 918–931.
318. Chirasuwan, N.; Chaiklahan, R.; Kittakoop, P.; Chanasattru, W.; Ruengjitchachawalya, M.; Tanticharoen, M.; Bunnag, B. Anti HSV-1 activity of sulphoquinovosyl diacylglycerol isolated from *Spirulina platensis*. *ScienceAsia* **2009**, *35*, 137–141.
319. Plouguerné, E.; de Souza, L. M.; Sasaki, G. L.; Cavalcanti, J. F.; Villela Romanos, M. T.; da Gama, B. a P.; Pereira, R. C.; Barreto-Bergter, E. Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4628–4640.
320. Mizushina, Y.; Watanabe, I.; Ohta, K.; Takemura, M.; Sahara, H.; Takahashi, N.; Gasa, S.; Sugawara, F.; Matsukage, A.; Yoshida, S.; Sakaguchi, K. Studies on Inhibitors of Mammalian DNA Polymerase alpha and beta. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 537–541.
321. Hanashima, S., Mizushina, Y., Ohta, K., Yamazaki, T., Sugawara, F., Sakaguchi, K. Structure-Activity Relationship of a Novel Group of Mammalian DNA Polymerase Inhibitors, Synthetic Sulfoquinovosylacylglycerols. *Japanese J. cancer Res.* **2000**, *91*, 1073–1083.

322. Hanashima, S.; Mizushina, Y.; Yamazaki, T.; Ohta, K.; Takahashi, S.; Sahara, H.; Sakaguchi, K.; Sugawara, F. Synthesis of sulfoquinovosylacylglycerols, inhibitors of eukaryotic DNA polymerase alpha and beta. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 367–376.
323. Matsumoto, K.; Sakai, H.; Takeuchi, R.; Tsuchiya, K.; Ohta, K.; Sugawara, F.; Abe, M.; Sakaguchi, K. Effective form of sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) vesicles for DNA polymerase inhibition. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2005**, *46*, 175–181.
324. Naohiko, H. Caspase inhibitor. *JP2002338474*, **2002**.
325. Makhlof Brahmī, M.; Portmann, C.; D'Ambrosio, D.; Woods, T. M.; Banfi, D.; Reichenbach, P.; Da Silva, L.; Baudat, E.; Turcatti, G.; Lingner, J.; Gademann, K. Telomerase Inhibitors from Cyanobacteria: Isolation and Synthesis of Sulfoquinovosyl Diacylglycerols from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Chemistry* **2013**, *19*, 4596–4601.
326. Banskota, A. H.; Stefanova, R.; Sperker, S.; Lall, S. P.; Craigie, J. S.; Hafting, J. T.; Critchley, A. T. Polar lipids from the marine macroalga *Palmaria palmata* inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *Phytochemistry* **2014**, *101*, 101–108.
327. Bergé, J. P.; Debiton, E.; Dumay, J.; Durand, P.; Barthomeuf, C. In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6227–6232.
328. Bruno, A.; Rossi, C.; Marcolongo, G.; Di Lena, A.; Venzo, A.; Berrie, C. P.; Corda, D. Selective in vivo anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *524*, 159–168.
329. Chatterjee, R.; Singh, O.; Pachua, L.; Malik, S. P.; Paul, M.; Bhadra, K.; Paul, S.; Kumar, G. S.; Mondal, N. B.; Banerjee, S. Identification of a sulfonovosyldiacylglyceride from *Azadirachta indica* and studies on its cytotoxic activity and DNA binding properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6699–6702.
330. Murakami, C.; Yamazaki, T.; Hanashima, S.; Takahashi, S.; Ohta, K.; Yoshida, H.; Sugawara, F.; Sakaguchi, K.; Mizushina, Y. Structure-function relationship of synthetic sulfoquinovosylacylglycerols as mammalian DNA polymerase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *403*, 229–236.
331. Gilleron, M.; Stenger, S.; Mazorra, Z.; Wittke, F.; Mariotti, S.; Böhmer, G.; Prandi, J.; Mori, L.; Puzo, G.; De Libero, G. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 649–659.
332. Arunkumar, K.; Selvapalam, N.; Rengasamy, R. The antibacterial compound sulphoglycerolipid 1-0 palmitoyl-3-0 (6'-sulpho- $\alpha$ -quinovopyranosyl)-glycerol from *Sargassum wightii* Greville (Phaeophyceae). *Bot. Mar.* **2005**, *48*, 441–445.
333. El Baz, F. K.; El Baroty, G. S.; Abd El Baky, H. H.; Abd El-Salam, O. I.; Ibrahim, E. a. Structural characterization and Biological Activity of Sulfolipids from selected Marine Algae. *Grasas y Aceites* **2013**, *64*, 561–571.
334. Cantillo-Ciau, Z.; Moo-Puc, R.; Quijano, L.; Freile-Pelegrín, Y. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1292–1304.
335. Vasänge, M.; Rolfsen, W.; Bohlin, L. Sulpholipid composition and methods for treating skin disorders. *US6124266 A*, **2000**.
336. Shigeru, T. C.; Neisuke, K.; Marina, N.; Mikiro, T.; Naohiko, H.; Yoshikazu, I. Neurocyte activation agent and its use. *JP2001322935 (A)*, **2001**.
337. Schilling, S.; Buchholz, M.; Niestroj, A. J.; Heiser, U.; Demuth, H. U. Inhibitors of glutaminy cyclase. *US7304086 B2*, **2007**.
338. Witt, S. Die Rolle der DGDG Synthase DGD1 bei der Galaktolipid Synthese in den Hüllmembranen von Chloroplasten. Universität Potsdam, **2009**.
339. Buschmann, C., Grumbach, K. *Physiologie der Photosynthese*; Springer-Verlag, **2013**.
340. Hölzl, G.; Dörmann, P. Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Prog. Lipid Res.* **2007**, *46*, 225–243.
341. Routaboul, J.M., Fischer, S. F. Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 1697–1705.
342. Glasl, H.; Pohl, P. Fettsäuren und Lipide in farblosen Algen. *Z. f. Naturforsch.* **1974**, *29*, 399–406.

343. Bigogno, C.; Khozin-Goldberg, I.; Boussiba, S.; Vonshak, A.; Cohen, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 497–503.
344. Martin, G.J., Hill, D.R., Olmstead, I. L., Bergamin, A., Shears, M.J., Dias, D.A., Callahan, D. L. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp.(Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp.(Eustigmatophyceae). *PLoS One* **2014**, *9*, e103389.
345. Gross, R.; Wilhelm, C. Lipids in Algae, Lichens and Mosses. In *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions*; Wada, H., & Murata, N., Ed.; Springer Science & Business Media, **2009**; 117–137.
346. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
347. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341.
348. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235–249.
349. Genz, S. Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Inhaltsstoffe aus Mikro- und Makroalgen. Hochschule Anhalt-Köthen, **2004**.
350. Krause-Hielscher, S. Untersuchungen zur Sekundärmetabolitbildung ausgewählter phototropher Organismen in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen, Hochschule Anhalt-Köthen. **2004**.
351. Michels, K. Isolierung und Charakterisierung von biologisch aktiven Metaboliten aus der Mikroalge *Eustigmatos magnus*. Hochschule Anhalt-Köthen, **2006**.
352. Denkert, A. Isolierung bioaktiver Substanzen aus der Bodenalge *Eustigmatos magnus*, Hochschule Anhalt-Köthen. **2008**.
353. Plaza, M.; Santoyo, S.; Jaime, L.; García-Blairsy Reina, G.; Herrero, M.; Señoráns, F. J.; Ibáñez, E. Screening for bioactive compounds from algae. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 450–455.
354. Mundt, S.; Kreitlow, S.; Nowotny, A.; Effmert, U. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2001**, *203*, 327–34.
355. Alassali, A.; Cybulska, I. Methods for Upstream Extraction and Chemical Characterization of Secondary Metabolites from Algae Biomass. *Adv. Tech. Biol. Med.* **2016**, *4*, 1–16.
356. Gross, E.; Wolk, C.; Jüttner, F. Fischerellin a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *J. Phycol.* **1991**, *27*, 686–692.
357. Greilinger, D. Charakterisierung bioaktiver Fischerelline in benthischen Cyanobakterien der Gattung *Fischerella*. Universität Konstanz, **2002**.
358. Jordon, P. Röntgenstrukturanalyse des trimeren Photosystems I aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus*. Freie Universität Berlin, **2001**.
359. Kothe, M. Design und Optimierung eines Photosystem-basierten elektrochemischen Systems für eine künftige Biowasserstoffproduktion. Ruhr-Universität Bochum, **2014**.
360. Barber, J.; Gounaris, K. What role does sulpholipid play within the thylakoid membrane? *Photosynth. Res.* **1986**, *9*, 239–249.
361. Leech, R. M.; Rumsby, M. G.; Thomson, W. W. Plastid differentiation, acyl lipid and fatty acid changes in developing green maize leaves. *Plant Physiol.* **1973**, *52*, 240–245.
362. Sinensky, M. Specific deficit in the synthesis of 6-sulfoquinovosyldiglyceride in *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Bacteriol.* **1977**, *129*, 516–524.
363. Essigmann, B. Sulfolipid in *Arabidopsis thaliana*: Biosynthese, Regulation und Funktion. Freien Universität Berlin, **1999**.
364. Minoda, A., Sonoike, K., Okada, K., Sato, N., Tsuzuki, M. Decrease efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *FEBS Lett.* **2003**, *553*, 109–112.
365. Zimmerman, M.; Yurewicz, E.; Patel, G. A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 258–262.

366. Kim, Y. H.; Yoo, J. S.; Kim, M. S. Structural characterization of sulfoquinovosyl, monogalactosyl and digalactosyl diacylglycerols by FAB-CID-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 968–977.
367. Kataoka, N.; Misaki, A. Glycolipids isolated from *Spirulina maxima*. Structure and fatty acid composition. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 2349–2355.
368. Syarina, P.N.A., Karthivashan, G., Abas, F., Arulsevan, P., Fakurazi, S. Wound healing potential of *Spirulina platensis* extracts on human dermal fibroblast cells. *EXCLI J.* **2015**, *14*, 385.
369. Van Mooy, B. a S.; Rocap, G.; Fredricks, H. F.; Evans, C. T.; Devol, A. H. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8607–8612.
370. Sato, N. Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution. *J. Plant Res.* **2004**, *117*, 495–505.
371. Xu, J.; Chen, D.; Yan, X.; Chen, J.; Zhou, C. Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *663*, 60–68.
372. Berge, J. Reassessment of lipid composition of the diatom, *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1017–1021.
373. He, H.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; Hsu, C. S. Algae polar lipids characterized by online liquid chromatography coupled with hybrid linear quadrupole ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy and Fuels* **2011**, *25*, 4770–4775.
374. El-Sheekh, M. M.; Rady, A. A. Effect of Phosphorus Starvation on Growth, Photo-synthesis and Some Metabolic Processes in the Uni-cellular Green Alga *Chlorella kessleri*. *Phyton (B. Aires)*. **1995**, *35*, 139–151.
375. Kind, T.; Meissen, J. K.; Yang, D.; Nocito, F.; Vaniya, A.; Cheng, Y.-S.; VanderGheynst, J. S.; Fiehn, O. Qualitative analysis of algal secretions with multiple mass spectrometric platforms. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1244*, 139–147.
376. Siddhanta, A.K., Mody, K.H., Ramavat, B.K., Chauhan, V.D., Sharma, M., Garg, H. S. Characterization of sulphonoglycolipid from the red alga *Laurencia pedicularioides*. *Bot. Mar.* **1995**, *38*, 329–332.
377. Sugimoto, K.; Midorikawa, T.; Tsuzuki, M.; Sato, N. Upregulation of PG synthesis on sulfur-starvation for PS I in *Chlamydomonas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 660–665.
378. Vieler, A.; Wilhelm, C.; Goss, R.; Süß, R.; Schiller, J. The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150*, 143–155.
379. Li-Beisson, Y.; Beisson, F.; Riekhof, W. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **2015**,
380. Thompson, G. a Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1302*, 17–45.
381. Li, H.; Yan, X.; Xu, J.; Zhou, C. Precise identification of photosynthetic glycerolipids in microalga *Tetraselmis chuii* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS. *Sci. China. C. Life Sci.* **2008**, *51*, 1101–1107.

## 8. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Strukturformeln des Depsipeptid Serinprotease-Inhibitor Molassamid (1) und der Verbindungen Eckol (2) und Dieckol (3) .....	8
<b>Abb. 2:</b> Strukturformel des linearen Depsipeptids Tasiamid (10) .....	10
<b>Abb. 3:</b> (a) amyloide Plaques außerhalb einer Nervenzelle [61]; (b) neurofibrilläre Faserbündel innerhalb einer Nervenzelle [62] .....	13
<b>Abb. 4:</b> Einteilung der Alzheimer-Krankheit .....	13
<b>Abb. 5:</b> Multifaktorielle Basis der AD Pathogenese [Quelle: [76] Seite 9] .....	15
<b>Abb. 6:</b> APP-Prozessierung [[96] Seite 2] .....	16
<b>Abb. 7:</b> Klassische und modifizierte Amyloid-Hypothese [[127] Seite 78] .....	18
<b>Abb. 8:</b> Zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung von AD .....	19
<b>Abb. 9:</b> Wirkmechanismus des AchE-Inhibitors Donepezil im synaptischen Spalt [132] .....	20
<b>Abb. 10:</b> Ribbondarstellung der humanen QC: [[234] Seite: 13118] .....	30
<b>Abb. 11:</b> Mechanismus der Zyklisierung [235] .....	31
<b>Abb. 12:</b> Auswahl bisher beschriebener QC-Inhibitoren: 15, 16 [238], 17 [273], 18 – QC-Inhibitor PQ912 [274] .....	32
<b>Abb. 13:</b> Enzymatischer QC-Assay [6,275]. .....	33
<b>Abb. 14:</b> Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (BTM) während der Kultivierung von (a) <i>S. producto-capitatus</i> , (b) <i>S. rubescens</i> , (c) <i>S. acuminatus</i> , (d) <i>S. pectinatus</i> , (e) <i>T. wisconsinensis</i> und (f) <i>E.magnus</i> .....	36
<b>Abb. 15:</b> Kultivierung der Mikroalge <i>S. acuminatus</i> im 100 L Photobioreaktor .....	37
<b>Abb. 16:</b> Extraktausbeuten nach Chlorophyll-Fällung (CF) und SA-Kartuschen (SA) pro 1 mL methanolischen Extrakt [KHS_001 / KHS_015] .....	38
<b>Abb. 17:</b> UV/VIS-Spektrum ( $\lambda = 200-600$ nm) des methanolischen Rohextraktes (a), des methanolischen Extraktes nach Chlorophyll-Fällung (b) und des methanolischen Extraktes nach Chlorophyll-Eliminierung mittels SA-Kartuschen (c) von <i>T. winconsinensis</i> eSP [KHS_115] .....	39
<b>Abb. 18:</b> Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Extrakte; als positiv definiert Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung mit einer Standardabweichung < 5% .....	41
<b>Abb. 19:</b> Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der methanolischen Extrakte in den Konzentrationen 10 mg/mL (blau) und 1 mg/mL (schwarz) ermittelt aus Dreifachbestimmungen mit einer Standardabweichung <5% .....	42
<b>Abb. 20:</b> Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Fraktionen; als positiv definiert Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung [KHS_018 und KHS_019] .	43
<b>Abb. 21:</b> links: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 1 [KHS_024_2]; rechts: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 2 [KHS_024_1] .....	45
<b>Abb. 22:</b> Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Fraktionen; als positiv definiert: Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung [KHS_039] .....	46
<b>Abb. 23:</b> Graphische Darstellung der QC-Inhibierungen der positiv getesteten Fraktionen; als positiv definiert Inhibierung > 20 %; ermittelt aus Dreifachbestimmung [KHS_051] .....	48
<b>Abb. 24:</b> Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifizierung QC-inhibierender Metaboliten mittels Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) .....	49
<b>Abb. 25:</b> PCA-Score Plots der mittels FTICR-MS analysierten Extrakte .....	51
<b>Abb. 26:</b> Grundannahme der Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) [283] .....	52
<b>Abb. 27:</b> AcorA-Plots des Peakclusters A1 .....	54
<b>Abb. 28:</b> AcorA-Plots des Peakclusters A2 .....	54
<b>Abb. 29:</b> AcorA-Plots des Peakclusters C1 .....	56
<b>Abb. 30:</b> AcorA-Plots des Peakclusters C3 .....	56
<b>Abb. 31:</b> AcorA-Plots des Peakclusters C2 .....	57

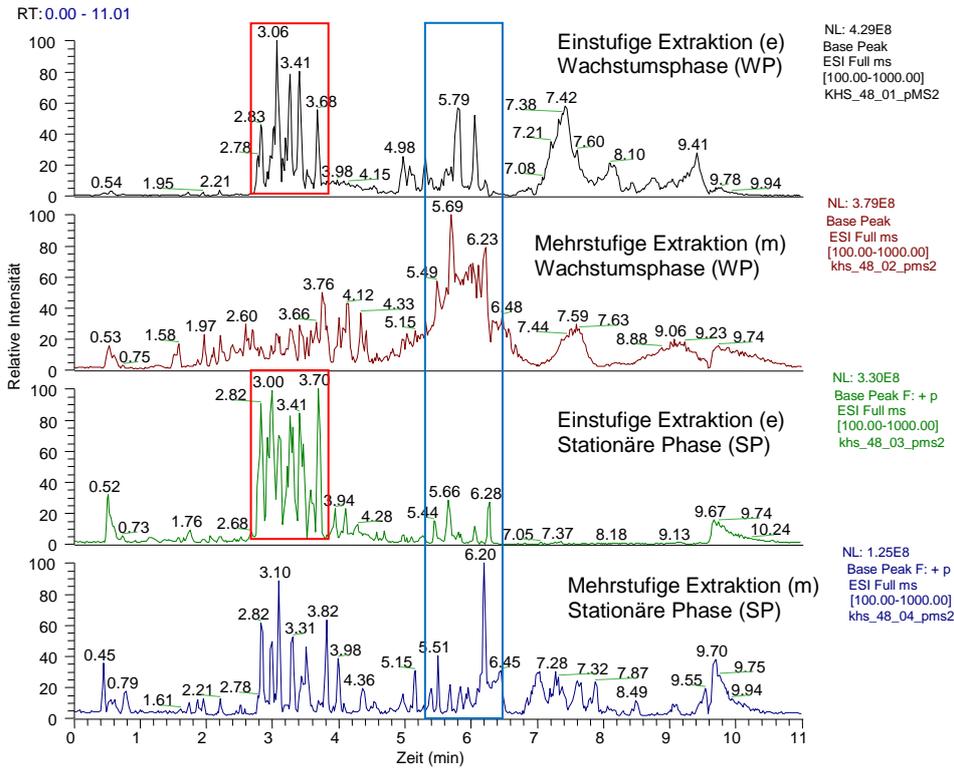
<b>Abb. 32:</b> AcorA-Plots des Peakclusters B1 .....	59
<b>Abb. 33:</b> AcorA-Plots des Peakclusters B3 .....	59
<b>Abb. 34:</b> Ausschnitt aus TIC (links) und der detektierten $m/z$ (rechts) im Retentionsbereich von 6,2 min bis 11,0 min des Extraktes von <i>Sc. acuminatus</i> eSP [KHS_048_1_1nMS2] .....	60
<b>Abb. 35:</b> AcorA-Plots des Peakclusters D1 .....	61
<b>Abb. 36:</b> AcorA-Plots des Peakclusters D2 .....	62
<b>Abb. 37:</b> AcorA-Plots des Peakclusters D4 .....	62
<b>Abb. 38:</b> MS <sup>2</sup> -Spektrum der Verbindung 21 des <i>S. producto-capitatus</i> eWP Extraktes (oben) und des Phaeophytin a Standard der Firma LGC-Standards (unten) vermessen mittels UPLC-ESI-MS <sup>n</sup> [KHS_118] .....	65
<b>Abb. 39:</b> Strukturvorschlag für Verbindung 21 .....	66
<b>Abb. 40:</b> Strukturvorschlag für Verbindung 20 [289] .....	67
<b>Abb. 41:</b> MS <sup>1</sup> -Spektrum des [M-H] <sup>-</sup> Ions mit $m/z$ 815 der Verbindung 22 unter (-)ESI-Bedingungen (1); MS <sup>2</sup> -Spektrum (2) unter Bildung der Fragmentionen [a] $m/z$ 559 und [b] $m/z$ 537 sowie MS <sup>3</sup> -Spektrum des Fragmentions [d] mit $m/z$ 225. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 45 % bei (-)ESI eingesetzt. [KHS_071_nMS3].....	68
<b>Abb. 42:</b> MS <sup>2</sup> -Spektrum des [M-H] <sup>-</sup> Ions mit $m/z$ 815 des SQDG-Standards unter Bildung der Fragmentionen [a] $m/z$ 559 und [b] $m/z$ 537unter (-)ESI-Bedingungen [KHS_78_1_SQDG Standard].....	69
<b>Abb. 43:</b> Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung 22 - 24 unter (-)ESI-Bedingungen. ....	70
<b>Abb. 44:</b> MS <sup>1</sup> -Spektrum des [M-H] <sup>-</sup> Ions mit $m/z$ 555 der Verbindung 25 unter (-)ESI-Bedingungen (1); MS <sup>2</sup> -Spektrum (2) unter Bildung der Fragmentionen [a] $m/z$ 299 und [b] $m/z$ 225 sowie des Fragmentions [c] mit $m/z$ 207 und [d] mit $m/z$ 165. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 45 % bei (-)ESI eingesetzt. [KHS_051_45].....	72
<b>Abb. 45:</b> MS <sup>1</sup> -Spektrum des [M-H] <sup>-</sup> Ions mit $m/z$ 317 der Verbindung 26 unter (-)ESI-Bedingungen (1); MS <sup>2</sup> -Spektrum (2) unter Bildung der Fragmentionen [b] $m/z$ 225; MS <sup>3</sup> -Spektrum (3) des Fragmentions [b] unter Bildung der Ionen [c] mit $m/z$ 207, [d] mit $m/z$ 165 und [e] mit $m/z$ 125; MS <sup>4</sup> -Spektrum (4) des Tochterions [d] unter Bildung des Fragmentions [f] mit $m/z$ 81. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 45 % bei (-)ESI eingesetzt. [KHS_048_10_317_neg_ce45 / KHS_048_10_317_n_ms4_165] .....	73
<b>Abb. 46:</b> Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung 25 und 26 unter (-)ESI-Bedingungen. ....	74
<b>Abb. 47:</b> Kristallstruktur der hQC: (a) Ribbondarstellung der hQC; (b) Topologiediagramm der hQC Struktur; (c) Stereoansicht der katalytischen Region der hQC A [234] .....	75
<b>Abb. 48:</b> Konformation mit dem Ringsystem in der aktiven Tasche der QC der Verbindung 21 (links) und der Verbindung 20 (rechts) .....	76
<b>Abb. 49:</b> Zink-koordinierende Konformation der Verbindung 22 (links), 23 (mitte) und 24 (rechts) in der aktiven Tasche der QC .....	77
<b>Abb. 50:</b> Beste bindende Konformation der Verbindung 25 in der aktiven Tasche der QC – keine Zn-Koordination (links) und eine Sulfoxy-Zn-koordinierte Konformation der Verbindung 25 (rechts) .....	77
<b>Abb. 51:</b> Beste bindende Konformation, Sulfoxy-Zn koordiniert, der Verbindung 26 in der aktiven Tasche der QC.....	78
<b>Abb. 52:</b> IC <sub>50</sub> Bestimmung des SQDG Standards .....	79
<b>Abb. 53:</b> Base-Peak Chromatogramme der <i>S. acuminatus</i> Extrakte im negativen Ionenmodus [KHS_48].....	80
<b>Abb. 54:</b> Base-Peak Chromatogramm und MS <sup>1</sup> Massenspektrum der Sulfolipid-Fraktion aus <i>S. acuminatus</i> eSP [KHS_74] .....	81
<b>Abb. 55:</b> ESI-API-MS Spektrum der Sulfolipid-Fraktion aus <i>S. acuminatus</i> eSP (links) im Vergleich zum SQDG Standard ESI-API-MS Spektrum (rechts) im negativen Ionenmodus [KHS_071_1_110719 / KHS_072_110719] .....	81
<b>Abb. 56:</b> Analytische DC (Kieselgel 60, DC1., der Fraktion (F) von <i>S. acuminatus</i> eSP und dem SQDG-Standard (S) [KHS_81] .....	82

<b>Abb. 57:</b> QC-Inhibierung der Sulfolipid-Fraktion aus <i>S. acuminatus</i> eSP und des SQDG Standards [KHS_73].	82
<b>Abb. 58:</b> Base-Peak-Chromatogramm des methanolischen <i>S. producto-capitatus</i> eWP Extraktes [KHS_48_1].	83
<b>Abb. 59:</b> MS <sup>1</sup> -Spektren des aus Base-Peak Chromatogramm (Abb. 58) detektierten Peaks bei t <sub>R</sub> : 2,81 min (links oben), bei t <sub>R</sub> : 2,98 min (links unten), bei t <sub>R</sub> : 3,42 min (rechts oben), bei t <sub>R</sub> : 3,68 min (rechts unten) unter (+)ESI-Bedingungen [KHS_48_01_pMS].	84
<b>Abb. 60:</b> MS <sup>1</sup> -Spektrum des [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> Ions mit <i>m/z</i> 666 der Verbindung 27 unter (+)ESI-Bedingungen (1); MS <sup>2</sup> -Spektrum (2) unter Bildung des [M+H] <sup>+</sup> Ions [a] <i>m/z</i> 649 sowie der Fragmentationen [b] <i>m/z</i> 487, [c] <i>m/z</i> 325, [d] <i>m/z</i> 307 und des Fragmentions [e] mit <i>m/z</i> 233. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (+)ESI eingesetzt [KHS_48_01_pMS1].	86
<b>Abb. 61:</b> Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung 27 unter (+)ESI-Bedingungen...	87
<b>Abb. 62:</b> MS <sup>1</sup> -Spektrum des [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> Ions mit <i>m/z</i> 504 der Verbindung 29 unter (+)ESI-Bedingungen (1); MS <sup>2</sup> -Spektrum (2) unter Bildung des [M+H] <sup>+</sup> Ions [a] <i>m/z</i> 487, sowie der Fragmentationen [b] <i>m/z</i> 325, [c] <i>m/z</i> 307 und [d] <i>m/z</i> 233. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (+)ESI eingesetzt [KHS_48_01_pMS1].	88
<b>Abb. 63:</b> Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung 29 unter (+)ESI-Bedingungen...	89
<b>Abb. 64:</b> MS <sup>1</sup> -Spektrum des [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> Ions mit <i>m/z</i> 532 der Verbindung 31 unter (+)ESI-Bedingungen (1); MS <sup>2</sup> -Spektrum (2) unter Bildung des [M+H] <sup>+</sup> Ions [a] <i>m/z</i> 515, sowie der Fragmentationen [b] <i>m/z</i> 353, [c] <i>m/z</i> 335, [d] <i>m/z</i> 261. Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (+)ESI eingesetzt [KHS_48_01_pMS1].	90
<b>Abb. 65:</b> Massenspektrometrische Fragmentierung der Verbindung 31 unter (+)ESI-Bedingungen...	91
<b>Abb. 66:</b> Strukturelle Merkmale eines QC-Inhibitors	93
<b>Abb. 67:</b> Vergleich der strukturellen Merkmale des QC-Inhibitors 1-(3-(1H-Imidazol-1-yl)propyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)thio-urea (15) mit den als QC-inhibierend indentifizierten Sulfolipiden (22-26).	94
<b>Abb. 68:</b> Schematische Darstellung der dreistufigen Extraktion	107
<b>Abb. 69:</b> Schematische Darstellung der einstufigen Extraktion	108
<b>Abb. 70:</b> Reaktionsprinzip des QC-Assays	109
<b>Abb. 71:</b> Base-Peak Chromatogramme der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte von <i>Scenedesmus producto-capitatus</i> im positiven Ionenmodus (rote Kästchen = Gemeinsamkeit, blaues Kästchen = Varrianz) [KHS_48_01_pMS2 / KHS_48_02_pms2 / KHS_48_03_pms2 / KHS_48_04_pms2].	139
<b>Abb. 72:</b> Base-Peak Chromatogramme der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte der einstufigen Extraktion der Biomassen der Wachstumsphase verschiedener Mikroalgen (Auswahl) im positiven Ionenmodus (rote Kästchen = Gemeinsamkeit) [KHS_48_09_pms2 / KHS_48_14_pms2 / KHS_48_18_pms2 / KHS_48_24_pms2].	140
<b>Abb. 73:</b> ESI-FTICR-MS Spektren der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte der Alge <i>S. rubescens</i> ( <i>S. rubescens</i> eWP (schwarz), <i>S. rubescens</i> mWP (blau), <i>S. rubescens</i> eSP (rot), <i>S. rubescens</i> mSP (grün)) im positiven Ionenmodus [[KHS_48_5_p_FT / KHS_48_6_p_FT / KHS_48_7_p_FT / KHS_48_8_p_FT].	140
<b>Abb. 74:</b> ESI-FTICR-MS Spektren der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte der Alge <i>S. rubescens</i> ( <i>S. rubescens</i> eWP (rot), <i>S. rubescens</i> mWP (blau), <i>S. rubescens</i> eSP (grün), <i>S. rubescens</i> mSP (schwarz)) im negativen Ionenmodus [KHS_48_5_neg_FT / KHS_48_6_neg_FT / KHS_48_7_neg_FT / KHS_48_8_neg_FT].	141

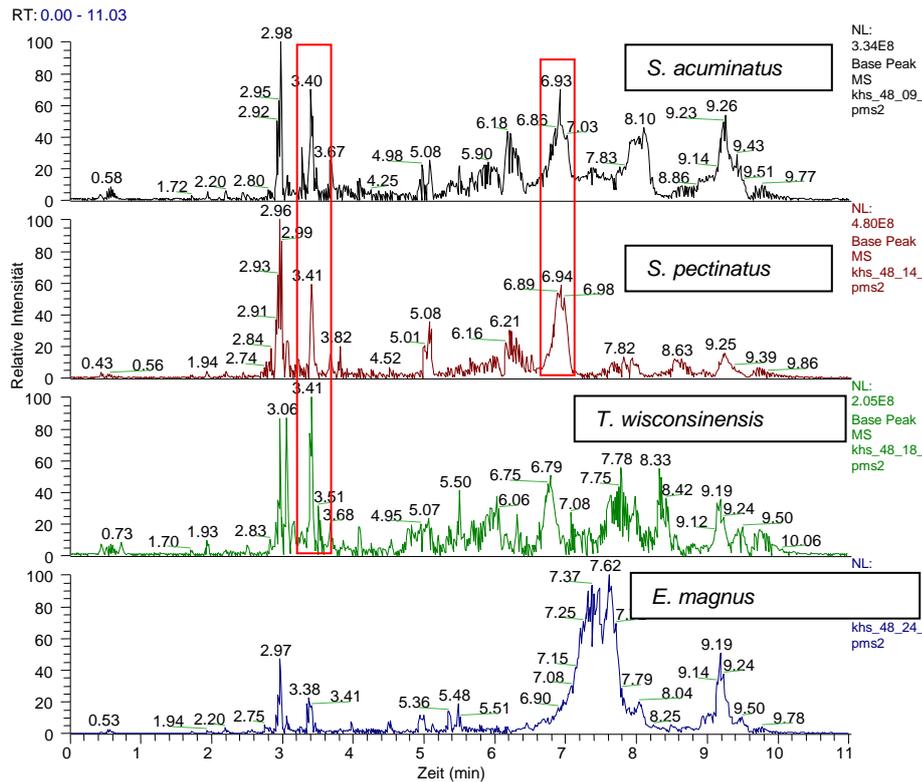
**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b>	Enzyminhibierende Verbindungen aus Algen .....	9
<b>Tab. 2:</b>	Acetylcholinesterase inhibierende Aktivitäten ausgewählter mariner Algen.....	10
<b>Tab. 3:</b>	Perspektivischen Behandlungsstrategien und Wirkstoffe [Quellen über die angegebenen hinaus [46,146,156,157]].....	22
<b>Tab. 4:</b>	Ermittelte spezifischen Wachstumsraten $\mu_{\max}$ .....	36
<b>Tab. 5:</b>	Ausschnitt aus der Hitliste (Anhang Tab. 18) nach AcorA der UPLC-ESI-MS Daten im pos. Ionenmodus [KHS_048_ACORA] .....	53
<b>Tab. 6:</b>	Ausschnitt aus der AcorA Hitliste (Tab. 19, Anhang) der ESI-FTICR-MS Daten im pos. Ionenmodus [KHS_048_ACORA] .....	55
<b>Tab. 7:</b>	Ausschnitt aus der Hitliste (Tab. 20, Anhang) nach AcorA der UPLC-ESI-MS Daten im neg. Ionenmodus [KHS_048_ACORA] .....	58
<b>Tab. 8:</b>	Ausschnitt aus der AcorA Hitliste (Tab. 21, Anhang) der ESI-FTICR-MS Daten im neg. Ionenmodus[KHS_048_ACORA] .....	61
<b>Tab. 9:</b>	Zusammenfassung der im positiven und negativen Ionenmodus korrelierenden Peakcluster . .....	63
<b>Tab. 10:</b>	(-) ESI-MS <sup>n</sup> Daten der Verbindungen 22 - 24 .....	70
<b>Tab. 11:</b>	Mögliche Position der Acylgruppen der Verbindungen 22-24 (angenommene Position gemäß Referenz-substanzen).....	71
<b>Tab. 12:</b>	(-) ESI-MS <sup>n</sup> Daten der Verbindungen 25 und 26 .....	74
<b>Tab. 13:</b>	Rule of five sowie TBSA-Wert bezogen auf den QC-Inhibitor (15) und die QC-inhibierenden Sulfolipide .....	95
<b>Tab. 14:</b>	Verwendete Mikroalgen .....	104
<b>Tab. 15:</b>	Zusammensetzung des Setlik-Mediums .....	104
<b>Tab. 16:</b>	Verwendete Enzyme im QC-Assay.....	109
<b>Tab. 17:</b>	Übersicht der Mikroalgen in denen Sulfolipide detektiert bzw. charakterisiert wurden.....	142
<b>Tab. 18:</b>	Verbindungen die in den Docking Studien untersucht wurden (durchgeführt von Dr. Susanne Aust, NWC, IPB Halle) .....	143
<b>Tab. 19:</b>	Hitliste AcorA / Korrelation der UPLC-ESI-MS Daten im <i>pos. Ionenmodus</i> (Ausschnitt) ....	144
<b>Tab. 20:</b>	Hitliste AcorA / Korrelation der ESI-FTICR-MS Daten im <i>pos. Ionenmodus</i> .....	146
<b>Tab. 21:</b>	Hitliste AcorA / Korrelation der UPLC-ESI-MS Daten im <i>neg. Ionenmodus</i> (Ausschnitt) ....	148
<b>Tab. 22:</b>	Hitliste AcorA / Korrelation der ESI-FTICR-MS Daten im <i>neg. Ionenmodus</i> .....	151

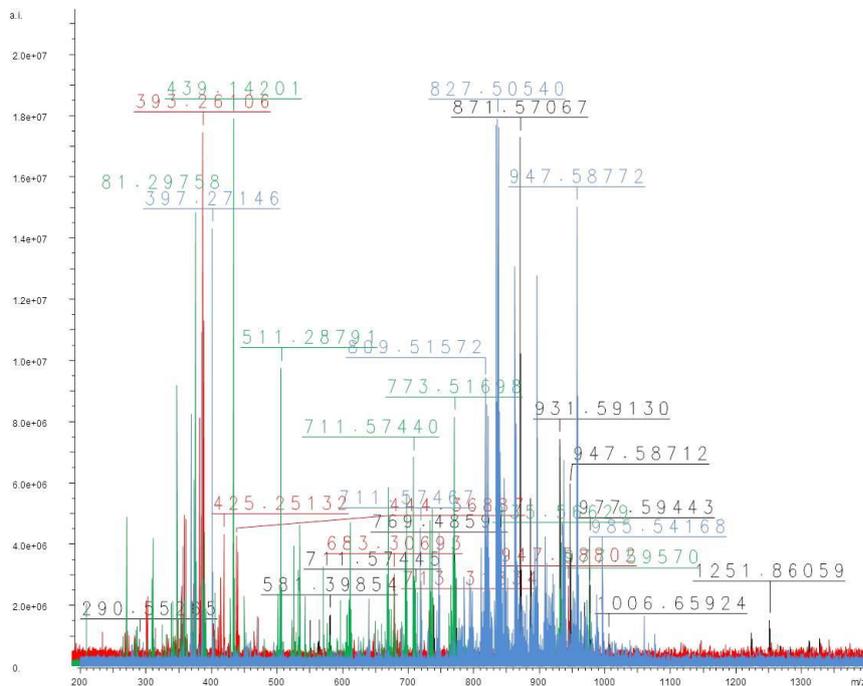
9. Anhang



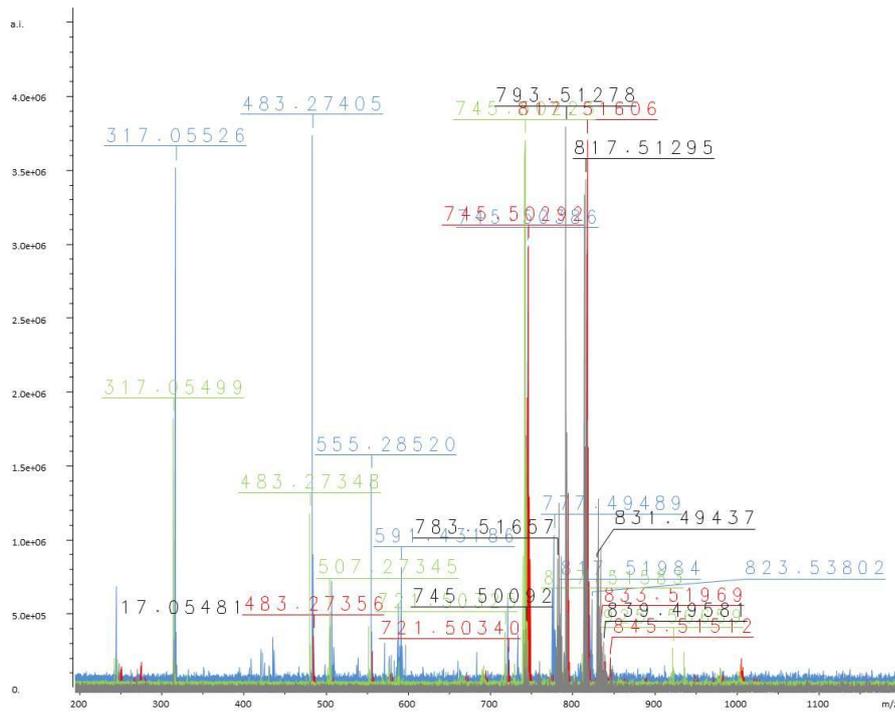
**Abb. 71:** Base-Peak Chromatogramme der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte von *S.producto-capitatus* im positiven Ionenmodus (rote Kästchen = Gemeinsamkeit, blaues Kästchen = Varianz) [KHS\_48\_01\_pMS2 / KHS\_48\_02\_pms2 / KHS\_48\_03\_pms2 / KHS\_48\_04\_pms2 ]



**Abb. 72:** Base-Peak Chromatogramme der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte der einstufigen Extraktion der Biomassen der Wachstumsphase verschiedener Mikroalgen (Auswahl) im positiven Ionenmodus (rote Kästchen = Gemeinsamkeit) [KHS\_48\_09\_pms2 / KHS\_48\_14\_pms2 / KHS\_48\_18\_pms2 / KHS\_48\_24\_pms2]



**Abb. 73:** ESI-FTICR-MS Spektren der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte der Alge *S. rubescens* (*S. rubescens* eWP (schwarz), *S. rubescens* mWP (blau), *S. rubescens* eSP (rot), *S. rubescens* mSP (grün)) im positiven Ionenmodus [[KHS\_48\_5\_p\_FT / KHS\_48\_6\_p\_FT / KHS\_48\_7\_p\_FT / KHS\_48\_8\_p\_FT]

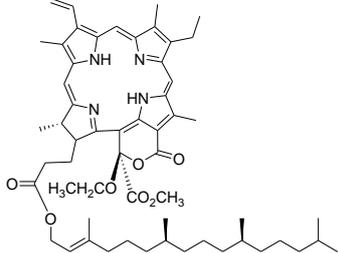
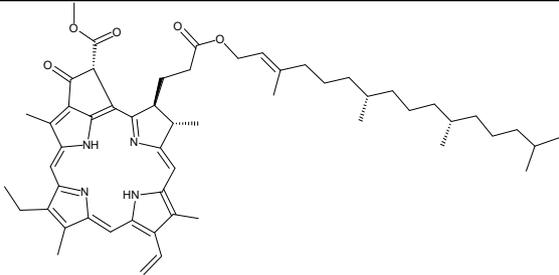
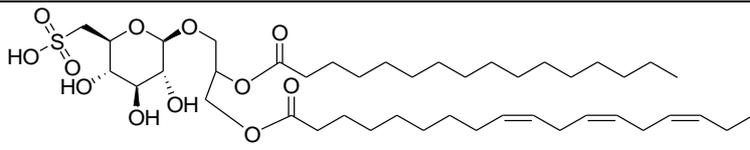
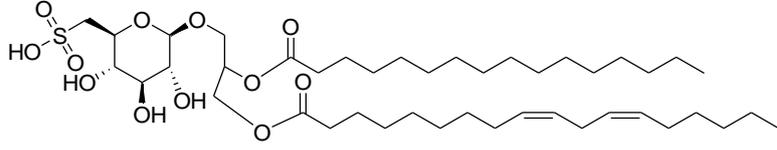
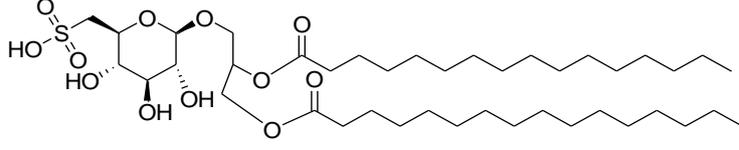
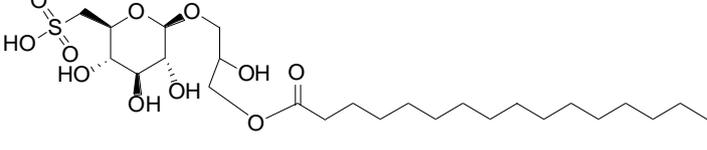
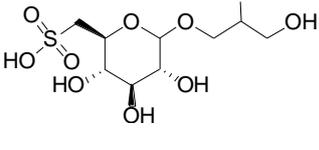


**Abb. 74:** ESI-FTICR-MS Spektren der Chlorophyllfreien SA Methanol-Extrakte der Alge *S. rubescens* (*S. rubescens* eWP (rot), *S. rubescens* mWP (blau), *S. rubescens* eSP (grün), *S. rubescens* mSP (schwarz)) im negativen Ionenmodus [KHS\_48\_5\_neg\_FT / KHS\_48\_6\_neg\_FT / KHS\_48\_7\_neg\_FT / KHS\_48\_8\_neg\_FT]

**Tab. 17:** Übersicht der Mikroalgen in denen Sulfolipide detektiert bzw. charakterisiert wurden.

<b>Mikroalge</b>	<b>Phylum / Klasse</b>	<b>Literaturquelle</b>
<b><i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[366]
<b><i>Spirulina maxima</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[367]
<b><i>Spirulina platensis</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[318]
<b><i>Spirulina platensis</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[368]
<b><i>Prochlorococcus - MED4</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	
<b><i>Synechococcus -</i> <i>WH8103</i> <i>WH8113</i> <i>WH8020</i> <i>WH8018</i> <i>WH8101</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[369]
<b><i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803*</b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	
<b><i>Synechocystis</i> sp. PCC6803</b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[370]
<b><i>Trichodesmium erythraeum</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[369]
<b><i>A. platensis N-46</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	
<b><i>Scytonema. hofmanni</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[298]
<b><i>Nostoc punctiforme</i></b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	
<b><i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806</b>	Cyanobacteria / Cyanophyceae	[325]
<b><i>Stephanodiscus</i> sp</b>	Bacillariophyta/ Mediophyceae	[371]
<b><i>Skeletonema costatum</i></b>	Bacillariophyta/Mediophyceae	[372]
<b><i>Phaeodactylum tricornutum</i> 6 SAG 1090-6 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> 1a SAG 1090-1a <i>Phaeodactylum tricornutum</i> 1b SAG 1090-1b</b>	Bacillariophyta/Bacillariophyta incertae sedis	[298]
<b><i>Heterosigma carterae</i></b>	Ochrophyta/Raphidophyceae	
<b><i>Nannochloropsis</i> <i>oculata</i>, UTEX, Austin</b>	Ochrophyta/Eustigmatophyceae	[373]
<b><i>Nannochloropsis</i> sp.</b>	Ochrophyta/Eustigmatophyceae	[344]
<b><i>Porphyridium cruentum</i></b>	Rhodophyta/Porphyrindiophyceae	[327]
<b><i>Porphyridium purpureum</i></b>	Rhodophyta/Porphyrindiophyceae	[300]
<b><i>Chilomonas paramecium</i></b>	Cryptophyta/Cryptophyceae	[342]
<b><i>Chlorella variegata</i></b>	Chlorophyta/Trebouxiophyceae	[342]
<b><i>Chlorella</i> sp.</b>	Chlorophyta/Trebouxiophyceae	[344]
<b><i>Chlorella kessleri</i></b>	Chlorophyta/Trebouxiophyceae	[374]
<b><i>Chlorella minutissima - UTEX 2341</i></b>	Chlorophyta/Trebouxiophyceae	[375]
<b><i>Parietochloris incisa</i></b>	Chlorophyta/Trebouxiophyceae	[343]
<b><i>Prototheca portoricensis</i></b>	Chlorophyta/Trebouxiophyceae	[342]
<b><i>Dictyochloris fragrans</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	[376]
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	[377]
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	[378]
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	[370]
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	[379]
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	[380]
<b><i>Dunaliella parva</i></b>	Chlorophyta/Chlorophyceae	
<b><i>Tetraselmis chuii</i></b>	Chlorophyta/Chlorodendrophyceae	[381]

**Tab. 18:** Verbindungen die in den Docking Studien untersucht wurden (durchgeführt von Dr. Susanne Aust, NWC, IPB Halle)

Verbindung	Struktur
20 $C_{57}H_{78}N_4O_7$	
21 $C_{55}H_{74}N_4O_5$	
22 $C_{43}H_{76}O_{12}S$	
23 $C_{43}H_{78}O_{12}S$	
24 $C_{41}H_{78}O_{12}S$	
25 $C_{25}H_{48}O_{11}S$	
26 $C_9H_{18}O_{10}S$	

**Tab. 19:** Hitliste AcorA / Korrelation der UPLC-ESI-MS Daten im *pos. Ionenmodus* (Ausschnitt)

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (+)	t <sub>R</sub> [s]	Peakcluster/Annotation
1	0.88	948.4	556.0	Isotopenpeak [M+H] C57H78N4O8
2	0.88	900.5	552.8	
3	0.86	901.5	414.3	
4	0.86	566.4	469.6	
5	0.86	934.5	537.5	
6	0.86	899.3	553.9	
7	0.85	653.4	557.9	
8	0.84	552.1	469.1	
9	0.84	901.2	357.6	
10	0.84	583.3	453.6	
11	0.84	630.3	328.3	
12	0.84	934.4	557.5	
13	0.84	932.5	559.2	Isotopenpeak M+H C57H78N4O7
14	0.84	565.4	337.0	
15	0.84	931.5	561.5	[M+H] C57H78N4O7
16	0.83	794.1	248.7	
17	0.83	932.4	531.7	
18	0.83	605.3	325.8	
19	0.83	604.1	469.2	
20	0.83	623.3	250.9	
21	0.82	930.7	560.8	
22	0.82	565.2	467.8	
23	0.82	583.1	470.9	
24	0.82	902.1	358.1	
25	0.81	887.2	551.3	
26	0.81	580.1	429.5	
27	0.81	583.3	370.9	
28	0.80	567.4	333.3	
29	0.80	581.2	450.9	
30	0.80	933.5	561.7	Isotopenpeak M+H C57H78N4O7
31	0.80	916.4	516.1	
32	0.80	597.4	273.3	
33	0.80	931.4	539.1	
34	0.80	551.3	542.8	
35	0.80	568.3	467.8	
36	0.80	566.5	338.5	
37	0.80	579.4	547.5	
38	0.79	877.1	580.2	
39	0.79	903.6	416.4	
40	0.79	892.4	580.5	
41	0.79	622.2	482.7	

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (+)	t <sub>R</sub> [s]	Peakcluster/Annotation
42	0.79	931.5	523.6	
43	0.79	597.4	330.3	
44	0.79	613.3	272.2	
45	0.79	891.1	580.9	
46	0.78	902.1	378.1	
47	0.78	901.4	271.8	
48	0.78	582.4	297.7	
49	0.78	551.1	570.2	
50	0.78	633.3	208.2	
51	0.78	794.3	272.2	
52	0.78	624.1	412.4	
53	0.78	784.0	31.5	
54	0.78	613.3	354.2	
55	0.78	582.4	329.6	
56	0.78	901.4	330.0	
57	0.77	551.1	469.3	
58	0.77	947.4	554.9	[M+H] C57H78N4O8
59	0.77	567.3	469.3	
60	0.77	979.3	557.9	[M+H] C58H82N4O9 / 978
61	0.77	622.3	462.5	
62	0.77	935.4	557.2	
63	0.77	275.3	178.7	
64	0.77	566.3	368.9	
65	0.77	597.4	299.5	
66	0.77	736.7	31.5	
67	0.77	930.7	527.6	
68	0.76	792.1	255.1	
69	0.76	549.1	468.2	
70	0.76	885.1	477.7	
71	0.76	568.1	380.7	
72	0.76	581.4	378.0	
73	0.76	551.2	429.3	
74	0.76	787.3	271.8	
75	0.76	653.3	535.2	
76	0.75	903.3	328.2	
77	0.75	549.3	408.6	
78	0.75	565.3	388.8	
79	0.75	589.5	419.2	
80	0.75	581.4	298.1	
81	0.75	902.5	414.9	
82	0.75	797.5	271.5	
83	0.75	615.1	453.2	
84	0.75	367.3	251.5	
85	0.75	532.5	469.3	

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (+)	t <sub>R</sub> [s]	Peakcluster/Annotation
86	0.75	582.2	358.5	
87	0.75	631.6	208.8	
88	0.75	796.2	271.8	
89	0.74	915.1	515.6	
90	0.74	401.2	352.6	
91	0.74	777.1	299.3	
92	0.74	584.4	308.0	
93	0.74	904.1	552.0	
94	0.74	611.6	427.0	
95	0.74	632.4	208.6	
96	0.74	448.2	503.6	
97	0.74	458.5	469.3	
98	0.74	775.6	299.3	
99	0.74	401.8	32.4	
100	0.74	852.1	272.1	

**Tab. 20:** Hitliste AcorA / Korrelation der ESI-FTICR-MS Daten im *pos. Ionenmodus*

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z(+)	Peakcluster/Annotation
1	0.81	970.57	Isotopenpeak, 969
2	0.81	949.59	Isotopenpeak, 947
3	0.80	315.90	
4	0.79	950.59	
5	0.79	985.54	[M+ K] <sup>+</sup> , 946
6	0.78	947.59	[M+H] <sup>+</sup> , 946
7	0.77	948.59	Isotopenpeak, 947
8	0.75	963.58	
9	0.75	784.45	
10	0.75	855.46	
11	0.75	818.58	
12	0.74	969.56	[M+ Na] <sup>+</sup> , 947
13	0.74	783.44	
14	0.73	961.60	
15	0.73	255.85	
16	0.71	261.17	
17	0.70	335.26	
18	0.70	763.52	
19	0.69	767.47	
20	0.69	768.47	
21	0.68	839.49	
22	0.68	856.46	
24	0.67	889.57	
23	0.67	888.57	
25	0.67	892.54	
26	0.66	765.46	
27	0.66	762.51	
28	0.65	786.46	
29	0.64	977.60	
30	0.63	894.55	[M+Na] <sup>+</sup> , 871

## 9. Anhang

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z(+)	Peakcluster/Annotation
31	0.63	893.54	
32	0.62	835.54	
33	0.61	983.59	
34	0.61	295.89	
35	0.61	256.18	
36	0.61	925.52	
37	0.60	909.54	
38	0.60	760.50	
39	0.60	789.49	
40	0.60	781.42	
41	0.59	986.54	Isotopenpeak 985
42	0.59	933.60	
43	0.58	802.55	
44	0.58	895.55	Isotopenpeak, 894
45	0.58	890.57	
46	0.58	819.58	
47	0.58	290.55	
48	0.57	919.59	
49	0.57	905.57	
50	0.57	769.49	
51	0.57	793.52	
52	0.57	964.59	
53	0.57	764.53	
54	0.56	971.58	Isotopenpeak 969
55	0.56	932.59	
56	0.56	931.59	
57	0.56	326.24	
58	0.55	770.49	
59	0.55	766.46	
60	0.55	962.61	
61	0.55	290.89	
62	0.54	980.61	
63	0.54	296.22	
64	0.54	605.42	
65	0.54	1513.96	
66	0.53	788.48	
67	0.53	787.47	
68	0.53	903.56	
69	0.53	861.68	
70	0.52	887.57	
71	0.52	873.58	
72	0.52	795.50	
73	0.52	834.53	
74	0.52	325.90	
75	0.52	1027.69	
76	0.51	629.46	
77	0.51	799.43	
78	0.51	1519.00	
79	0.50	771.50	

**Tab. 21:** Hitliste AcorA / Korrelation der UPLC-ESI-MS Daten im neg. Ionenmodus (Ausschnitt)

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (-)	Rt [min]	Peakcluster / Annotation
1	0.88	845.47	5.65	
2	0.85	818.60	8.08	
3	0.84	817.27	8.43	B2
4	0.83	815.73	7.22	B1
5	0.82	846.37	5.49	
6	0.81	815.73	7.52	
7	0.80	867.60	5.53	
8	0.80	817.67	7.70	
9	0.80	818.60	7.70	
10	0.79	509.13	4.57	
11	0.77	843.60	5.56	
12	0.77	818.27	8.55	
13	0.76	814.67	7.22	
14	0.76	815.73	6.80	
15	0.75	794.73	8.86	
16	0.75	816.60	7.92	
17	0.74	745.60	4.57	
18	0.74	509.53	4.59	
19	0.74	815.73	7.75	
20	0.74	225.40	9.54	
21	0.74	831.60	9.62	
22	0.74	817.63	7.22	
23	0.73	833.60	9.63	
24	0.73	829.53	9.62	
25	0.73	484.13	3.75	
26	0.73	816.67	7.20	B1
27	0.72	819.60	9.54	
28	0.72	742.73	9.63	
29	0.72	818.67	7.20	
30	0.72	796.67	9.54	
31	0.72	817.60	6.81	
32	0.72	847.33	9.54	
33	0.72	744.67	9.63	
34	0.72	797.73	7.20	
35	0.71	816.67	7.51	
36	0.71	819.60	8.37	
37	0.71	819.27	8.13	
38	0.70	817.67	9.11	
39	0.70	597.53	3.81	
40	0.70	510.53	4.58	
41	0.70	743.60	9.63	
42	0.70	747.60	4.57	
43	0.70	848.60	5.54	

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (-)	Rt [min]	Peakcluster / Annotation
44	0.70	840.27	5.70	
45	0.69	795.67	8.87	
46	0.69	741.67	9.64	
47	0.69	745.60	2.88	
48	0.69	598.53	3.84	
49	0.69	746.60	4.57	
50	0.68	793.67	9.28	
51	0.68	879.53	5.53	
52	0.68	809.60	5.38	
53	0.68	835.60	9.63	
54	0.68	895.43	5.60	
55	0.68	865.63	5.42	
56	0.67	817.27	5.02	
57	0.67	795.67	9.53	
58	0.67	823.67	5.41	
59	0.67	846.33	5.71	
60	0.67	231.27	1.74	
61	0.67	836.67	5.50	
62	0.66	483.23	3.96	
63	0.66	843.60	9.54	
64	0.66	823.63	5.70	
65	0.66	594.53	3.26	
66	0.66	849.60	5.68	
67	0.66	875.40	9.63	
68	0.66	837.60	5.67	
69	0.65	793.23	2.98	
70	0.65	843.40	8.52	
71	0.65	821.33	9.54	
72	0.65	893.53	5.39	
73	0.65	507.73	3.40	
74	0.65	816.67	6.81	
75	0.65	609.40	4.57	
77	0.65	820.07	9.15	
76	0.65	761.67	9.64	
78	0.65	815.67	9.56	
79	0.65	786.23	5.52	
80	0.65	849.67	5.35	
81	0.64	845.53	5.03	
82	0.64	579.27	3.28	
83	0.64	968.20	4.10	
84	0.64	503.67	3.23	
85	0.64	627.53	4.09	
86	0.64	745.47	3.44	
87	0.64	817.33	9.54	
88	0.63	849.47	7.89	

## 9. Anhang

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (-)	Rt [min]	Peakcluster / Annotation
89	0.63	836.53	9.63	
90	0.63	485.20	3.69	
91	0.63	844.53	8.50	
92	0.63	967.27	4.03	
93	0.63	819.60	8.47	
94	0.63	794.67	9.54	
95	0.62	792.07	5.58	
96	0.62	484.17	4.10	
97	0.62	794.73	9.25	
98	0.62	815.40	6.21	
99	0.62	816.67	5.83	
100	0.62	818.13	9.54	
102	0.62	746.53	4.14	
101	0.62	745.60	4.20	
103	0.62	834.60	9.64	
104	0.62	746.67	5.00	
105	0.61	814.87	6.83	
106	0.61	745.53	3.95	
107	0.61	818.67	6.81	
108	0.61	818.37	6.50	
109	0.61	861.53	5.40	
110	0.61	816.60	6.51	
111	0.61	459.70	3.79	
112	0.61	583.33	4.11	
113	0.61	581.47	4.09	
114	0.61	789.70	5.54	
115	0.61	808.07	5.49	
116	0.61	745.67	5.00	
117	0.60	792.13	8.08	
118	0.60	541.33	2.95	
119	0.60	829.67	5.79	
120	0.60	877.60	5.53	
121	0.60	796.70	9.08	
122	0.60	558.53	3.49	
123	0.60	821.60	5.51	
124	0.60	876.27	9.64	
125	0.60	806.80	8.55	
126	0.60	867.13	2.96	
127	0.60	796.70	8.77	
128	0.60	832.60	9.63	
129	0.60	817.33	8.77	
130	0.60	820.63	8.47	
131	0.60	851.60	5.62	

**Tab. 22:** Hitliste AcorA / Korrelation der ESI-FTICR-MS Daten im *neg. Ionenmodus*

Nr.	Korrelationsfaktor	m/z (-)	Peakcluster / Annotation
1	0,756	815,50	C1 / [M-H] <sup>-</sup>
2	0,717	272,20	
3	0,697	836,54	
4	0,696	813,49	
5	0,685	264,54	
6	0,683	264,87	
7	0,680	816,50	C1 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 815
8	0,677	271,87	
9	0,642	794,52	C2 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 793
10	0,640	795,52	C2 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 793
11	0,639	821,54	C3 / N.A.
12	0,632	820,53	
13	0,628	817,52	C4 / [M-H] <sup>-</sup>
14	0,625	819,53	C4 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 817
15	0,622	796,52	
16	0,593	822,54	C3 / N.A.
17	0,586	741,47	
18	0,563	273,21	
19	0,560	793,52	C2 / [M-H] <sup>-</sup>
20	0,554	831,62	
21	0,531	831,50	C5 / N.A.
22	0,529	277,22	
23	0,520	837,48	
24	0,509	832,50	C5 / N.A.
25	0,507	247,86	
26	0,502	743,49	C6 / N.A.
27	0,502	744,49	C6 / N.A.
28	0,486	691,44	
29	0,480	766,53	
30	0,459	805,52	
31	0,447	791,50	
32	0,438	346,06	
33	0,422	689,42	
34	0,408	818,52	C4 / Isotopenpeak [M-H] <sup>-</sup> 817
35	0,401	273,55	
36	0,392	669,45	
37	0,374	833,51	C5 / N.A.
38	0,373	832,62	
39	0,368	762,50	
40	0,367	827,58	
41	0,360	828,59	

## 1) Peakpicking und Alignment

### a.) XCMS-Skript für FTICR-MS Daten

#### Peakpicking:

Starten von XCMS und laden der Bibliothek  
> library(xcms)

Pfadangabe für Eingabedaten  
> setwd("/x/x..Pfadangabe für Rohdaten")

Dateien einlesen und Peakpicking durchführen  
> xsPos/xsNeg <- xcmsSet(method="MSW", SNR.method='data.mean', winSize.noise=500, peakThr=80000, snthresh=3, amp.Th=0.005, scales=c(1, seq(7,9,3)))

Speichern  
> save(xsPos/xsNeg, file="Pfadangabe.rdat")

#### Alignment

Starten von XCMS und laden der Bibliothek  
> library(xcms)

Peakpicking Ergebnisse laden  
> load("/x/x..Pfadangabe der Daten")

#### Gruppierung

```
> classes <- sampnames(xsPos/xsNeg)
> names <- sampnames(xsPos/xsNeg)
> dim(names) <- c(length(names), 1)
> classes <- apply(names, 1, function(x){substr(x, 1, nchar(x)-16);})
> sampclass(xsPos/xsNeg) <- classes
```

#### Alignment

```
> xsgNeg/xsgPos <- group.mzClust(xsNeg/xsPos, minsamp=2, mzppm=7)
```

#### Ausgabe in Excel

```
> groupmat <- groups(xsgPos/xsgNeg)
> values <- groupval(xsgPos/xsgNeg, "medret", "into")
> tab <- cbind(groupmat, values)
```

#### Speichern und Ausgabe

```
> save(tab, file="/x/x..Pfadangabe der Daten_aligned.rdat")
> write.table(tab, file="/x/x.. Pfadangabe der Daten_tab.csv")
```

### b.) XCMS-Skript für UPLC-ESI-MS Daten

#### Peakpicking und Alignment

Starten von XCMS und laden der Bibliotheken  
> library(xcms)

Pfadangabe für Eingabe und Ausgabe Daten  
> setwd('Pfadangabe für Rohdaten') lpath <- ;  
> files <- list.files(lpath, full.names = T, pattern = "\*.mzXML", recursive = T)  
> length(files)

Parameter für Peakerkennung  
> snthr=5

Dateien einlesen und Peakpicking durchführen  
> xset <- xcmsSet(files=files, method='centWave', mzdiff=0.3, peakwidth=c(5,12), snthr=snthr, verbose.columns=F, prefilter=c(2,500))

#### Speichern

```
> setwd('/x/x/...Pfadedeingabe')
> file='Dateiname.rdat'
> save(xset, file=file)
```

## Gruppierung

```
> samprnames(xset)
> names<-samprnames(xset)
>names <- substr(names,1,nchar(names)-X) ## x=wie viele Zeichen am Dateinamenende entfernt werden sollen
>sampclass(xset) <- as.factor(names)
>xset_group1 <- group(xset, minsamp = 2, bw = 5, mzwid = 1)
> file="Dateiname.rdat"
>save(xset_group1,file=file)
> groupmat <- groups(xset_group1)
>values <- groupval(xset_group1, "medret", "maxo")
>tab <- cbind(groupmat, values)
>save(tab,file="/x/x...Pfadangabe der Daten_aligned.rdat")
>write.table(tab,file="Dateiname_tab.csv")
```

## 2) Korrelationsanalyse (AcorA)

### XCMS-Skript

Starten von AcorA und einlesen der Daten

```
>library(acora)
> dir<-"/x/x...Dateiname"
>setwd(dir)
>file<-" Pfadangabe der Datei.rdat"
>load(file)
```

Definieren in Tab-Matrix

```
> rownames(tab)<-paste(tab[,"mzmed"],tab[,"rtmed"],sep="/")
```

Bioaktivitäten definieren

```
>ba<-c(59,24,15,35,65,22,56,22,43,26,57,21,32,43,21,63,39,72,20,15,0,0,56,61)
```

Über diese Namen werden nun die Bioaktivitäten den Samples in avgTab zugeordnet

```
>names(ba)<-c("KHS048-01neg","KHS048-02neg","KHS048-03neg","KHS048-04neg","KHS048-05neg",
"KHS048-06neg","KHS048-07neg","KHS048-08neg","KHS048-09neg","KHS048-10neg",
"KHS048-11neg","KHS048-12neg","KHS048-13neg","KHS048-14neg","KHS048-15neg",
"KHS048-16neg","KHS048-17neg","KHS048-18neg","KHS048-19neg","KHS048-20neg",
"KHS048-21neg","KHS048-22neg","KHS048-23neg","KHS048-24neg")
```

Peaks &lt;150 m/z ausschneiden

```
>tabcleaned<-tab[which(tab[,1]>150),]
```

Tab-Matrix auf die Spalten zusammenschneiden (x bis x), die die eigentlichen Samplespalten enthalten

```
>colnames(tabcleaned) # Spalten mit Intensitätswerten raussuchen
```

```
>tab1<-tabcleaned[,x:x]
```

```
>tab2<-tab1
```

```
>colnames(tab2) ### hier müssen alle Spalten mit den Intensitätswerten enthalten sein
```

```
# ist so lang wie tab2 Spalten hat
```

```
# die Positionen, die gleiche Werte enthalten, definieren die Spalten in tab2, die zu einer Gruppe gehören
```

```
groupDefs<-c(substr(colnames(tab2)[1:72],1,9)) ## Zahlen sind Bsp.
```

```
# groupDefs muss die Gruppennamen enthalten, die auch in names(ba) verwendet wurden oder names(ba) muss die Gruppennamen enthalten, die hier festlegt sind
```

Test damit keine Schlüsselfehler mit falschen Gruppenspalten entstanden sind

```
>stopifnot(is.element(groupDefs,names(ba))) ## nicht alle groupDefs sind in names(ba) enthalten
```

```
>stopifnot(is.element(names(ba),groupDefs)) # nicht alle names(ba) sind in groupDefs enthalten
```

Peakintensitäten in tab2-Matrix pro Gruppe mitteln

```
>retList<-averageGroups(variableSampleMatrix=tab2, groupDefs=groupDefs, mean = TRUE, minfrac = NULL, minsamp = 2, makeNAZero = FALSE)
```

Gemittelte PeakMatrix

```
>avgTab <- retList$averagedVariableSampleMatrix
```

Guppeninfos, gibt an, in welchen Gruppen die einzelnen Peaks gesehen wurden

```
>groupInfos <- retList$groupInfos
```

Starten Permutations-Korrelations-Test

```
>corEr-
```

```
gObj<permCorrTest(variableSampleMatrix=avgTab,activities=ba,corMethod="spearman",permlts=1000,alpha=0.05)
```

Teil der Originaltabelle Tab. suchen, der zu den sig. korrelierenden Peaks gehört (neg.= Inhibitor oder pos. Korrelation)

```
>tab.posSigCorVars<getSigCorrsMatrix(variableSampleMatrix=tab,sigCorrs=corErgObj$sigCorrs.pos,corMethod=corErgObj$corMethod)
```

GroupInfos als erste Spalte an gemittelte Matrix hinzufügen

```
>avgTab<-cbind(groupInfos,avgTab)
```

```
>colnames(avgTab)[1]<-"groupinfos"
```

Teil der gemittelten Matrix avgTab raussuchen, der zu den sig. korrelierenden Peaks gehört (neg. und pos.)

```
>avg-
```

```
Tab.posSigCorVars<getSigCorrsMatrix(variableSampleMatrix=avgTab,sigCorrs=corErgObj$sigCorrs.pos,corMethod=corErgObj$corMethod)
```

Matrizen speichern in derzeitigem Working-Direktory

```
>dir<-"/x/x... Dateipfad und Name"
```

```
setwd(dir)
```

Ausgabe der Korrelationsergebnisse

```
>write.csv(tab.posSigCorVars,file=paste(file,"_tab_posCors.csv",sep=""))
```

```
>write.csv(avgTab.posSigCorVars,file=paste(file,"_avgTab_posCors.csv",sep=""))
```

Plots für die sig. korrelierenden Peaks (neg. und pos.) ausgeben und speichern in derzeitigem Working-Direktory

```
>plotSigCorrs(plotExps=corErgObj$plotExps.pos,fileNameSuffix=paste(file,"_posCorVar.pdf",sep=""),outputFolder=NULL)
```

```
>save(corErgObj,file=paste(file,"_corErgObj_Pos_1mg_7ppm.rdat",sep=""))
```



## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Carola Griehl, Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann und Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, die vorliegende Doktorarbeit anzufertigen. Dank gilt im besonderen Maße Ihrer Unterstützung während der gesamten Zeit in der ich dieses innovative und interessante Thema bearbeitet habe. Weiterhin möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch bedanken, der die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg übernommen hat.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. Norbert Arnold und Frau Dr. Katrin Franke für ihren fachlichen Rat, ihre Hilfe, die vielen aufbauenden Worte und das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber auch für viele lustige Stunden und Gespräche. Bei Herrn Dr. Jürgen Schmidt möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung, die konstruktiven Gedanken und Vorschläge zur Struktur-Charakterisierung bedanken. Insbesondere möchte ich aber auch „Moni“ (Ramona Heinke), nicht nur für ihre Unterstützung, sondern auch für die schönen und lustigen Stunden und Gespräche danken.

Bei Dr. Mirko Buchholz möchte ich mich für die Unterstützung und das Korrekturlesen bedanken. Dr. Jens Rahfeld, Anka, Mercedes, Livia und Matthias W. danke ich für die Unterstützung „rund um“ die QC-Assays und Dr. Susanne Aust für die Durchführung der Docking Studien.

Simone Bieler danke ich für ihre immer fortwährende Unterstützung und für ein immer offenes Ohr.

Für die Einarbeitung in die AcorA-Problematik sowie „informatischen“ Hilfestellungen danke ich Mark Haid und Dr. Steffen Neumann.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Biochemie/Algenbiotechnologie, dem „Technikum“ und der Abteilung NWC für die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mein „Wissenschaftler Tun“ all die Jahre unterstützt haben, sich mein Wehklagen in schwierigen Phasen anhören mussten und das ein oder andere Mal zu Gunsten meiner Doktorarbeit auf mich verzichten mussten.

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

*Marcus Tullius Cicero*

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Stephanie Hielscher-Michael (vorheriger Name: Krause-Hielscher)

Wettener Str. 37

06420 Könnern OT Lebendorf

Geburtsdatum: 21.06.1978 in Wippra

Familienstand: verheiratet / 1 Kind (18 Jahre)

### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

---

- 11.2013 – Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Laborleiterin  
Hochschule Anhalt (FH) in Köthen  
Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik  
Arbeitsgruppe Biochemie/Algenbiotechnologie
- 01.2009 – Kooperative Promotion an der Hochschule Anhalt, dem Leibniz-  
Institut für Pflanzenbiochemie Halle/S. sowie der Probiodrug AG Hal-  
le/S. gefördert vom Land Sachsen-Anhalt  
„Förderung Kooperativer Promotionen von Wissenschaftlerinnen an  
Fachhochschulen“  
*Arbeitsthema:*  
*„Glutaminylyklase inhibierende Verbindungen aus Mikroalgen –  
neue Leitstrukturen für den Einsatz in der Therapie der Alzheimer Er-  
krankung“*
- 01.2005 – 12.2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in Forschungsprojekten  
Hochschule Anhalt (FH) in Köthen  
Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik  
Arbeitsgruppe Biochemie/Algenbiotechnologie  
- *Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Verbindungen aus Algen*  
- *Etablierung makrophytischer Zellkulturen und deren Kultivierung in*  
*disposable Bioreaktoren*
- 03.2000 – 09.2000 Mitarbeiter Produktion (Maschinenbediener CNC-Maschinen)  
Wildfang Automotive GmbH & Co. KG in Hettstedt
- 09.1997 – 03.2000 Erziehungsurlaub

### NEBENTÄTIGKEITEN

---

- 07.2010 – 07.2012 Lehrbeauftragte im Modul Chemie / Biochemie (Sommersemester)  
Hochschule Anhalt (FH) in Köthen  
Fachbereich Elektrotechnik und Maschinenbau

## **BERUFLICHE AUSBILDUNG**

---

- 10.2000 – 12.2004     Diplomstudium Biotechnologie, Hochschule Anhalt (FH)  
Studienschwerpunkt Biotechnologische Verfahren  
Abschluss: Dipl. Ing. (FH) Biotechnologie; Gesamtnote: sehr gut 1,5
- 04.2004 – 12.2004     Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnik, Biotechnologie und Qualitätssicherung e.V. Köthen
- Thema: „Untersuchungen zur Sekundärmetabolitbildung ausgewählter phototropher Organismen in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen“*
- 10.2002 – 02.2003     Praxissemester, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben; Arbeitsgruppe Transkriptomanalyse
- 09.2001 – 10.2001     Praktikum, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben; Arbeitsgruppe Transkriptomanalyse
- 03.2001 – 04.2001     Praktikum, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben; Arbeitsgruppe Transkriptomanalyse

## **SCHULISCHE AUSBILDUNG**

---

- 08.1992 – 07.1997     Gymnasium „Am Markt“, Hettstedt  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 09.1989 – 06.1992     „Josef Alberts Gymnasium“, Bottrop
- 09.1985 – 09.1989     POS Großörner

## **EHRENAMTLICHES ENGAGEMENT**

---

- 05.2006 – 12.2008     Mitglied Forschungskommission der Hochschule Anhalt (FH)
- 07.2002 – 09.2004     Mitglied Studentenrat der Hochschule Anhalt (FH)  
Vorsitzende Studentenrat der Hochschule Anhalt (FH)  
Studentischer Vertreter der Kommission Studium & Lehre  
Studentischer Vertreter der AG BA-MA Studiengänge
- 10.2003 – 12.2004     Studentischer Vertreter im Senat der Hochschule Anhalt (FH)
- 10.2002 – 09.2003     Studentischer Vertreter im Konzil der Hochschule Anhalt (FH)

Lebendorf, 2016

## Publikationsverzeichnis

### Auszeichnungen

S. Krause-Hielscher, C. Griehl, H.U. Demuth, L.Wessjohann. Hugo-Junkers-Preis für Forschung und Innovation aus Sachsen-Anhalt 2013. Kategorie: Innovativste Vorhaben der Grundlagenforschung. *Wirkstoffe aus Algen zur Prävention gegen Alzheimer-Demenz*

### Posterpräsentationen

**S. Krause-Hielscher**, E. Loettel, W. Fitzner, M. Salisch, S. Töpferwien, C. Taeger, C. Griehl: Untersuchungen zur phototropen Luteinbildung aus heterotroph erzeugter Mikroalgenbiomasse. *Bundesalgenstammtisch, München 2015*

C. Griehl, H.-U. Demuth, L. Wessjohann, **S. Krause-Hielscher**: Bioaktive Substanzen aus Algen gegen Alzheimer. *Biotechnica, Hannover 2011*

**S. Krause-Hielscher**, H.U. Demuth, J. Rahfeld, L.Wessjohann, N. Arnold, C. Griehl: Microalgae and Alzheimer's disease. *4th Congress of the International Society for Applied Phycology Halifax/Kanada 2011*

C. Griehl, **S. Krause-Hielscher**: Algen gegen das Vergessen – Algen als Quelle neuer Wirkstoffe gegen Alzheimer. *Biotechnica, Hannover 2010*

Griehl, C., **Krause-Hielscher, S.**, Arnold, N., Michels, K., Denkert, A., Wessjohann, L.: Bioactive metabolites from *Eustigmatos magnus*. *11th International Conference on Applied Phycology Galway/Irland 2008*

Griehl, Carola; Ludewig, Sandra; **Krause-Hielscher, Stephanie**: Macrophytic cell and tissue cultures for the production of bioactive substances. *11th International Conference on Applied Phycology Galway/Irland 2008*

C. Griehl, **S. Krause-Hielscher**, N. Arnold, K. Michels, L. Wessjohann: Biologically active compounds from the microalga *Eustigmatos magnus*. *7th European Workshop Biotechnology of Microalgae, Potsdam Rehbrücke 2007*

### Publikationen

**S. Krause-Hielscher**, C. Griehl, H.-U. Demuth, S. Schilling, L. Wessjohann, N. Arnold: Sulfolipide zur Verwendung als QC-Inhibitoren. DE 10 2015 011 780.7.

**S. Krause-Hielscher**, H.-U. Demuth, L. Wessjohann, N. Arnold, C. Griehl (2015). Microalgae as source for potential anti-Alzheimer's Disease directed compounds - Screening for Glutaminyl Cyclase (QC) inhibiting metabolites. *IJPBS* 5 (4), 164.

**Hielscher-Michael, S.**, Griehl, C., Buchholz, M., Demuth, H. U., Arnold, N., & Wessjohann, L. A. (2016). Natural Products from Microalgae with Potential against Alzheimer's Disease: Sulfolipids Are Potent Glutaminyl Cyclase Inhibitors. *Marine Drugs* 14(11), 203.

### Vorträge

**Krause-Hielscher, S.**, & Griehl, C.: Challenges and prospects of algal biotechnology for the isolation and characterization of active pharmaceutical ingredient (API) on the example of new Glutaminyl cyclase (QC) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Biotechnology: advances and prospects, Pinsk/Belarus 2014*

**S. Krause-Hielscher**, H.-U. Demuth, L. Wessjohann, C. Griehl: Antialzheimerwirkstoffe aus Mikroalgen. *Regenerative Energien als Zukunftstechnologie, Köthen 2011*

**S. Krause-Hielscher**, U. Demuth, J. Rahfeld, L. Wessjohann, N. Arnold, C. Griehl: Microalgae - a possible source for new drugs in the treatment of Alzheimer's disease. *8th European Workshop Biotechnology of Microalgae, Potsdam Rehbrücke 2010*

**S. Krause-Hielscher**, S. Ludewig, A. Isdepsky, C. Griehl: Potential makrophytischer Zellkulturen für die Produktion bioaktiver Substanzen. *9. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz der Fachhochschulen in Mitteldeutschland; Köthen 2008*

**S. Krause-Hielscher**, C. Griehl: Cell and Tissue cultures of macrophyticalgae -Establishment and Cultivation. Vortrag, *International Life Sciences Students Conference, Warschau/Polen 2008*

## ***Eidesstattliche Erklärung***

Hiermit erkläre ich, Stephanie Hielscher-Michael geboren am 21.06.1978 in Wippra, dass ich die vorliegende Arbeit, mit Ausnahme der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel, selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gezeichnet.

Halle (Saale), 08.Juli 2016

Stephanie Hielscher-Michael