



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Integrative Research Center Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit

Wirkungsweise synthetischer Hopfenflavonoide und  
Einschlusskomplexe  
auf adulte neuronale Stammzellen

Michael Andreas Johannes Kirchinger

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Cordt Zollfrank

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Volker Sieber

2. Prof. Dr. Herbert Riepl

Die Dissertation wurde am 20.08.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der promotionsführenden Einrichtung Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 17.02.2020 angenommen.

## Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Herbert Riepl** gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit zur Promotion am Fachgebiet für Organische und Analytische Chemie. Außerdem möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen, die immerwährende fachliche Unterstützung und die gewährten Freiheiten beim Erstellen dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei:

Herrn Prof. Dr. Volker Sieber für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Cordt Zollfrank für die Übernahme der Prüfungskommission.

Frau Dr. Corinna Urmann für die Betreuung bei dieser Arbeit und die stete Unterstützung bei meiner Arbeit. Unsere zahlreichen Diskussionen waren eine große Hilfe beim Durchführen der Arbeiten.

Allen meinen Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima am Lehrstuhl.

Frau Lara Bieler für die Durchführung der Zellversuche zur Neurogenese.

Herrn Dr. Martin Biendl, Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft m.b.H., für die Bereitstellung des Hopfenextraktes und die finanzielle Unterstützung.

Der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München e.V. für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern Hans und Liese sowie meiner Schwester Julia, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



# Inhalt

1	Zusammenfassung / <i>summary</i> .....	1
2	Einleitung .....	5
2.1	Der Hopfen.....	5
2.2	Xanthohumol und Stoffwechselstörungen .....	6
2.3	Pharmakokinetik.....	9
2.4	Pro-hepatische Wirkung .....	11
2.5	Anti-infektive Wirkung.....	12
2.6	Phytoöstrogene Wirkung .....	12
2.7	Anti-kanzerogene Wirkung .....	14
2.8	Wirkungen auf das Nervensystem.....	17
2.9	Neuro-differenzierende Wirkungen von Hopfenflavonoiden.....	18
2.10	Problemstellung und Zielsetzung.....	20
3	Untersuchung der Cyclodextrin-Einschlussverbindungen .....	22
3.1	Hintergrund .....	22
3.2	Bestimmung der Löslichkeit von Xanthohumol C.....	27
3.3	Chemisch-analytische Charakterisierung des Einschlusskomplexes .....	31
3.4	Teildiskussion der Cyclodextrin-Komplexe .....	43
4	Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von Flavonoiden .....	46
4.1	Hintergrund Neuroanatomie .....	46
4.2	Synthese der Flavonoide.....	51
4.3	Ergebnisse der Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen .....	65
4.4	Teildiskussion der Struktur-Aktivitätsuntersuchungen.....	89
5	Diskussion und Ausblick.....	92
6	Experimenteller Teil.....	96
6.1	Allgemeiner Teil .....	96
6.1.1	Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien.....	96
6.1.2	Geräte und Methoden .....	96
6.2	Stoffsynthese - Chromanringe.....	99

6.2.1	Synthese des Chroman-Rings.....	99
6.2.2	Synthese des 1,2-Dihydroquinolins .....	101
6.2.3	Synthese des 2H-Thiochromens .....	102
6.3	Synthese der B-Ringe .....	103
6.3.1	Schützen der Hydroxybenzaldehyde, allgemeine Vorschrift .....	103
6.3.2	Ether-Bildung der Hydroxylgruppe mit unpolaren Ketten .....	105
6.4	Synthese der Flavonoide durch Aldolkondensation, allgemeine Vorschrift .....	106
6.5	Entschützen der Flavonoide, allgemeine Vorschrift .....	112
6.6	Reduzieren der $\alpha,\beta$ -Doppebindung .....	129
7	Untersuchungen der Cyclodextrinkomplexe .....	131
7.1	Herstellung der Cyclodextrinkomplexe .....	131
7.2	Herstellung des physikalischen Gemischs.....	131
7.3	Quantitative Bestimmung des Xanthohumol C Gehalts im Komplex.....	132
7.4	Löslichkeitsstudien .....	133
7.5	Bestimmung der Bildungskonstante des Einschlusskomplexes.....	134
7.6	Dynamische Differenzkalorimetrie .....	135
7.7	Massenspektrometrische Untersuchung des Komplexes.....	135
8	Literatur.....	136
9	Abbildungsverzeichnis.....	159
10	Tabellenverzeichnis .....	163
11	Lebenslauf .....	164

## 1 Zusammenfassung / summary

Der Hopfen *Humulus Lupulus* L. enthält viele biologisch aktive Flavonoide, deren Anwendbarkeit breit gefächert ist. Das Wirkspektrum reicht von anti-oxidativen Wirkungen bis zu anti-karzinogenen und östrogenartigen Wirkungen. Aus diesem Grund hat der Hopfen bereits Verwendung in der Phytotherapie gefunden. Seit einigen Jahren wird auch an Hopfen-Flavonoiden mit differenzierungsinduzierender Wirkung auf neuronale Stammzellen geforscht, die weitere interessante und wichtige Anwendungen bieten können.

Ziel dieser Arbeit ist es, die bisherigen Kenntnisse dieser neuro-aktiven Hopfen-Flavonoide zu vertiefen, neue wirksame Substanzen dieser Stoffklasse zu finden sowie deren Einsatzmöglichkeiten zu klären.

Untersuchungen zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit wurden an der differenzierungsinduzierenden Leitsubstanz Xanthohumol C durchgeführt. Die erarbeitete Methode kann allerdings auch auf andere (Hopfen-)Flavonoide übertragen werden. Aufgrund des gering polaren Aromaten und des Chalkongerüsts von Xanthohumol C ist die maximale Löslichkeit in Wasser sehr gering. Damit wird auch der Einsatz dieser Substanzklasse auf Zellen oder in Lebewesen eingeschränkt. Um die Wasserlöslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit des Chalkons zu erhöhen, wurde 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin als Trägermolekül eingesetzt. Dadurch lässt sich ein Einschlusskomplex von Xanthohumol C und Cyclodextrin bilden. Dieser Komplex wurde auf seine Stöchiometrie sowie der zu Grunde liegenden Struktur untersucht. Außerdem konnte durch *in vitro* Tests mit dem Einschlusskomplex gezeigt werden, dass sich die differenzierungsinduzierende Aktivität des Komplexes nicht von der Aktivität des freien Flavonoids unterscheidet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden weitere natürliche Hopfenflavonoide sowie verschiedene synthetische Derivate hergestellt und auf ihr Potential zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu Nervenzellen getestet. Anhand der Ergebnisse konnten Erkenntnisse über wichtige Strukturelemente der Flavonoide für die neuro-aktive Wirkung gewonnen werden. Die Chromanstruktur hat sich als entscheidendes Merkmal der Substanz erwiesen. Derivate mit diesem Strukturmerkmal zeigen erheblich höhere Aktivitäten als Substanzen mit Prenylkette. Die Struktur-Aktivitäts-Untersuchung ergab, dass das Sauerstoffmolekül an der Position 4' der Chromanstruktur ein sehr wichtiger Faktor für die differenzierungsinduzierende Aktivität darstellt. Der Austausch des Sauerstoffatoms gegen andere Heteroatome führt zu einer teils erheblichen Abnahme der Aktivität. Für die neuro-aktive Wirkung spielte es weiterhin keine Rolle, ob die Doppelbindungen der Substanzen teils oder vollständig hydriert vorliegen. Die Aktivität der Differenzierungsinduktion war in diesem Fall jeweils gleich. Somit kann die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung des Flavonoids ohne Verlust der neuro-aktiven Wirkung hydriert werden.

Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da sich ohne die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung die Bioverfügbarkeit der Chalkone erheblich verbessert. Durch kovalente Bindung von Proteinen im Organismus an die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung sinkt die Bioverfügbarkeit des Flavonoids. Diese Anlagerung ist an der hydrierten Doppelbindung nicht mehr möglich. Bei der Struktur-Aktivitäts-Untersuchung der B-Ringe der Flavonoide erwiesen sich die Derivate mit Hydroxylgruppen als die aktivsten Substanzen. Sowohl der Austausch durch andere funktionelle Gruppen als auch das Entfernen des Substituenten am B-Ring führte zu einer deutlichen Abnahme der differenzierungsinduzierenden Aktivität. Bei der Variation der Position der Hydroxylgruppe am B-Ring konnte keine Abnahme der Aktivität beobachtet werden. Es stellte sich heraus, dass eine Hydroxylgruppe an der Position 2 die höchste differenzierungsinduzierende Wirkung aufweist. Dabei spielte es für die Aktivität keine Rolle, ob noch andere Hydroxylgruppen am B-Ring vorhanden sind, solange sich keine zweite Hydroxylgruppe in direkter Nachbarschaft befand. Auf Basis der resultierenden Ergebnisse dieser Arbeit stellt das Flavonoid mit Chromanring und der Hydroxylgruppe in Position 2 am B-Ring die Leitstruktur für die Entwicklung differenzierungsinduzierende Substanzen dar.

Die Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur weiteren Anwendbarkeit von Flavonoiden in *in vitro* und *in vivo* Tests. Durch die Verbesserung der Wasserlöslichkeit um das ca. 600 fache und die damit verbundene Erhöhung der Bioverfügbarkeit lassen sich die getesteten Substanzen reproduzierbarer und in geringerer Konzentration verabreichen. Die beschriebene Komplexbildung und deren Charakterisierung kann auch auf andere (Hopfen-) Flavonoide angewendet werden. Außerdem konnte eine neue Substanz mit sehr starker differenzierungsinduzierender Aktivität als Leitstruktur differenzierungsaktiver Substanzen entwickelt werden.

## Summary

Hop *Humulus Lupulus* L. contains many biologically active flavonoids. Their applicability is wide-ranging. The spectrum of activity ranges from anti-oxidative effects to anti-carcinogenic and estrogen-like effects. For this reason, hops are already used in phytotherapy. For several years, hop-flavonoids with differentiation-inducing effects on neural stem cells have been researched, which can offer further interesting and important applications.

The aim of this work was to deepen the previous knowledge of these neuro-active hop flavonoids, to find new active substances of this class and to clarify their potential applications.

Investigations to improve the bioavailability were carried out on the differentiation-inducing lead compound xanthohumol C. However, the method developed can also be applied to other (hop)-flavonoids. Due to the low-polarity of the aromatic rings and the chalcone skeleton of xanthohumol C, the maximum solubility in water is very low. This also limits the use of this substance class on cells or in living organisms. In order to increase the water solubility and thus the bioavailability of the chalcone, 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin was used as a carrier molecule. As a result, an inclusion complex of xanthohumol C and cyclodextrin could be formed. This complex was examined for stoichiometry and the underlying structure. In addition, *in vitro* assays with the inclusion complex have shown that the differentiation-inducing activity of the complex does not differ from that of the free flavonoid.

In the second part of this work, further natural hop flavonoids as well as various synthetic derivatives were synthesized and tested for their potential to differentiate neuronal stem cells to nerve cells. Based on the results, perceptions about important structural elements of the flavonoids for the neuro-active effect could be obtained. The chroman structure has proved to be a crucial feature of the substance. Derivatives with this structural skeleton showed significantly higher activity than substances with a prenyl chain. The structure-activity study revealed that an oxygen molecule at position 4' is a very important factor for the differentiation-inducing activity. Replacement of the oxygen atom with other heteroatoms resulted in a considerable decrease in activity. For the neuro-active effect, it also did not matter whether the double bonds of the substances were partially or completely hydrogenated. The activity of differentiation induction was the same in each case. Thus, the double bond can be hydrogenated without loss of neuro-active effect. This is an important finding, because without the  $\alpha,\beta$ -double bond, bioavailability of the chalcone significantly improved. Proteins in the organism can covalently bind to this double bond, which is no longer possible after hydrogenation. In the structure-activity study of the flavonoid B-rings, derivatives with hydroxyl groups proved to be the most active substances. The replacement through other functional groups or removal of the substituent on the B-ring resulted in a significant decrease in



differentiation-inducing activity. When varying the position of the hydroxyl group on the B ring, no decrease in activity could be observed. It turned out that a hydroxyl group at the position 2 had the highest differentiation-inducing effect. It was not relevant for the activity whether other hydroxyl groups were present on the B-ring whilst there was a hydroxyl group at position 2 of the B ring. Thus, this flavonoid with chroman ring and the hydroxyl group in position 2 on the B-ring is best suited as a lead structure for the development of differentiation-inducing substances.

The results provide an important contribution to the further applicability of flavonoids in *in vitro* and *in vivo* tests. By improving the water solubility by about 600 times and the associated increase in bioavailability, the substances tested can be administered more reproducibly and in a lower concentration. The described complexation and its characterization can also be applied to other (hop)-flavonoids. In addition, a new substance with very strong differentiation-inducing activity could be developed as a lead structure in neuro-active substances.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der Hopfen

Der echte Hopfen (*Humulus Lupulus* L.) ist seit der Einführung des Reinheitsgebots 1516 für das Bierbrauen essentiell. Neben Wasser, Hefe und Malz darf dem Bier nur Hopfen zugesetzt werden. Er verleiht dem Bier seinen unverkennbaren bitteren Geschmack und erhöht durch seine anti-bakteriellen und anti-fungalen Eigenschaften auch die Haltbarkeit des Bieres. Aufgrund des Bedarfs von Hopfen beim Bierbrauen wird dieser als Kulturpflanze im landwirtschaftlichen Anbau angebaut. Diese Anbauflächen werden als Siegelflächen bezeichnet. Die größte zusammenhängende Anbaufläche weltweit ist die Hallertau. Sie erstreckt sich über 2400 km<sup>2</sup> und stellte 2017 86 % der deutschen und 34 % der weltweiten Hopfenproduktion sicher (Hopfenrundschau November 2018). Hopfen wächst nur zwischen dem 35. und 55. Breitengrad – sowohl nördlicher als auch südlicher Breite. Dies liegt daran, dass sich die Blüte der weiblichen Hopfenpflanze erst bei einer bestimmten Tageslänge ausbildet, die abhängig vom Breitengrad ist. Befruchtete Hopfendolden eignen sich aufgrund des verringerten Gehalts an Bierwürze nicht gut zur Verarbeitung in Brauereien. Deshalb hält man männliche Hopfenpflanzen, die durch Windbestäubung die weiblichen Blütenstände befruchten würden, aus den Anbaugebieten fern. Aus den unbefruchteten Hopfenblüten entwickeln sich dann Hopfendolden mit den Lupulindrüsen. Diese enthalten neben den für die Brauerei wichtigen Humulonen ( $\alpha$ -Säuren) und Lupulonen ( $\beta$ -Säuren) auch zahlreiche Vertreter der Polyphenole und Terpene. Medizinisch gesehen spielt eine Substanzgruppe der Polyphenole, die Gruppe der Flavonoide, eine große Rolle. Hier sind viele positive Effekte wie anti-virale, anti-bakterielle, anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-kanzerogene Wirkungen bekannt geworden. Außerdem wirken einige Vertreter östrogen-aktiv und beeinflussen das Nervensystem. Flavonoide gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen und bestehen aus zwei aromatischen Ringen, die über eine C<sub>3</sub>-Brücke verbunden sind. Flavonoide leiten sich vom Grundgerüst des Flavans ab [1].

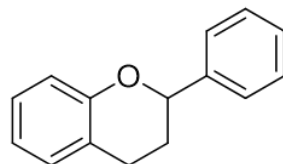


Abbildung 1: Struktur von Flavan, das Grundgerüst der Flavonoide.

Der bekannteste Vertreter der Flavonoide in Hopfen ist Xanthohumol. Dabei handelt es sich um ein prenyliertes Flavonoid und zugleich um das am höchsten konzentrierte Flavonoid im Hopfen [2]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche medizinische Anwendungen der im Hopfen enthaltenen Flavonoide veröffentlicht.

## 2.2 Xanthohumol und Stoffwechselstörungen

Die heutige Gesellschaft in den hochentwickelten Ländern zeigt eine immer weiter steigende Zunahme der Zahl der fettleibigen Personen [3]. Durch die immer weiter reduzierte körperliche Arbeit und die dabei trotzdem steigende Kalorienaufnahme wird das Durchschnittsgewicht wohl auch noch weiter steigen. Diese Adipositas genannte Erscheinung wirkt sich jedoch nicht nur auf die Gesundheit der einzelnen Personen aus, es beeinflusst auch massiv die Lebenserwartung. Außerdem steigt die Gefahr, am metabolischem Syndrom zu erkranken, was sich ebenfalls negativ auf die Lebenserwartung auswirkt. Per Definition gilt man am metabolischen Syndrom erkrankt, wenn man drei oder mehr der folgenden Symptome aufweist: Stammfettsucht, Störungen im Fettstoffwechsel, Insulinresistenz bzw. gestörte Glucose-Toleranz, Bluthochdruck, entzündungsfördernde Zustände und Thrombophilie [4]. In den USA leiden mehr als 34 % der Erwachsenen am Metabolischen Syndrom, wodurch sie ein stark erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes Typ 2 aufweisen [5]. Um diesem Problem vorzubeugen, muss dringend auf die Ernährung und besonders auf die Kalorienaufnahme geachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen der Kalorienaufnahme bzw. dem Fettanteil im Organismus und der Lebenserwartung ist seit langem bekannt. So wurde in Tierversuchen gezeigt, dass Mäuse mit verminderter Kalorienaufnahme eine erheblich längere Lebenserwartung zeigten [6]. Als Gründe hierfür wurden das verminderte Auftreten von Sauerstoffradikalen [7] sowie die verminderte Ausschüttung von Insulin und insulinähnlicher Wachstumsfaktoren beschrieben. Dies steht im Verdacht, Ursache für Folgeerkrankungen wie Diabetes Typ 2, Fettsucht oder Atherosklerose zu sein [8]. Im Gegenzug konnte durch Studien mit erhöhter Kalorienzufuhr und dadurch vergrößerter Fettmasse gezeigt werden, dass die Lebenserwartung der Mäuse reduziert wurde [9]. Aus diesen Daten lässt sich die Gefahr der Adipositas auf den Menschen gut abschätzen. Fettleibigkeit verursacht neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes auch Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen. Adipositas ist damit Ursache oder Katalysator von zahlreichen „modernen“ Krankheiten. Um diese abzumildern, ist eine ausgewogene Ernährung und viel Bewegung wohl das Beste. Um zusätzlich dazu die Fetteinlagerung zu reduzieren, kann man den Fettstoffwechsel beeinflussen. Dabei wäre eine Hemmung der Differenzierung von Adipozyten eine Möglichkeit der Wahl. Studien mit 3T3-L1 Zellen zeigten, dass sowohl Xanthohumol als auch ein Xanthohumol reicher Hopfenextrakt diese Differenzierung von Proadipocyten zu Fettzellen hemmten. Dies geschieht durch die Verringerung von Markerproteinen wie Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR), Transkriptionsfaktoren (C/EBP) und des Fettsäuren-bindenden Proteins (aP2) [10-12]. Zudem konnte bei Ratten mit sehr fettreicher Ernährung gezeigt werden, dass durch den Zusatz von Xanthohumol-reichem Hopfenextrakt die Erhöhung des Körpergewichts und die Massezunahme der Leber reduziert werden konnte. Außerdem reduzierte sich bei diesen

Tieren der Triglyceridspiegel im Blutplasma und der Leber [13]. Womöglich wirkt Xanthohumol auch inhibierend auf die Fettsäure-Synthase. Dieses Enzym katalysiert in Säugetieren den Aufbau von Fettsäuren aus Acetyl-Coenzym A und ist somit für die Energiespeicherung im Organismus mitverantwortlich. In Studien mit dem Xanthon Mangostin konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung *in vitro* das Enzym Fettsäure-Synthase inhibiert [14]. Aufgrund der ähnlichen strukturellen Beschaffenheit von Xanthohumol und Mangostin könnte bei den beschriebenen Effekten der selbe Mechanismus zugrunde liegen [15]. Ebenso konnte der Einfluss von Xanthohumol auf die Steuerung des Cholesterolaushalts – einem Risikofaktor des Metabolischen Syndroms - nachgewiesen werden. Im Tierversuch mit KK-A<sup>y</sup> Mäusen – einem speziellen Modell für Diabetes Typ 2 und Fettsucht – konnte gezeigt werden, dass durch die Fütterung von täglichen Dosen Xanthohumol sowohl die Triglyceride als auch das Glucose-Level im Plasma abnahmen. Dabei wurde das Risiko für Diabetes bei Testmäusen erheblich reduziert [16]. Die Abnahme des Glucose-Levels und des Körpergewichts konnte in männlichen Ratten bestätigt werden [17]. Xanthohumol konnte dabei als Agonist des Farnesoid X Rezeptors identifiziert werden. Dieser spielt eine entscheidende Rolle im Gallensäurestoffwechsel [16]. Bei Mäusen mit Diabetes verbesserte sich die Wundheilung, die durch Diabetes verzögert wurde. Dies wird durch den kontinuierlichen Rückgang von Entzündungen und des oxidativen Stresses bewerkstelligt [18]. Die Gabe von 1 mg/kg Xanthohumol bzw. 8-Prenylnaringenin (vgl. Abbildung 2) zeigte eine Verbesserung der Herz- und Nierenfunktion von Mäusen, die zuvor sehr fettreich gefüttert wurden. Dieser Effekt wird durch die Beeinflussung des vaskular endothelialen Wachstumsfaktor B (VEGF) ausgelöst [19]. Neben diesen Ergebnissen zeigt das Flavonoid auch bei der verringerten Glucoseaufnahme im Darm [20] und bei der Hemmung der  $\alpha$ -Glucosidase [21] hypoglycämische Effekte. Die  $\alpha$ -Glucosidase ist ein Enzym, welches im Darm die Abspaltung von einzelnen Glucoseeinheiten von Glucoseketten bewirkt. Sie ist elementar für die Aufnahme von Glucose in den Organismus. Durch die Hemmung dieses Enzyms kann man aber eine zu hohe Aufnahme des Zuckers verhindern. Diese Inhibierung durch Xanthohumol erfolgt wohl durch die Anlagerung durch eine Michael-Addition der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung des Chalkons mit einem Cysteinrests des Enzyms. Diese These wird durch Tests mit Iso-Xanthohumol und Kuraridin gestützt. Während Iso-Xanthohumol als Flavonoid keine  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung besitzt, ähneln sich die Strukturen der Chalkone Kuraridin und Xanthohumol (Abbildung 2). Beide zeigen in Zelltests eine starke Inhibierung der  $\alpha$ -Glucosidase, während Iso-Xanthohumol keine Hemmung zeigt [22].

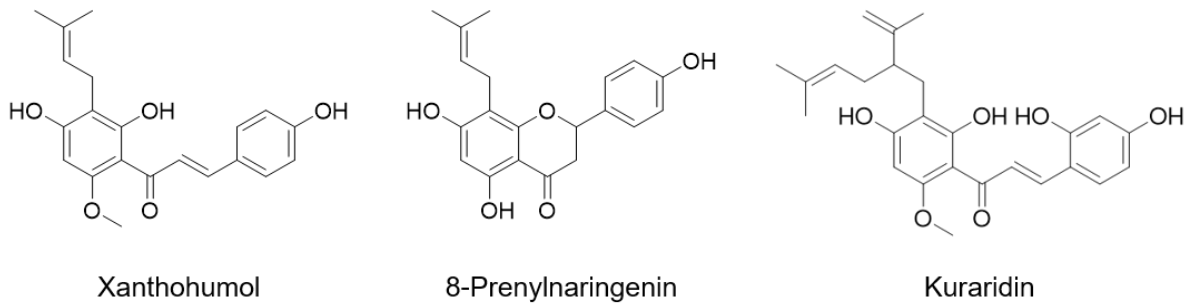


Abbildung 2: Struktur von Xanthohumol, 8-Prenylnaringenin und Kuraridin.

Xanthohumol zeigt auch Wirkungen gegen Hyperlipoproteinämie, also eine Erhöhung von Cholesterol, Triglyceriden und Lipoproteinen im Blut. Dieses Krankheitsbild führt zu einem erhöhten Risiko an Atherosklerose. Dabei kommt es zu einer vermehrten Einlagerung von Lipiden in die innere Wandschicht von arteriellen Gefäßen, die folglich immer enger werden. Es resultieren Unterversorgungen von Organen, die auch zum Tod führen können. Mittlerweile ist Atherosklerose die häufigste Todesursache der Welt [23]. Im Körper werden Fette durch sogenannte Lipoproteine transportiert. LD Lipoproteine sorgen für die Einlagerung der Fette, während HD Lipoproteine die eingelagerten Lipide abbauen und zur Leber transportieren. So führt ein erhöhter LD Lipoproteinspiegel zu einem steigenden Risiko für Gefäßerkrankungen [24]. Im Zellmodell (HepG2) konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Synthese und den Transport von Triglyceriden hemmt. Es verringert die Ausschüttung des Apolipoprotein b, einem wichtigen Bestandteil des LD Lipoproteins [25]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Synthese von Triglyceriden hemmt. Dies erfolgt durch die Inhibierung der Diacylglycerol Acyltransferase [26]. Gefäßkrankheiten können vorgebeugt werden, indem beispielsweise die Konzentration der HD Lipoproteine erhöht wird. Durch Inhibierung des Cholesterinester-Transferproteins (CEPT) erhöht sich der Spiegel des HDL Cholesterols, was CEPT zu einem sehr interessanten Ziel für die Behandlung von Atherosklerose macht. Xanthohumol ist in der Lage, CEPT nicht-kompetitiv zu inhibieren. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen haben gezeigt, dass sowohl die Chalkonstruktur also auch die Prenylgruppe für diese Hemmung essentiell sind [27]. Diese Ergebnisse konnten auch *in vivo* bestätigt werden [28]. Xanthohumol hemmte das Cholesterinester-Transferprotein und steigerte den Spiegel des Apolipoprotein e, welches für die Verstoffwechslung von Triglyceriden und Lipoproteine verantwortlich ist. Somit konnte gezeigt werden, dass das Cholesterollevel bei Mäusen sinkt, die mit Xanthohumol gefüttert wurden. Außerdem konnte die Fläche von arthroskopisch bestimmten Plaques verringert werden [28,29]. Die Oxidation von LD Lipoproteinen ist ein wichtiger Faktor in der Entstehung von Atherosklerose [30]. Da Xanthohumol eine starke ant-oxidative Wirkung aufweist [31], kann es die Oxidation von LD Lipoprotein verringern. Dies konnte in *in vitro* Versuchen bereits beschrieben werden [32].

### 2.3 Pharmakokinetik

Der Organismus ist darauf bedacht, körperfremde Stoffe – wie beispielsweise Arzneimittel – schnellstmöglich auszuschleusen. Dabei wird die Substanz durch die sogenannte Biotransformation umgewandelt. Ziel ist es, die Ausscheidung des Stoffes zu erleichtern und dadurch zu beschleunigen. Die Transformation findet in zwei Schritten statt. In der ersten Phase finden Oxidationen, Reduktionen und Hydrolyse-Reaktionen statt. Ziel dieses Schrittes ist es, die Löslichkeit der Verbindung zu erhöhen und damit die Ausscheidung zu begünstigen. Die Wirkung des Ausgangsstoffes nimmt dadurch in der Regel ab. Es ist jedoch auch möglich, dass dadurch Verbindungen entstehen, die andere – oft schädliche – Wirkungen zeigen. Um dies bei der Verabreichung von Medikamenten ausschließen zu können, muss auch die Aktivität der entstehenden Abbauprodukte überprüft werden. Hauptsächlich findet die Biotransformation in der Leber durch die Cytochrom P450 Enzyme statt. Für Xanthohumol wurden diese Abbauprodukte bereits identifiziert. Obwohl das Chalkon das Enzym CYP1A inhibiert, konnten vier Metaboliten nachgewiesen werden. Die Autoren beschrieben die eingesetzte Xanthohumolkonzentration als zu gering um das Enzym komplett zu inhibieren. Aus diesem Grund konnten sich einige Metaboliten bilden. Neben Xanthohumol C, das starke neurodifferenzierungsaktive Eigenschaften besitzt [33], konnten noch drei hydroxylierte Derivate von Xanthohumol identifiziert werden (vgl. Abbildung 3) [34].

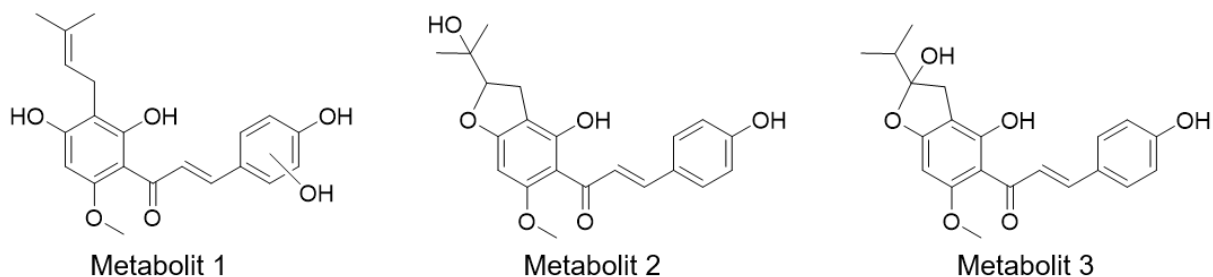


Abbildung 3: Metaboliten von Xanthohumol nach *Yilmazer et al.* [34].

Diese Substanzen zeigen chemopräventive Wirkungen gegen Krebszellen [35]. Neben dem Enzym CYP1A gibt es weitere CYPs, die ausgehend von Xanthohumol verschiedene Metaboliten bilden. Abhängig vom Testsystem (*in vivo* oder *in vitro*) und eingesetzten CYPs konnten verschiedenste Formen von Ringschlüssen mit Hydroxy- oder Epoxidgruppen identifiziert werden [36-38]. In der zweiten Phase der Biotransformation werden die modifizierte Verbindung mit wasserlöslichen Substanzklassen (Glucuronsäure, Sulfate, Aminosäuren) konjugiert, um das Ausscheiden aus dem Organismus zu erleichtern. UDP-Glucuronosyltransferasen katalysieren diese Reaktionen. Leber-Mikrosomen aus Mensch und Ratte konnten Xanthohumol glucuronidieren. Es entstanden zwei Hauptprodukte. Zum einen bindet die Glucuronsäure an die freie Hydroxygruppe des B-Rings, zum anderen an die 4'-OH

Gruppe des A-Rings [39]. Als Phase II Metaboliten konnten auch Monosulfate nachgewiesen werden. Die Bildung dieser Metabolite werden durch Sulfotransferasen katalysiert [40,41]. Neben den erwähnten Metabolisierungen in der Leber findet auch im Verdauungstrakt eine Umwandlung statt. Dabei wird Xanthohumol in Iso-Xanthohumol umgewandelt. Diese intramolekulare Michael-Addition findet spontan in Abhängigkeit vom Milieu statt [42,43]. Iso-Xanthohumol bzw. Xanthohumol können durch Darmbakterien oder durch das Enzym CYP1A2 demethyliert und in 8-Prenylnaringenin bzw. Desmethyl-Xanthohumol und 6-Prenylnaringenin umgewandelt werden [44,45]. Diese Umwandlungen sind in Abbildung 4 dargestellt.

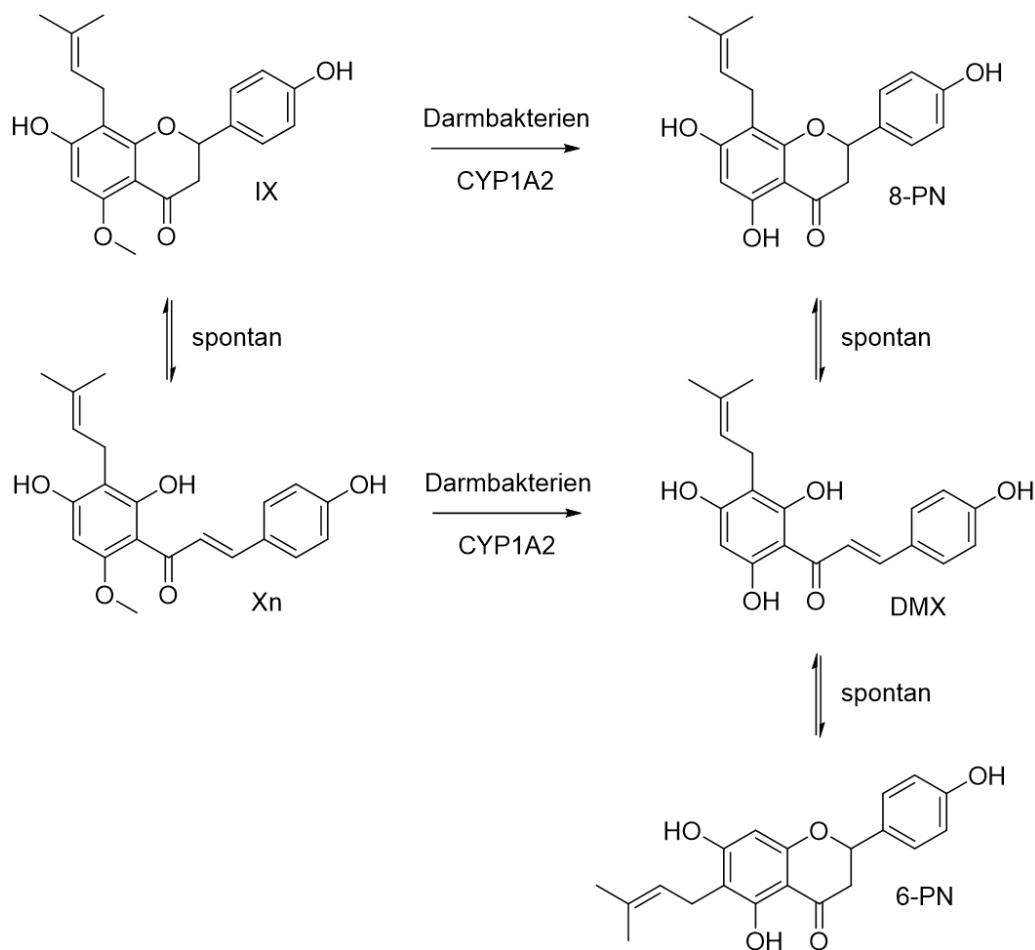


Abbildung 4: Metabolische Umwandlung von Xanthohumol (Xn) zu Iso-Xanthohumol (IX), Desmethyl-Xanthohumol (DMX), 8-Prenylnaringenin (8-PN) und 6-Prenylnaringenin (6-PN). Schema in Anlehnung an *Legette et al.* [46].

Dadurch entstehen aus Xanthohumol die phytoöstrogen-aktiven Substanzen 6- und 8-Prenylnaringenin. Diese Metabolite konnten auch im menschlichen Blut nach oraler Aufnahme von Xanthohumol nachgewiesen werden. Diese Studie belegt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen tierischen und menschlichen Metabolisierungen gibt [47].

Eine weitere Studie untersuchte die Pharmakologie von Xanthohumol, Iso-Xanthohumol, 6-Prenylnaringenin und 8-Prenylnaringenin nach oraler Aufnahme eines standardisierten Hopfenextrakts bei Frauen in der Menopause. Dabei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Spiegel der Prenylflavonoide im Blutserum. Die Substanzen wurden hauptsächlich als Glucuronsäure-Derivat im Serum und im Urin nachgewiesen. Die Konzentration von 8-Prenylnaringenin war stark erhöht im Serum und im Urin, was die *in vivo* Umwandlung von Xanthohumol bzw. Iso-Xanthohumol zum östrogenartig aktiven 8-PN bestätigt [48]. Lipidmembranen spielen eine große Rolle bei der Aufnahme von Substanzen in den Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol, Iso-Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin in einer Lipiddoppelschicht interkalieren und dabei sowohl das Glycerinrückgrat und die Kohlenwasserstoffkette als auch die polare Kopfgruppe beeinflusst. Diese Wechselwirkungen könnten laut den Autoren Grund für den schnellen Transport durch die Zellmembranen sein [49,50].

#### **2.4 Pro-hepatische Wirkung**

Die Fettleber (*Steatosis hepatitis*) ist eine Erkrankung der Leber, bei der vermehrt Fett in die Leberzellen, den Hepatozyten, eingelagert wird. Als Grund hierfür werden meist Alkoholmissbrauch, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und übermäßiger Konsum von Medikamenten angeführt [51]. Neben den Hepatozyten kommen in der Leber auch sogenannte hepatische Sternzellen (HSC) vor. In einer gesunden Leber sind diese inaktiv, können aber durch unterschiedliche Leberschädigungen aktiviert werden. Dies führt zur Anhäufung von extrazellulärer Matrix, die über Leberfibrose zu Leberzirrhose führen kann [52]. Für die Behandlung der Ursache der Leberfibrose sind daher die HSC Zellen ein wichtiges Ziel. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Aktivierung dieser Zellen hemmt und bei den aktivierten Zellen die Apoptose induziert. Es reduzierte ebenfalls die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, der bei der Entstehung von Entzündungen maßgeblich beteiligt ist. *In vivo* wurde nachgewiesen, dass sich durch orale Verabreichung von Xanthohumol die durch Hepatitis auftretenden Entzündungen reduzieren ließen [53]. In Zelltests aktivierte das Chalkon auch das Entgiftungsenzym NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase (NQO1). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das Flavonoid 8-Prenylnaringenin die Aktivität von NQO1 reduziert [54]. Xanthohumol zeigte auch protektive Wirkungen gegen Tetrachlormethan induzierte Leberschäden in Ratten [55,56]. Zudem konnte durch die Verabreichung von Xanthohumol in Ratten den durch Ethanol ausgelösten oxidativen Stress der Leber erheblich reduziert werden [57].



## 2.5 Anti-infektive Wirkung

Die immer mehr beachteten Resistenzen von Bakterien gegenüber Antibiotika wird Jahr für Jahr ein größeres Problem [58]. Diese Gefahr wird von Intensivmedizinern als das Hauptproblem bei der Behandlung von infizierten Patienten geschildert [59]. Aus diesem Grund wird verstärkt nach neuen Substanzen mit anti-bakterieller Wirkung gesucht. Im Hopfen konnten einige dieser Verbindungen identifiziert werden. So konnten sowohl die Prenylflavonoide Xanthohumol, Iso-Xanthohumol, 6-Prenylnaringenin und 8-Prenylnaringenin als auch ein Hopfenextrakt als Wachstumsinhibitoren von *Staphylococcus aureus* [60,61] und *Streptococcus mutans* [62] identifiziert werden. Außerdem konnte die Wirkung von Hopfenextrakten mit und ohne Xanthohumol gegen Biofilme und deren Haft Eigenschaften gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass diese Eigenschaften zwar auch ohne Xanthohumol vorhanden waren (75 %) jedoch durch die Erhöhung des Xanthohumol-Anteils verstärkt wurde (99 %) [63]. Ein ethanolischer Hopfenextrakt zeigte in verschiedenen Konzentrationen inhibierende Wirkung gegen den Tuberkulosestamm *Mycobacterium tuberculosis* [64]. Auch Virusinfektionen stellen die Mediziner vor große Probleme. Virale Atemwegsinfektionen, Herpesviren und Retroviren stellen eine weltweite gesundheitliche Bedrohung dar. Die Bildung von Resistenzen ist bei Viren noch stärker ausgeprägt als bei Bakterien, wodurch immer neue anti-virale Substanzen benötigt werden. Pflanzliche Inhaltsstoffe werden schon immer als Quelle für anti-virale Substanzen eingesetzt [65]. Bereits wurde ein Xanthohumol-reicher Hopfenextrakt als Inhibitor in einem Modellsystem für das Hepatitis C Virus (Bovines Virusdiarrhoe-Virus, BVDV) gefunden [66,67]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol *in vitro* die Replikation des Hepatitis C Virus hemmt [68]. Auch *in vivo* (Spitzhörnchen – lat. *Tupaia*) konnte Xanthohumol als anti-virale Substanz identifiziert werden. Xanthohumol inhibiert die vom Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) induzierten cytopathischen Effekte sowie die Produktion des p24-Antigens und die reverse Transkriptase in C8166 Zellen. Außerdem hemmt es die Replikation des HI-Virus in PBMC Zellen (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) [69]. Darüber hinaus zeigt Xanthohumol inhibierende Wirkung gegen die Herpesviren HSV-1 und HSV-2 [70].

## 2.6 Phytoöstrogene Wirkung

Die Menopause setzt bei Frauen im Schnitt mit 51 Jahren ein [71]. Durch den dadurch ausgelösten Rückgang der Östrogenproduktion kommt es zu Beschwerden wie Hitzewallungen, Schweißausbrüchen, Herzrasen, Übelkeit und Osteoporose [72,73]. Um das Defizit des Hormons Östrogen auszugleichen wurde im Rahmen der Hormonersatztherapie Östrogen verabreicht. Diese Behandlung lindert zwar die auftretenden Beschwerden, jedoch

steht das verabreichte Östrogen im Verdacht, das Risiko von Brustkrebs, Herzinfarkt, Schlaganfall und Atherosklerose zu erhöhen [74]. Um die Symptome der Wechseljahre trotzdem behandeln zu können, steigen viele auf Phytoöstrogene um. Dabei handelt es sich um Naturstoffe, die im Organismus ähnliche Wirkungen wie die Hormone zeigen. Der Hopfen galt schon seit Anfang der 1930er Jahren als Heilmittel bei Menstruationsproblemen [75]. Bis die östrogen-aktive Substanz im Hopfen identifiziert wurde, dauerte es allerdings noch eine Weile. Erst 1999 konnte 8-Prenylnaringenin (8-PN, Struktur vgl. Abbildung 2) als die im Hopfen wirksame östrogen-aktive Substanz nachgewiesen werden [76]. Bis dato ist 8-PN das am stärksten wirksamste Phytoöstrogen mit der höchsten Affinität zu den Östrogenrezeptoren. Während andere bekannte Phytoöstrogene hauptsächlich an den Östrogenrezeptor- $\beta$  binden, zeigt 8-PN auch starke Affinität zum Östrogenrezeptor- $\alpha$ . Diese Affinität zum Rezeptor- $\alpha$  ist zweimal so groß verglichen mit der Affinität zum Rezeptor- $\beta$  [77,78]. Die Bindungsaffinität von 8-PN zu diesem Rezeptor ist nur 10 % der Affinität des natürlichen Liganden Östradiol-17 $\beta$ . Die strukturähnlichen Prenylflavonoide 6-Prenylnaringenin und Iso-Xanthohumol zeigen dagegen eine erheblich verringerte Östrogenwirkung [76,77,79]. Der Östrogenrezeptor- $\alpha$  ist hauptsächlich für die Entwicklung der Knochen und der Aufrechterhaltung der Knochendichte relevant [80], weshalb dieser Rezeptor ein wichtiges Ziel bei der Vorbeugung von Osteoporose darstellt [81]. Die osteogene (knochenbildende) Wirkung von prenylierten Flavonoiden konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei wurde die Position der Prenylgruppe am C-8 als entscheidende Gruppe charakterisiert [82-84]. Bei Knochenmarkstammzellen zeigt 8-Prenylnaringenin eine starke knochen-bildende Aktivität [85]. In Zelltests mit den Knochengewebe-zerstörenden Osteoklast-Vorläuferzellen (MC3T3-E1) konnte die knochen-protective Wirkung von 8-PN (10  $\mu$ M) bestätigt werden. Dieser Effekt wurde durch die Beeinflussung von Osteoprotegerin und Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANKL) nachgewiesen. 8-PN wirkt dabei über den Östrogenrezeptor- $\alpha$  [86]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine 8-PN Gabe von 18-30 mg/kg eine deutliche Erhöhung der Knochendichte auslöst [87]. Dieser Effekt konnte in Experimenten mit Ratten bei einer 8-PN Dosis von 1,77 mg/kg Körpergewicht jedoch nicht bestätigt werden. Die Autoren sind der Meinung, dass diese Konzentration jedoch zu gering für einen messbaren Effekt wäre [81]. Neben beschriebener Anwendung gegen wechseljahrsbedingte Osteoporose werden Hopfenextrakte vor allem gegen Hitzewallungen eingesetzt [88]. Als Modellsystem hat sich die Messung der Schwanztemperatur von ovariectomierten Ratten bewährt. Dabei zeigt der Einsatz einer subkutanen Tagesdosis von 400  $\mu$ g/kg bzw. eine orale Tagesdosis von 7.5 mg/kg eine Temperaturabsenkung des Schwanzes [89]. Auch beim Menschen konnten in Placebo-kontrollierten Studien gezeigt werden, dass die Gabe von Hopfenextrakten mit einer definierten Menge 8-PN eine Verbesserung der Wechseljahrsbeschwerden bewirkte [71,90-92]. In einer klinischen Studie wurde ein Hopfenextrakt als Vaginalgel zur Linderung von

vaginaler Trockenheit eingesetzt. Aufgrund der positiven Testresultate stellten die Autoren diese Möglichkeit als gute Alternative zur oralen Aufnahme von hormonähnlichen Substanzen dar [93].

## 2.7 Anti-kanzerogene Wirkung

Als „Krebs“ wird die unkontrollierbare Wucherung von Zellen und Gewebe bezeichnet. Im gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht aus Zellwachstum (Proliferation) und programmiertem Zelltod (Apoptose). Normalerweise wird diese Homöostase durch verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise Regelung der Apoptose, aufrechterhalten. Dabei handelt es sich um einen kontrollierten selbst-induzierten Tod der Zelle durch Öffnen der mitochondrialen Membranen. Kommt es aber zur Störung dieser Schutzmaßnahmen, entstehen unkontrollierbare Wucherungen, Zellhaufen oder Tumore.

Im Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland von 2016 veröffentlicht das Robert-Koch-Institut die aktuellen Zahlen der Erkrankten. 2016 sind demnach knapp 230.000 Frauen und ca. 250.000 Männer an Krebs erkrankt. Seit den 1970er Jahren hat sich diese Zahl der Krebspatienten verdoppelt. Als Hauptgrund wird hier die stetig steigende Lebenserwartung angeführt. Die prenylierten Flavonoide des Hopfens stellen eine sehr vielversprechende Substanzklasse für die Behandlung von Tumoren dar. In Zelltests inhibieren Prenylflavonoide die drei Stufen der Krebsentstehung (Initiations-, Promotions- und Progressionsphase) [36,94,95].

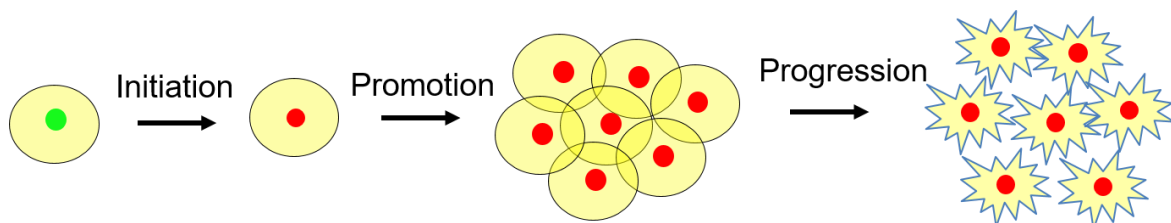


Abbildung 5: Schematische Darstellung der drei Phasen der Krebsentstehung: Initiation, Promotion, Progression.

In der Initiationsphase bilden sich – meist durch äußere Einflüsse wie Toxine, ultraviolettes Licht, Alkohol- und Tabakkonsum [96] oder falsche Transkription der DNS – erste Mutationen. Oft werden durch die körpereigenen Biotransformationsenzyme erst krebserregende Stoffe gebildet. Die Phase-I-Enzyme der Biotransformation haben im Organismus die Aufgabe, die Polarität von wasser-unlöslichen Verbindungen durch das Einbringen von Hydroxyl- bzw. Thiolgruppen zu steigern. Im nächsten Schritt verknüpfen die Phase-II-Enzyme das gebildete Produkt mit polaren Gruppen, um das Ausscheiden aus dem Körper zu begünstigen. Die Phase-I-Enzyme wie beispielsweise Cytochrom P450 können dabei Stoffe in kanzerogene Stoffe umwandeln, die Mutationen in der DNS auslösen können. Um die Krebsentstehung

bereits im Anfangsstadium zu verhindern, wäre eine gezielte Inhibierung dieser Enzyme vorteilhaft. Die Prenylflavonoide Xanthohumol, Iso-Xanthohumol, 6-Prenylnaringenin und 8-Prenylnaringenin sind in der Lage, das Phase-I-Enzym CYP1A2 zu inhibieren [94,97]. Die zweite Phase der Tumorbildung wird als Promotionsphase oder Tumorpromotion bezeichnet. Hierbei findet die Proliferation des mutierten Zelltyps statt. Der Reiz für die Proliferation kann auch durch nicht genotoxische Stoffe ausgelöst werden. Diese Substanzen können Entzündungen auslösen. Die betroffenen Zellen starten den Reparaturmechanismus, der durch Zellproliferation das betroffene Gewebe heilen soll. Durch diesen Reiz des Zellwachstums kommt es bei den mutierten Zellen zu unkontrollierbarer Proliferation. Cyclooxygenasen (COX) haben einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation von Entzündungen im Körper. Bei Entzündungen werden diese Enzyme vermehrt ausgeschüttet. Bei der Behandlung von Entzündungen werden folglich sogenannte COX-Hemmer eingesetzt. Prenylflavonoide wie Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin haben gezeigt, dass sie Cyclooxygenasen inhibieren können [94]. Außerdem können die defekten Zellen die Wachstumsstimulation durch Hormone wie Östrogen erhalten, was ebenfalls in einer Vermehrung der geschädigten Zellen endet. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Hopfen Prenylflavonoide Xanthohumol und Iso-Xanthohumol aufgrund ihrer anti-östrogenen Wirkung die Tumorpromotion beeinflussen können [97]. Die dritte Phase der Tumorbildung, die Progression, zeichnet sich durch das unkontrollierbare Wuchern der Zellen aus. Diese Phase stellt die eigentliche Gefahr dar, da sie durch das übermäßige Wachstum gesundes Gewebe verdrängt und zugleich Metastasen bildet. So konnte bei Xanthohumol, Desmethyl-Xanthohumol, Iso-Xanthohumol, 6-Prenylnaringenin und 8-Prenylnaringenin in Zelltests mit PC-3 und DU 145 Prostata Zellen eine anti-proliferative Effekte nachgewiesen werden [98]. Dieser Effekt beruht wohl auf dem durch die Flavonoide verursachten Anstieg der Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies in den Tumorzellen und nachfolgender Apoptoseinduktion, was zu einer Abnahme der Tumorlebensfähigkeit führt. Dadurch stagniert nicht nur das Wachstum der Tumorzelle, es führt auch zur Apoptose [99]. Neben den bereits beschriebenen anti-karzinogenen Wirkungen gegen Prostatazellen konnten die selben Effekte gegen Brustkrebs [100], Prostatakrebs [101], Hautkrebs [102], Darmkrebs [103], Lungenkrebs [104] und Leukämie [105] gezeigt werden.

Aufgrund des hohen Verbrauchs von Sauerstoff und Nährstoffen in Tumorzellen ist die stetige Bildung neuer Blutgefäße elementar für das Tumorwachstum [106]. Deshalb sind anti-angiogenetische Substanzen (Hemmung der Gefäßbildung) auch anti-karzinogen und hemmen vor allem die Krebsentstehung in der dritten Phase. Sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol und Iso-Xanthohumol die Neubildung von Blutgefäßen hemmen. Im Gegensatz dazu wird die Neubildung durch 8-Prenylnaringenin verstärkt [107]. Auch Derivate von Xanthohumol wie Xanthohumol H,

$\alpha,\beta$ -Dihydro-Xanthohumol, das Dihydrofuran-Derivat von Xanthohumol und ein Auron aus Xanthohumol zeigen anti-proliferative Wirkungen auf MCF-7-, PC-3- und HAT-29-Zellen (vgl. Abbildung 6) [108].

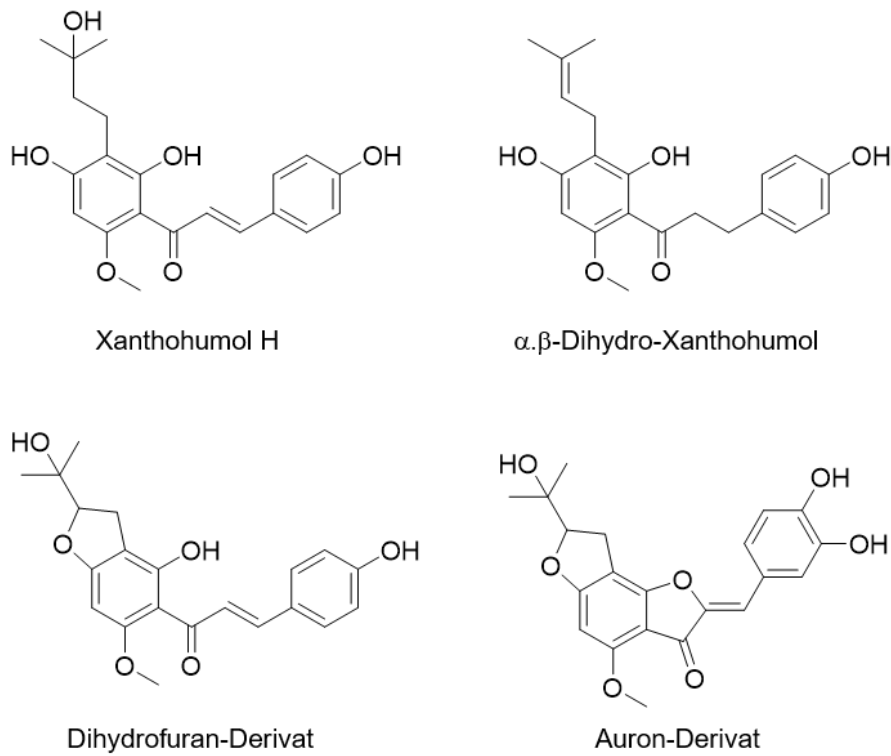


Abbildung 6: Derivate von Xanthohumol mit anti-proliferativer Wirkung.

Der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein Signalmolekül, das in der Differenzierung von Gewebe und Zellen einen großen Einfluss hat. Studien haben gezeigt, dass die gezielte Blockierung dieses Regelpfades eine interessante Möglichkeit in der Reduzierung der Tumorgröße, Metastasen- und Blutgefäßbildung darstellt [109]. Iso-Xanthohumol konnte als solcher Inhibitor des TGFs identifiziert werden. Das Flavonoid hemmt in Zelltests das Signalmolekül konzentrationsabhängig [110].

Autophagozytose bezeichnet den Abbau und die Verwertung von Zellbestandteilen in eukaryotischen Zellen. Durch Anomalitäten in diesem Mechanismus kann es zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen [111], Krebs [112] und Diabetes Typ 2 [113] kommen. Das Valosin-enhaltende Protein (VCP) stellt ein essentielles Protein in der Autophagozytose dar. *In vitro* Tests konnten zeigen, dass sich Xanthohumol direkt an die N-Domäne dieses VPC bindet und dadurch inhibiert. Dabei blockiert Xanthohumol die Anlagerung von Co-Faktoren [114]. Prostaglandin E (PGE<sub>2</sub>), ein durch COX-katalysiertes Produkt, spielt bei Entzündungen im Organismus eine wesentliche Rolle. Es ist entscheidend für die entstehende Rötung, die Gefäßpermeabilität und sensibilisiert die Nervenenden, was zu einer Schmerzvergrößerung führt. Außerdem steht PGE<sub>2</sub> im Verdacht, Krebs durch chronische Entzündungen auszulösen.

In Tests mit Gallengang-Karzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die PGE<sub>2</sub> Produktion reduzierte und auch die Migration der Zellen hemmte [115]. Die anti-metastatische Wirkung von Xanthohumol konnte auch in einem Assay mit MCF-7 Zellen auf Lymphgefäßzellen bestätigt werden [116].

## **2.8 Wirkungen auf das Nervensystem**

In Europa wurde der Hopfen (*Humulus Lupulus* L.) erfolgreich gegen Verdauungsprobleme, Schlaflosigkeit und Unruhe und eingesetzt [117]. Die sedierenden Eigenschaften werden den im Hopfen enthaltenen Bittersäuren zugesprochen, hauptsächlich der Verbindung 2-Methyl-3-Buten-2-ol. Dabei handelt es sich um ein Abbauprodukt der Bittersäuren durch die Lagerung [118]. Dieser Effekt wurde bereits in einigen Tierversuchen bestätigt [119-121]. In höheren Konzentrationen eingesetzt zeigt dieses Molekül betäubende Wirkungen [122,123]. Um eine Verbesserung dieser Wirkung zu erzielen, hat sich die Kombination von Hopfen mit Baldrian bewährt. In klinischen Studien konnte die Verbesserung der Schlafqualität mit Hopfen-Baldrian-Misch-Präparaten gezeigt werden [124]. Die Ursache für diese Wirkung liegt wohl in der Wechselwirkung von Hopfeninhaltsstoffen mit verschiedenen Rezeptoren oder der Hemmung von Neurotransmittern. Es konnten bereits Wechselwirkungen zwischen Xanthohumol und dem GABA (A) Rezeptor gezeigt werden. Dabei wird vermehrt der Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure freigesetzt, der im Körper unter anderem den Schlaf steuert [125,126]. Der anxiolytische Effekt von Xanthohumol konnte zwar im Rattenmodell nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine Wechselwirkung mit dem eingesetzten Midazolam. Die Autoren vermuten daher, dass Xanthohumol entweder Agonist oder Antagonist des GABA (A) Rezeptors ist oder mit anderen Neurotransmittersystemen wechselwirkt [127]. Es konnten auch neben dem GABA (A) Rezeptor Wechselwirkungen mit Melatonin- und Serotoninrezeptoren gezeigt werden, welche ebenfalls stark in den Schlaf-Wach-Rhythmus involviert sind [128].

Neben den zuvor beschriebenen Wirkungen auf das Nervensystem zeigen verschiedene Bestandteile des Hopfens Effekte für eine mögliche Behandlung von Alzheimer und Demenzerkrankungen. Diese Erkrankungen werden immer mehr zu einem schwerwiegenden Problem für die Gesellschaft. Allein in Deutschland weiß man von mindestens 1.2 Millionen Demenzerkrankten [129]. Bei Alzheimerpatienten können im Gehirn große Mengen der sogenannten senilen Plaques gefunden werden. Dieser besteht aus aggregiertem Amyloid, was durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Precursor-Protein mit BACE1 entsteht. Dieses Enzym ist ein wichtiges Zielmolekül bei der möglichen Behandlung von Alzheimer. In Zellexperimenten konnte die Inhibition von BACE1 durch Xanthohumol und hydroxyliertem Iso-Xanthohumol gezeigt werden. Die Position der Prenylgruppe zeigte sich als ausschlaggebend für diese Wirkung [130]. Im Tierversuch mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine

acht-wöchige Xanthohumol Aufnahme über die Nahrung die Lernfähigkeit von alten Mäusen erheblich verbessert. Außerdem konnte die räumliche Orientierung von jungen sowie alten Mäusen verbessert werden [131]. Xanthohumol zeigte sich außerdem neuroprotektiv bei ischämischen Hirninfarkten in Ratten. Diesen Effekt schreiben die Autoren der Apoptose-Inhibition und dem anti-inflammatorischen Eigenschaften von Xanthohumol zu. Beim Einsatz des Chalkons konnte auch das Ausmaß des Infarkts reduziert werden [132].

## 2.9 Neuro-differenzierende Wirkungen von Hopfenflavonoiden

Die in Hopfen natürlich vorkommenden Pyranochalkone Xanthohumol C, Iso-Xanthohumol C und Xanthohumol A sowie ein einfaches Phenylderivat mit geschlossenem Pyran-Ring wurden bereits als neuro-aktive Substanzen identifiziert [33]. Aufgrund dieser Eigenschaft erhielten sie die Trivialnamen ENDFs (Enhancement of neuronal differentiation factors) (vgl. Abbildung 7).

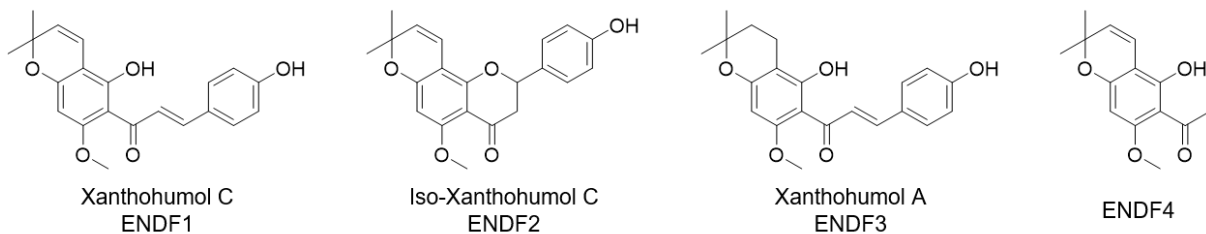


Abbildung 7: Struktur der ENDFs (Enhancement of neuronal differentiation factors).

Im Zellassay mit embryonischen Vorderhirnzellen der Maus und DCX als Markerprotein zeigte sich, dass diese ENDFs die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu Nervenzellen auslösen können [33].

Diese neuronalen Stammzellen kommen auch im erwachsenen Gehirn noch in speziellen Regionen vor. Im Hippocampus sowie dem Bulbus olfactorius findet auch im Erwachsenenalter noch Neurogenese statt. Dieser als adulte Neurogenese bezeichneter Vorgang findet nur in diesen beiden Gehirnarealen statt und wird durch bestimmte Signalmoleküle ausgelöst. Möglicherweise könnten die ENDFs auch als solche Signalmoleküle fungieren und die adulte Neurogenese induzieren. Die differenzierungsinduzierende Aktivität der ENDFs ist deutlich größer als die von anderen beschriebenen neuro-aktiven Flavonoiden wie Genistin, Baicalein, Wogonin, Quercetin oder Naringenin [33,133-135]. Die aktivste Verbindung – Xanthohumol C – zeigte in Zelltests mit PC12-Zellen auch neuro-protektive Wirkung gegen mit Cobaltchlorid induzierten Zelltod. Die differenzierungsinduzierende Wirkung beschränkt sich dabei ausschließlich auf die Bildung von Nervenzellen, es wurde keine Differenzierung zu Oligodendrozyten oder Astrozyten ausgelöst [33]. Es wurden auch die differenzierungsinduzierenden Aktivitäten von Naringenin, 8-Prenylnaringenin, 8-Geranylnaringenin und 8-Farnesylnaringenin untersucht. Dabei stellte

sich heraus, dass sich längere Seitengruppen an der Position 8 positiv auf die Aktivität auswirken. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sich die differenzierungsinduzierende Aktivität durch den Ringschluss der Prenylgruppe zu einem Chromanring am A-Ring signifikant steigern lässt. So zeigen die Substanzen Xanthohumol C, 6-Prenylnaringenin C, 8-Prenylnaringenin C und Iso-Xanthohumol C (vgl. Abbildung 8) eine signifikant höhere Aktivität als die offenkettigen Analoga Xanthohumol, 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Iso-Xanthohumol (vgl. Abbildung 8) [136].

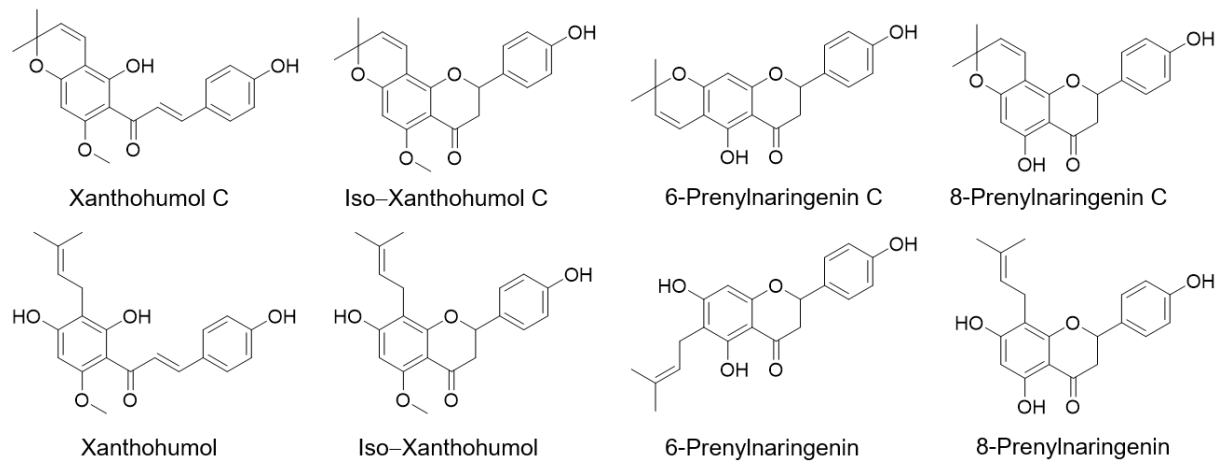


Abbildung 8: Vergleich der Struktur der differenzierungsaktiven Verbindungen Xanthohumol C, Iso-Xanthohumol C, 6-Prenylnaringenin C und 8-Prenylnaringenin C mit ihren offenkettigen Derivaten.



## **2.10 Problemstellung und Zielsetzung**

Der Hopfen enthält viele Flavonoide mit medizinisch relevanten Anwendungen. Neben der anti-karzinogenen Wirkung von Xanthohumol und der östrogenartigen Wirkung von 8-Prenylnaringenin ist die neuro-protektive und neuro-differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol C zu nennen. Dieses Hopfenflavonoid zeigt - verglichen mit anderen neuro-aktiven Flavonoiden - die bislang stärkste differenzierungsinduzierende Aktivität [33].

Die Wirkung des Flavonoids auf neuronale Stammzellen kann die Differenzierung zu Nervenzellen ausgelöst werden. Dies ermöglicht die Bildung neuer Nervenzellen. So könnte der Einsatz von Xanthohumol C ein möglicher Therapieansatz zur Bekämpfung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Demenz sein, da das Chalkon die Neubildung der Neuronen unterstützt. Um das Chalkon im Organismus einsetzen zu können, muss eine ausreichende Bioverfügbarkeit gewährleistet sein. Selbst für Tests an Zellen in Suspension muss die Löslichkeit des Moleküls im eingesetzten Puffermedium hoch genug sein, um die zu testende Konzentration erreichen zu können. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Xanthohumol C im wässrigen Milieu ist dies nicht der Fall, was ein Problem für Tierversuche ist. Ziel dieser Arbeit ist es, durch Komplexierung der Verbindung die Wasserlöslichkeit zu erhöhen, während die Aktivität der Substanz nicht beeinträchtigt werden soll. Ferner soll der entstehende Einschlusskomplex vollständig bezüglich Stöchiometrie und Struktur charakterisiert werden. Hierfür sollen verschiedene Methoden für verschiedene Analysen wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Massenspektroskopie (MS) und Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) entwickelt und verwendet werden.

Des Weiteren sollte die Grundstruktur des Flavonoids verändert und der daraus resultierende Einfluss von unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf die differenzierungsinduzierende Aktivität ermittelt werden. Durch diese Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollen nicht nur weitere wichtige Strukturelemente identifiziert werden, sondern auch neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Xanthohumol C bzw. den ENDFs gefunden werden. Bisher gibt es keine fundierten Anhaltspunkte, wieso die offenkettige Prenylgruppe signifikant weniger neuro-aktiv wirkt, als der geschlossene Chromanring. Außerdem können auf diese Weise neue, neuro-aktive Verbindungen gefunden werden.

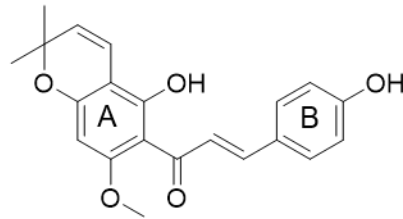


Abbildung 9: A- und B-Ring Beschriftung der Flavonoidstruktur am Beispiel von Xanthohumol C

Grundlage für diese Untersuchungen ist die Synthese von diversen neuen Flavonoid-Molekülen. Dabei sollen unterschiedliche Moleküle als spätere A- und B-Ringe (vgl. Abbildung 9) separat synthetisiert und anschließend über eine basenkatalysierte Aldolkondensation zusammengefügt werden. Die gereinigten Substanzen sollen bei Kooperationspartnern in Salzburg an der Paracelsus-Medizinischen-Privatuniversität in einem dualen Luciferase-Reporterprotein-Assay [137,138] auf embryonischen Vorderhirnzellen der Maus auf die getestet werden. Verwendet werden eine Firefly-Luciferase und eine Renilla-Luciferase. Während die Firefly-Luciferase die Bildung von neuen Nervenzellen darstellt, zeigt die Aktivität der Renilla-Luciferase die Menge an neu-gebildeten Neuronen an. Somit kann nicht nur die Entstehung der Nervenzellen angezeigt werden, sondern auch die Toxizität der Substanzen auf die Stammzellen ermittelt werden. Letzteres ist wichtig, da eine Substanz nur als geeignet eingestuft werden kann, wenn diese nicht zu toxisch auf die Zellen wirkt.

### 3 Untersuchung der Cyclodextrin-Einschlussverbindungen

#### 3.1 Hintergrund

Die Lebenserwartung der Menschen in der Europäischen Union ist laut dem Bericht 2015 des World Economic Forums allein in den letzten 20 Jahren um drei Jahre gestiegen. Dieser Trend wird voraussichtlich auch in den nächsten Jahren anhalten: Damit steigen wohl auch die Probleme, die eine überalterte Gesellschaft mit sich bringt. Dazu zählen unter anderem Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Demenz, deren Ursache hauptsächlich dem Alter zugeschrieben werden. Folglich steigt mit der erhöhten Lebenserwartung auch die Zahl dieser Patienten. Bis dato konnte jedoch kein marktreifes Medikament hergestellt werden, welches diese Krankheiten besiegen könnte. Lange wurde angenommen, dass man den Verlust von Nervenzellen nicht aufhalten und erst recht nicht umkehren kann. Diese Meinung wurde in den letzten Jahren durch die Forschung revidiert. So wurde bereits nachgewiesen, dass sich auch im erwachsenen Gehirn im Hippocampus aus adulten neuronalen Stammzellen Nervenzellen bilden können [139]. Diese Tatsache öffnet für die Heilung von Nervenkrankheiten eine neue Therapiemöglichkeit, indem Stoffe, welche die Neurogenese auslösen können, gezielt als Wirkstoff eingesetzt werden. Eine natürliche Klasse dieser Substanzen stellen die Prenylflavonoide Xanthohumol C, Xanthohumol A und Iso-Xanthohumol C des Hopfens dar. Es wurde in früheren Arbeiten bereits nachgewiesen, dass diese Stoffe die Differenzierung von Nervenzellen auslösen [140], neuroprotectiv [141] sowie neuroregenerativ [142] wirken. In einer tiefgehenden Studie wurde gezeigt, dass das Hopfenflavonoid Xanthohumol C die stärkste bisher beobachtete Wirkung beim Auslösen der Differenzierung von neuronalen Stammzellen aufweist. Dieses Chalkon induzierte nicht nur die Neurogenese, Neuroregeneration und wirkt neuroprotektiv, sondern schützte auch PC12 Zellen vor Cobaltchlorid-induziertem Zelltod [33].

Aufgrund der Chalkonstruktur und der daraus resultierenden geringen Wasserlöslichkeit ergibt sich jedoch ein Problem für die Bioverfügbarkeit und damit verbunden auch für weitere *in vivo* Tests. Unpolare Verbindungen können nur schlecht in die wasserbasierten Körperflüssigkeiten lebender Individuen verabreicht werden. Intravenöse Gaben möglicher Testverbindungen sollten sich im Blut lösen, damit die Verteilung im gesamten Organismus gewährleistet ist. Orale Verabreichung der Verbindungen eignen sich in diesem Fall nur schlecht, da bereits gezeigt werden konnte, dass Prenylflavonoide wie Xanthohumol im Verdauungstrakt metabolisiert werden, damit nicht mehr in ihrer ursprünglichen Form vorhanden sind und so nicht mehr wirksam sind [36]. Eine gängige Methode um dieses Problem bei schlecht wasserlöslichen Substanzen zu umgehen, ist der Einschluss in Trägermoleküle, wie beispielsweise Cyclodextrin [143-150]. Hierbei handelt es sich um natürlich vorkommende,

ringförmige Zucker, die aus sechs, sieben oder acht  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verbundenen Glucose Einheiten bestehen. Die Anzahl der Glucose Einheiten ist namensgebend für das jeweilige Cyclodextrin, folglich bezeichnet man diese als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine. Durch die variierende Anzahl an Zuckereinheiten verändert sich der Durchmesser des Hohlraums im Inneren, sodass mit steigender Größe auch größere Moleküle eingeschlossen werden können. Die besondere Eigenschaft der Cyclodextrine ist die unpolare Höhle im Inneren. Hierin lassen sich lipophile Substanzen einschließen, während der daraus resultierende Komplex trotzdem wasserlöslich bleibt. Dieser Einschlusseffekt beruht auf Enthalpie- sowie Entropiegewinn. Im Normalzustand befinden sich Wassermoleküle in der inneren Kavität. Durch den Einschluss einer apolaren Verbindung verdrängt diese Substanz das Wasser, wodurch viele Wassermoleküle frei werden. Somit erhöht sich die Entropie. Außerdem wird die unpolare Substanz von der polaren Umgebung des Wassers abgeschirmt, was zu einem Entropiegewinn führt (vgl. Abbildung 10).

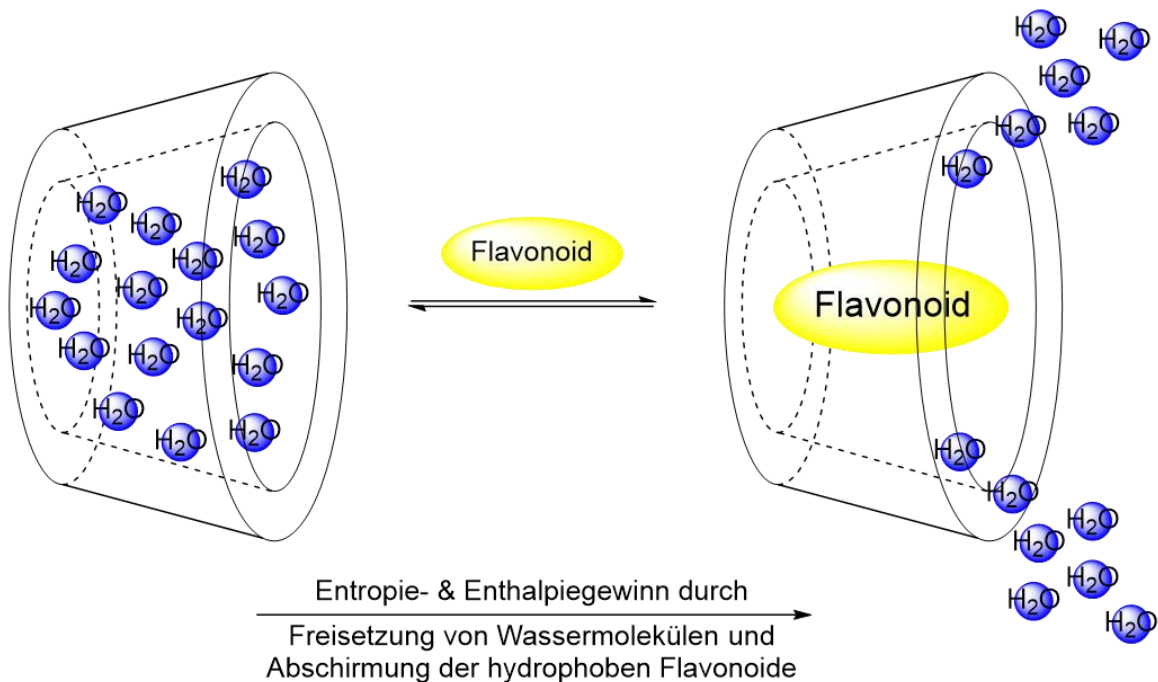
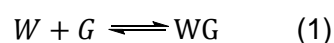


Abbildung 10: Darstellung des Entropie- und Enthalpiegewinns durch den Einschluss am Beispiel von Flavonoiden in Cyclodextrine.

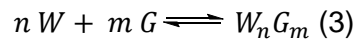
Zusätzlich begünstigt sich der Einschluss einer Substanz, die mit dem Wirtsmolekül Cyclodextrin Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann. Durch diesen Effekt können auch stärker polare Verbindungen in die Kavität eingelagert und der Komplex so stabilisiert werden. Allgemein lässt sich für einen Einschluss in Komplexe folgende Gleichung aufstellen:



wobei W für das Wirtsmolekül Cyclodextrin und G für das Gastmolekül steht. Daraus lässt sich die Gleichung der Stabilitätskonstante  $K_c$  berechnen:

$$K_c = \frac{[WG]}{[W][G]} \quad (2)$$

Aufgrund der unterschiedlichen Komplex-Zusammensetzungen durch unterschiedliche Anzahl an Wirt- oder Gastmoleküle muss die Formel um die Anzahl der beteiligten Reaktionspartner erweitert werden:



woraus die allgemeine Komplexbildungskonstante  $K_{m:n}$  angegeben werden kann:

$$K_{m:n} = \frac{[WG]}{[W]^n [G]^m} \quad (4)$$

Beim Einschluss von Moleküle in Cyclodextrin existieren zwei Arten von Komplexe, die sich in der Löslichkeit des Produkts unterscheiden. Dabei unterteilt man die Einschlusskomplexe in solche, bei denen die Löslichkeit des Produkts höher ist als bei der reinen Gastsubstanz und solche, bei denen die Löslichkeit des Komplexes im Vergleich zur reinen Gastsubstanz abnimmt. Im Phasendiagramm, bei dem die eingesetzte Cyclodextrinkonzentrationen gegen die Konzentration der Gastsubstanz aufgetragen wird, unterscheiden sich beide Komplextypen signifikant. Während Komplexe, deren Löslichkeit größer ist als die der Gastverbindung, nach *Higuchi und Connors* auch Komplextyp A genannt [151], eine positive Steigung aufweisen, nimmt die Steigung bei den weniger löslichen Komplexen (Komplextyp B) ab (vgl. Abbildung 11). Der Komplexyp A kann noch in drei Unterkategorien  $A_{\text{positiv}}$  ( $A_P$ ),  $A_{\text{linear}}$  ( $A_L$ ) und  $A_{\text{negativ}}$  ( $A_N$ ) unterteilt werden. A-Kurven mit linearer Steigung liegen vor, wenn sich Komplexe bilden, die nur ein Wirtsmolekül (W) aber ein oder mehr Gastmoleküle (G) pro Komplexeinheit aufweisen ( $WG$ ,  $WG_2$ ,  $WG_3$ , usw.). Komplexe vom Typ  $A_L$  haben also ein Wirtsmolekül, mit dem ein oder mehrere Gastmoleküle wechselwirken können. Der Typ  $A_P$  beschreibt Komplexe, die pro Gastmolekül mehrere Wirtsmoleküle enthalten ( $W_2G$ ,  $W_3G$ , usw.). Folglich wechselwirkt ein Gastmolekül mit mehreren Wirtsmolekülen. Der Typ  $A_N$  tritt hauptsächlich bei Effekten mit Lösungsmitteln oder bei der Selbstaggregation auf.

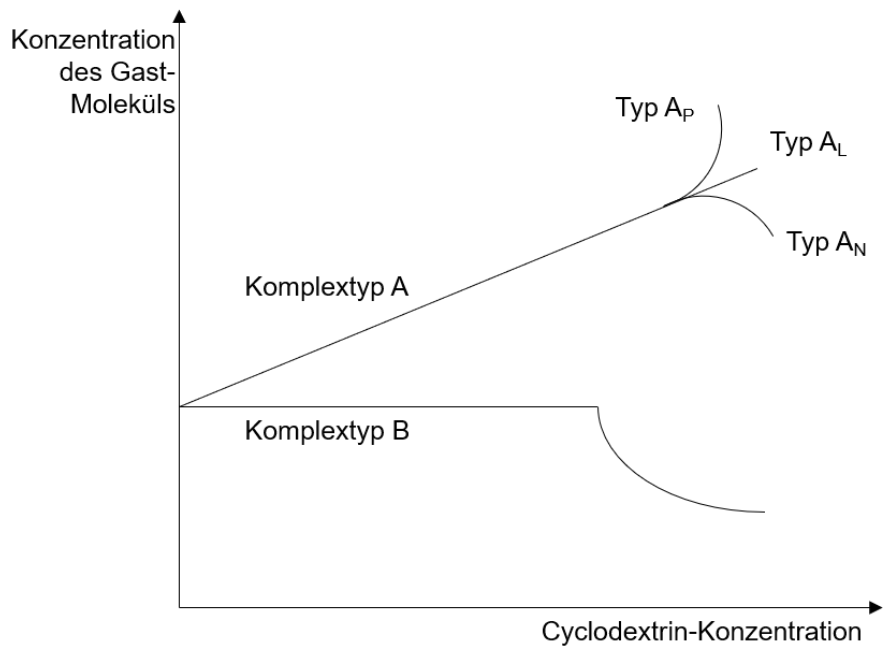


Abbildung 11: Beispielhaftes Phasendiagramm der Komplextypen A und B nach *Higuchi und Connors [151]*.

Um die Bildungskonstante der Komplexe aus dem Phasendiagramm des entsprechenden Komplexierungsvorgangs zu bestimmen, kann Gleichung (4) herangezogen werden.

$$[G] = G_0 \quad (5)$$

$$[G]_t = G_0 + m[W_n G_m] \quad (6)$$

$$[W]_t = [W] + n[G_m W_n] \quad (7)$$

wobei  $G_0$  die Löslichkeit der Gastsubstanz im Gleichgewicht,  $[G]_t$  die totale Konzentration des Gastmoleküls und  $[W]_t$  die totale Konzentration des Cyclodextrins darstellt. Die Werte von  $[G_m W_n]$ ,  $[G]$  und  $[W]$  lassen sich wie folgt berechnen:

$$[G] = G_0 \quad (5)$$

$$[G_m W_n] = \frac{[G]_t - G_0}{m} \quad (8)$$

$$[W] = W_t - n[G_m W_n] \quad (9)$$

Für Phasendiagramme der ersten Ordnung bezüglich der Cyclodextrinkonzentration ( $n = 1$ ) und Einsetzen der Gleichungen (5), (8) und (9) in (4) ergibt sich nach dem Auflösen nach der totalen Gastkonzentration folgende Gleichung.

$$[G]_t = \frac{mK G_0^m [W]_t}{1 + K G_0^m} + G_0 \quad (10)$$

Aufgrund der oben beschriebenen Tatsache, dass Komplexe in erster Ordnung der Cyclodextrinkonzentration ( $WG$ ,  $WG_2$ ,  $WG_3$ , usw.) lineare Zusammenhänge ergeben, kann der y-Achsenabschnitt des Graphen als  $G_0$  und die Steigung wie folgt ausgedrückt werden:

$$\text{Steigung} = \frac{mKG_0^m}{1+KG_0^m} \quad (11)$$

Diese allgemeine Gleichung kann im einfachsten Fall der Komplexbildung, ein Wirtsmolekül schließt ein Gastmolekül ein, nochmal vereinfacht werden. Bei diesen 1:1-Komplexen gilt dann  $m = 1$ , woraus sich die Formel zur Berechnung der Bildungskonstante dieser Komplexe ergibt:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Steigung}}{S_0(1-\text{Steigung})} \quad (12) \quad [151,152]$$

Diese Formel kann offensichtlich nur bei 1:1-Komplexen angewandt werden. Da jedoch alle Komplexe in erster Ordnung der Wirtssubstanz ( $WG$ ,  $WG_2$ ,  $WG_3$ , usw.) lineare Kurven im Phasendiagramm aufweisen, muss nachgewiesen sein, dass exakt eine 1:1-Zusammensetzung vorliegt. Dies kann nach Ravelet *et al.* durch HPLC-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Cyclodextrin bestimmt werden. Dabei wird immer dieselbe Menge an Gastmolekül in das System injiziert und die Retentionszeit der Probe ermittelt. Durch das Ansteigen der Cyclodextrinkonzentration im Laufmittel verringert sich die Retentionszeit der Substanz. Daraus (vgl. Gleichung 13) werden mit Hilfe der Totzeit  $t_0$  des Geräts die Kapazitätsfaktoren  $k'$  der einzelnen Messungen bestimmt.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (13)$$

Trägt man nun die reziproken Kapazitätsfaktoren gegen die Cyclodextrinkonzentration auf, kann man hieraus Rückschlüsse auf die Komplexstöchiometrie ziehen. Im Fall der 1:1-Komplexierung ergibt sich ein linearer Zusammenhang [153].

Neben den nicht substituiert vorkommenden Cyclodextrinen existiert noch eine Vielzahl von modifizierten Cyclodextrinen [154]. Diese Modifikationen sollen die Eigenschaften der Wirtssubstanz bezüglich Wasserlöslichkeit, Größe der Kavität und Bioverfügbarkeit verbessern. Die pharmazeutisch am häufigsten verwendeten Cyclodextrine sind die Hydroxypropylderivate (HP) von beta- und gamma-Cyclodextrin, Methyl-beta-Cyclodextrin und Sulfobutylether-beta-Cyclodextrin [143]. Für diese Arbeit wird nur 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin (HP-beta-CD) verwendet, da dieses Cyclodextrin bereits in vielen medizinischen Anwendungen sowohl über die orale [155] als auch für die intravenöse [156] Verabreichung eingesetzt wird. Außerdem gibt es bereits zahlreiche medizinische Präparate, die auf dem Einschluss von 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin beruhen [157]. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin ergibt sich durch die erhöhte Wasserlöslichkeit im Vergleich

zu unsubstituiertem Cyclodextrin. Somit ist auch der Einschlusskomplex wasserlöslicher, wodurch sich auch die Bioverfügbarkeit erhöht, was eine Verabreichung *in vivo* begünstigt [146]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich bei der Aufnahme in Zellen von Cyclodextrinkomplexe ein Gleichgewicht zwischen komplexierter und freier Substanz einstellt. Dadurch liegt die Substanz in der Zelle besser gelöst vor und kann so seine Wirksamkeit entfalten. Aus diesem Grund führt der Einschluss in der Regel nicht zu einer Verringerung der biologischen Aktivität [158].

### **3.2 Bestimmung der Löslichkeit von Xanthohumol C**

Um die oben genannte niedrige Wasserlöslichkeit von Flavonoiden wie Xanthohumol C zu verbessern, wurden Experimente durchgeführt, die sowohl die maximale Löslichkeit der Verbindung in reinem Wasser, als auch in unterschiedlich konzentrierten Cyclodextrinlösungen aufzeigt. Es wurden sowohl Untersuchungen bei verschiedenen niedrigen Konzentrationen (0,14 – 5,7 mmol/L) als auch bei einer hohen Cyclodextrinkonzentration (50 mmol/L) durchgeführt. Die Konzentration 50 mM wurde gewählt, da es sich um eine noch gut lösliche Menge Cyclodextrin in Wasser handelt. Lösungen mit höheren Cyclodextrinkonzentrationen werden recht schnell stark viskos und sind damit für Anwendungen in *in vivo* Tests schlecht praktikabel. Abbildung 12 zeigt die Erhöhung der maximalen Löslichkeit von Xanthohumol C in Abhängigkeit der eingesetzten Cyclodextrinkonzentration. Die Kurve weist eine positive Steigung auf. Dies bedeutet, dass der resultierende Einschlusskomplex eine höhere Wasserlöslichkeit im Vergleich zur Reinsubstanz aufweist.



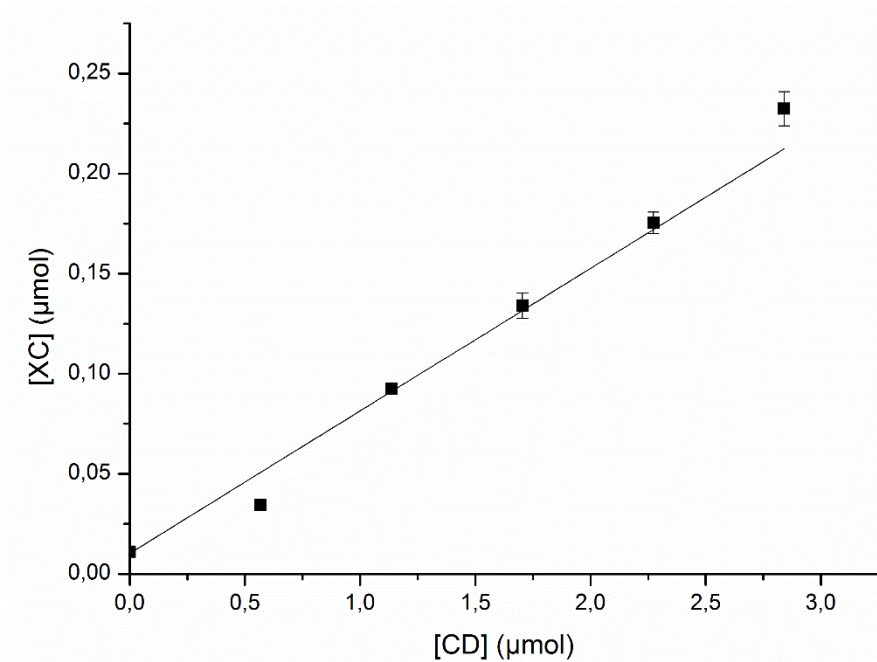


Abbildung 12: Löslichkeitsdiagramm von Xanthohumol C (XC) gegen verschieden konzentrierte Cyclodextrinlösungen (CD). Die Messungen wurden als Triplikat durchgeführt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Nach der Definition von *Higuchi und Connor* fällt Xanthohumol C in HP- $\beta$ -Cyclodextrin in den Fall  $A_L$ , was bedeutet, dass es sich um einen 1:1 Komplex oder Komplexe höherer Ordnung des Gastmoleküls handelt. Es wechselwirkt demnach ein Cyclodextrinmolekül mit einem oder mehreren Flavonoidmolekülen. Um die Stöchiometrie des Komplexes aufzuklären, kann man die Verschiebung der Retentionszeit von Xanthohumol C in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bei unterschiedlichen Cyclodextrinkonzentrationen untersuchen [159]. Hierzu wird ein isokratischer Fluss mit ausreichend Anteil (60 % Wasser/40 % Acetonitril) an organischem Laufmittel gewählt, sodass sich Xanthohumol C von der Säule eluieren lässt.

Bei den weiteren Messungen wird das Ausgangslaufmittel mit verschiedenen Cyclodextrinkonzentrationen versetzt. Getestet wurden Konzentrationen von 0 mmol/L bis 50 mmol/L Cyclodextrin (vgl. Abbildung 13).

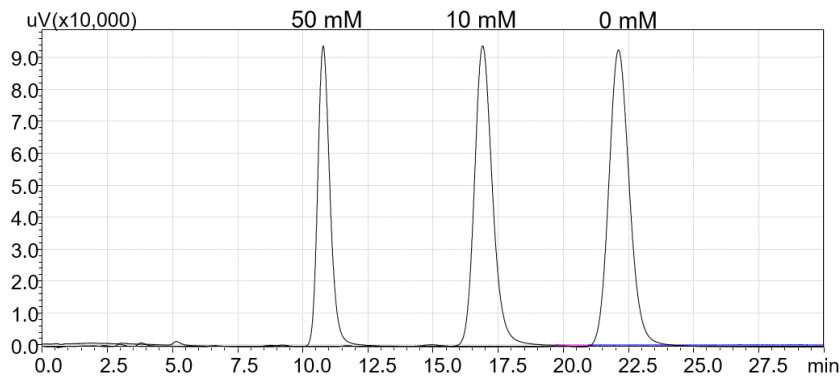


Abbildung 13: Reduzierung der Retentionszeit von Xanthohumol C durch Erhöhung der Cyclodextrinkonzentration (0 – 50 mmol/L) in der Hochdruckflüssigchromatographie mit isokratischem Fluss bei 30°C.

Erwartungsgemäß verringert sich bei jeder Erhöhung der Cyclodextrinkonzentration die Retentionszeit von Xanthohumol C. Zu Beginn wurde nur ein Wasser-Acetonitril-Gemisch als Laufmittel (0 mmol/L Cyclodextrin) eingesetzt. Es resultierte eine Retentionszeit von 20.18 min. Die Retentionszeit verringerte sich Schritt für Schritt bis zu 11.00 min bei 50 mmol/L Cyclodextrinkonzentration. Diese Wanderung des Xanthohumol C Peaks im Chromatogramm kann man in Abbildung 13 erkennen. Die Retentionszeit von Xanthohumol C wird also stark vom Cyclodextrin beeinflusst. Im ersten Versuch – ohne Zugabe von Cyclodextrin – hängt die Wanderung und damit der Zeitpunkt der Elution des Flavonoids nur von den Wechselwirkungen der Substanz auf der Säule und der Löslichkeit im Laufmittel ab. Durch den Zusatz von Cyclodextrin kommt eine dritte Komponente ins System, die ebenfalls das Laufverhalten auf der Säule beeinflusst. Wenn Xanthohumol C mit Cyclodextrin wechselwirkt, ändert sich dadurch die Retentionszeit. Wie durch die Löslichkeitsdiagramme (vgl. Abbildung 12) bereits gezeigt werden konnte, erhöht Cyclodextrin die Löslichkeit von Xanthohumol C. Dadurch steigt die Affinität des Flavonoids zum Laufmittel und reduziert dadurch die Verweilzeit auf der Säule, was in einer kürzeren Retentionszeit resultiert. Theoretisch wäre es möglich, die Retentionszeit noch weiter zu reduzieren. In der Praxis ist dies aber aufgrund der kontinuierlich steigenden Viskosität der immer höher konzentrierten Cyclodextrinlösungen nicht möglich. Die Cyclodextrinkonzentration 50 mmol/L stellt die höchste noch praktikabel handhabbare Konzentration dar.

Durch diesen Versuch lässt sich bei Kurven des  $A_L$ -Typs die Stöchiometrie des Komplexes bestimmen [153]. Hierfür werden aus den Retentionszeiten ( $t_R$ ) der einzelnen Messungen und der Totzeit des Geräts ( $t_0$ , 1.39 min) die Kapazitätsfaktoren  $k'$  berechnet. In Abbildung 14 sind Werte von  $k'$  gegen die eingesetzte Stoffmenge an Cyclodextrin dargestellt.

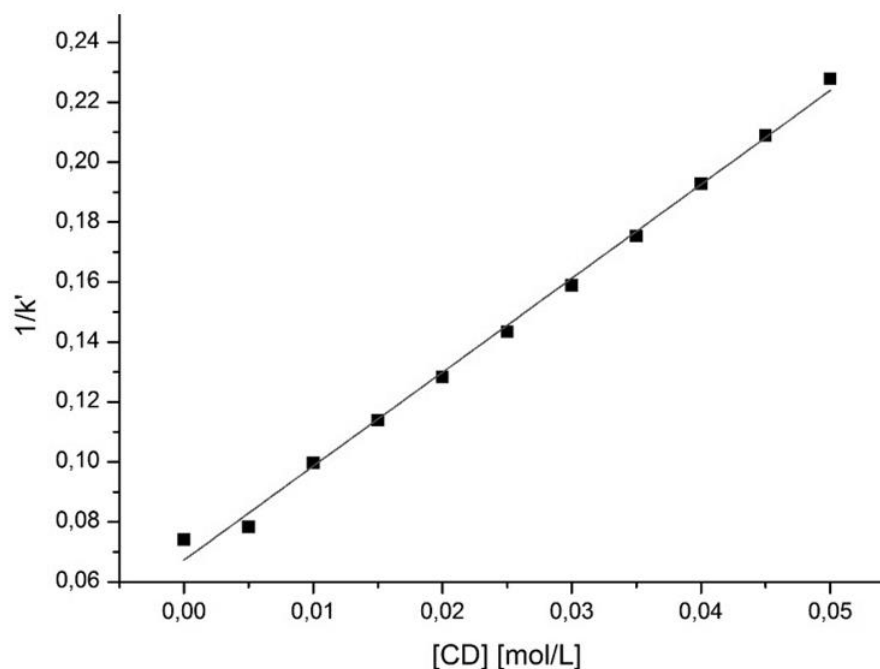


Abbildung 14: Auftragung der inversen Kapazitätsfaktoren  $k'$  gegen die eingesetzten Cyclodextrinkonzentrationen.

Abbildung 14 zeigt das Diagramm der Messpunkte, die auf einer Geraden liegen ( $R^2 = 0.997$ ). Laut Ravelet *et al.* liegt ein 1:1 Komplex vor, wenn die Abhängigkeit der reziproken Kapazitätsfaktoren zu der dazugehörigen Cyclodextrinkonzentration linear verläuft [153]. Somit scheint die Komplexzusammensetzung von Xanthohumol C und HP- $\beta$ -CD als 1:1 Komplex plausibel [159]. Nun kann mit Hilfe der Gleichung 12 die Bildungskonstante  $K_{1:1}$  bestimmt werden ( $22 \text{ M}^{-1}$ ).

Vergleicht man nun die Konzentration von Xanthohumol C in destilliertem Wasser und 50 mmol/L HP- $\beta$ -Cyclodextrin (Abbildung 15), so ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Löslichkeit. In Wasser beträgt die maximale Löslichkeit von Xanthohumol C  $2.2 \mu\text{g/mL} \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ , was in guter Näherung zu der bereits beschriebenen Löslichkeit der sehr ähnlichen Verbindung Xanthohumol ( $4 \mu\text{g/mL}$ ) liegt [160]. Durch die Formulierung mit Cyclodextrin konnte die Löslichkeit um über das 650-fache auf  $1300 \mu\text{g/mL} \pm 120 \mu\text{g/mL}$  gesteigert werden. Diese starke Erhöhung ermöglicht den Einsatz dieses Einschlusskomplexes für *in vivo* Experimente.

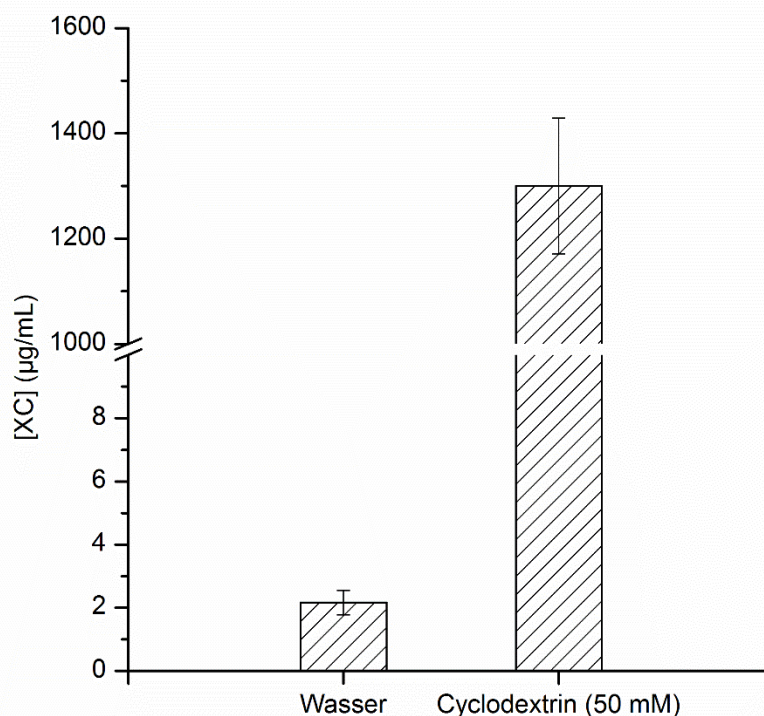


Abbildung 15: Vergleich der maximalen Löslichkeit von Xanthohumol C in Wasser und 50 mM HP- $\beta$ -Cyclodextrinlösung. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung und die Standardabweichung der Messung.

### 3.3 Chemisch-analytische Charakterisierung des Einschlusskomplexes

Die Erhöhung der Löslichkeit durch Zugabe von Cyclodextrin im Vergleich zur maximalen Löslichkeit des Flavonoids in Wasser zeigt, dass Substanz und Cyclodextrin miteinander interagieren. Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, wie beide Verbindungen miteinander interagieren können: Es ist zum einen ein klassischer Einschlusskomplex denkbar, bei dem sich das Flavonoid im inneren des Hohlraums befindet. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass sich das Flavonoid nur oberflächlich an den Zucker anlagert und die Löslichkeit durch diese Adsorption erhöht wird [161].

Eine Methode zur Überprüfung ob es sich um einen Einschlusskomplex oder um einen Anlagerungskomplex handelt, ist die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC). Die DSC ist eine Methode zur thermischen Analyse von Substanzen. Dabei wird die aufgenommene oder abgegebene Wärmemenge bei Temperaturänderungen der Probe analysiert. Diese ist äquivalent zu den Änderungen des Aggregatzustands und anderer Phasenübergänge, folglich kann man Schmelz-, Siede- oder Sublimationspunkte der Verbindung sichtbar machen. Diese Methode eignet sich besonders dazu, Einschlusskomplexe zu analysieren, da sich die thermischen Daten der eingeschlossenen Substanz von denen der freien Substanz unterscheiden, weil keine zusammenhängenden Phasen von diesen vorliegen. Bei den komplexierten Verbindungen liegen keine akkumulierten Molekülphasen wie Kristalle oder

Körner vor. Dadurch können sich Schmelz-, Siede- oder Sublimationspunkt im Vergleich zur Reinsubstanz verschieben oder komplett verschwinden [162].

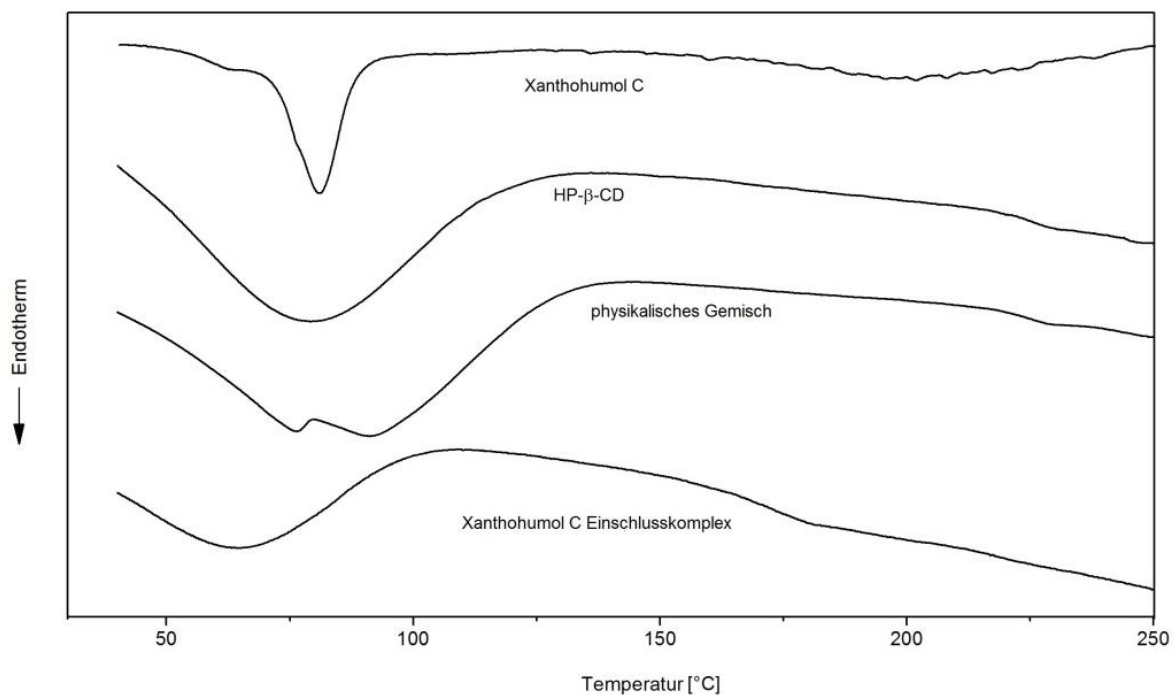


Abbildung 16: Dynamische Differenzkalorimetrie Thermogramm mit Xanthohumol C, 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin, physikalischem Gemisch und Einschlusskomplex

Abbildung 16 zeigt das Thermogramm der DSC Messungen. Man erkennt in der ersten Kurve bei reinem Xanthohumol C einen Phasenumwandlungspunkt bei ca. 75°C. Reines Cyclodextrin (Kurve 2) besitzt auch im festen Zustand Wasser, das sich in der Kavität im inneren des Rings befindet. Im Bereich von 50-90°C verdampft langsam das eingelagerte Wasser, wodurch es zu einer vorübergehenden Verringerung der Enthalpie kommt. Das physikalische Gemisch beider Substanzen (Kurve 3) ist eine trocken zusammengesetzte Mischung aus Cyclodextrin und Xanthohumol C als Pulver. Es dient als Referenz, da es sich hierbei um keinen Einschluss, sondern nur um beide Komponenten als einfache Mischung fester Phasen handelt. Eine Einschlussverbindung kann man nur in Lösung herstellen, nicht aber beim trockenen Vermengen. Diese Kurve zeigt nun alle spezifischen Charakteristika von Xanthohumol C und Cyclodextrin. Man erkennt sowohl den Phasenumwandlungspunkt des Flavonoids, als auch den Verlust des Kristallwassers vom Cyclodextrin. In Kurve 4 erkennt man bei der Messung des Komplexes jedoch nur noch die Charakteristika des Cyclodextrins, also den Verlust des Kristallwassers. Die Peaks von Xanthohumol C sind komplett verschwunden. Dies spricht dafür, dass sich die Substanz im Inneren der Kavität befindet. Da keine thermischen Daten von Xanthohumol C detektiert werden konnten, lässt sich das Vorhandensein einer eigenen Xanthohumol C-Phase ausschließen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden massenspektrometrische Untersuchungen mit dem Komplex am Flugzeitmassenspektrometer mit Ionenfalle durchgeführt. Ziel war es, sowohl natives HP- $\beta$ -CD als auch den Einschlusskomplex zu analysieren. Es wurden Lösungen von Cyclodextrin und dem zu untersuchendem Komplex ohne Trennsäule direkt in das Gerät gegeben. Das direkte Einspritzen eignet sich besonders bei Reinsubstanzen, da hier keine vorgeschaltete säulenchromatographische Trennung benötigt wird. Untersucht wurden wässrige Lösungen des reinen HP- $\beta$ -CDs und des Xanthohumol C-Cyclodextrin-Komplexes (XC@HP- $\beta$ -CD).

Da die Massen von freiem Cyclodextrin und Einschlusskomplex unterschiedlich sind, können beide Verbindungen analysiert und charakterisiert werden. Als Ionisierung wurde die Elektronenspray Ionisation (ESI) gewählt (Temperatur 175 °C, 3.5 kV). Die Elektronenspray Ionisation ist eine sehr sanfte Methode, um Moleküle im Massenspektrometer zu ionisieren. Dadurch lassen sich auch nicht-kovalent gebundene Einschlusskomplexe zerstörungsfrei ionisieren und somit im Massenspektrometer sichtbar machen [163]. Käufliches HP- $\beta$ -CD stellt immer ein Gemisch aus vielen unterschiedlich substituierten Cyclodextrinen dar. Aufgrund der unselektiven Synthese des Cyclodextrins mit Propenoxid entsteht nicht ein spezifisches HP- $\beta$ -CD. Viel mehr liegt eine große Variation von unterschiedlich substituierten Cyclodextrinen vor. Auch die Position, an der die Hydroxypropylgruppe hängt, kann variieren. Durch die Zyklisierung der sieben Glucoseeinheiten im Cyclodextrin sind die Positionen 1 und 4 der Zuckereinheiten blockiert. Die Positionen 2,3 und 6 jedoch sind frei und somit mögliche Stellen für eine Substitution mit der Hydroxypropylgruppe (vgl. Abbildung 17) [164].

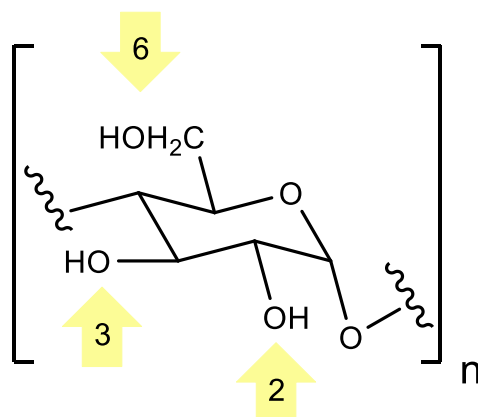


Abbildung 17: Position der freien Hydroxygruppen in Cyclodextrin. Bei HP- $\beta$ -Cyclodextrin ist  $n = 7$ .

Die Synthese ist nicht nur unspezifisch bezüglich der Position, an der Propenoxid angreift, sie ist auch unspezifisch was die Anzahl der bindenden Gruppen betrifft. So ist es durchaus möglich, dass an den sieben Glucosemolekülen im HP- $\beta$ -CD unterschiedlich viele Hydroxypropylgruppen substituieren. Folglich entsteht eine Vielzahl von unterschiedlichen Cyclodextrinen mit variierenden molaren Massen. Diese verschieden substituierten

Cyclodextrine können mittels Elektronenspray Ionisierung im Massenspektrometer detektiert werden (Abbildung 18). Als häufigste Spezies konnte der siebenfach Hydroxypropyl-substituierte Zucker mit  $m/z$  793 identifiziert werden. Dieses siebenfach substituierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Derivat besitzt eine molare Masse von 1540. Beim detektierten  $m/z$  793 handelt es sich um das doppelt geladene Natriumaddukt des Moleküls ( $[\text{CD-Na}]^{2+}$ ). Zudem konnten vier- bis zehnfach substituierte Cyclodextrine in abnehmender Intensität beobachtet werden.

Die Peaks der unterschiedlich substituierten Zucker verteilen sich Gauß-förmig um die am höchsten konzentrierte Spezies mit sieben Hydroxypropylgruppen.. Die einzelnen Peaks unterscheiden sich um  $m/z$  29, was jeweils eine doppelt geladene Hydroxypropylgruppe darstellt.

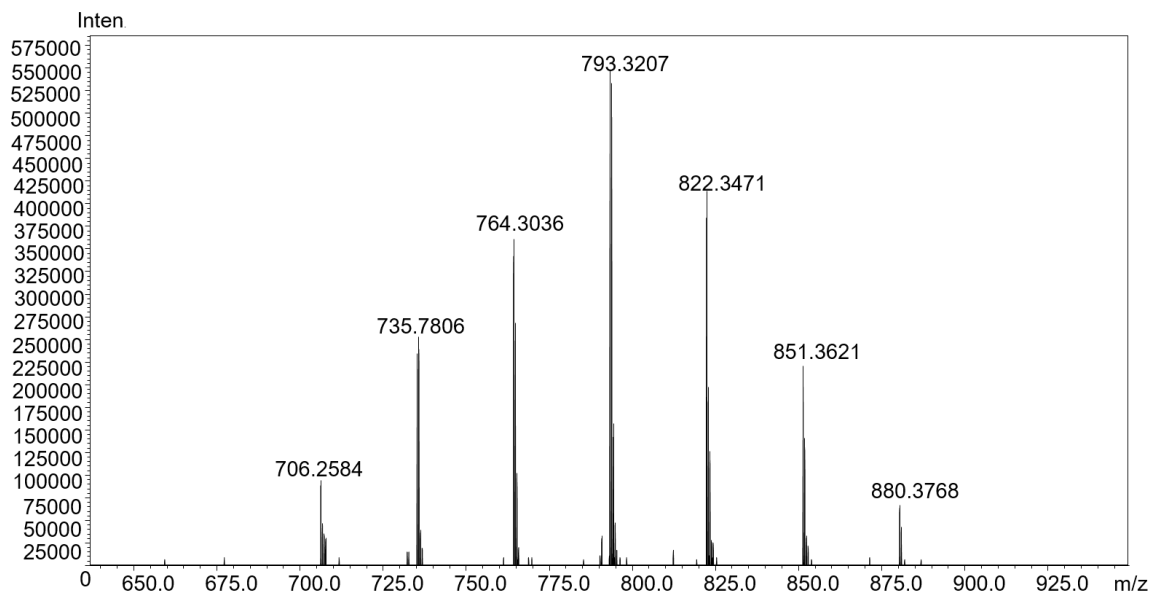


Abbildung 18. Massenspektrum von 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin gemessen über den Infusion Modus in Wasser.

Betrachtet man nun das Massenspektrum des Xanthohumol C Einschlusskomplexes (vgl. Abbildung 19) fällt auf, dass man nicht nur die Peaks des Komplexes erkennt, sondern daneben auch Peaks von freiem, nicht komplexiertem Cyclodextrin vorliegen. Die Massen der im Komplex vorliegenden freien, nicht komplexierten Cyclodextrin-Derivaten sind bei beiden Messungen (Reinsubstanz Cyclodextrin Abbildung 18, Einschlusskomplex Abbildung 19) identisch. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von nicht-komplexierten Cyclodextrin ist die Herstellungsweise des Komplexes. Dabei ist Cyclodextrin im Überschuss vorhanden, um eine komplette Komplexierung des Flavonoids zu erreichen. Das überschüssige Cyclodextrin kann jedoch nicht mehr abgetrennt werden, da die chemischen Eigenschaften vom Einschlusskomplex und vom nicht-komplexiertem Cyclodextrin nahezu identisch sind. Außerdem wäre es denkbar, dass durch die Ionisierung in der ESI Quelle nicht alle Komplexe unbeschadet ionisiert werden. Obwohl es eine sehr sanfte Ionisierungsmethode

darstellt, könnten einzelne Komplexe die Ionisierung nicht überstehen und auseinanderbrechen.

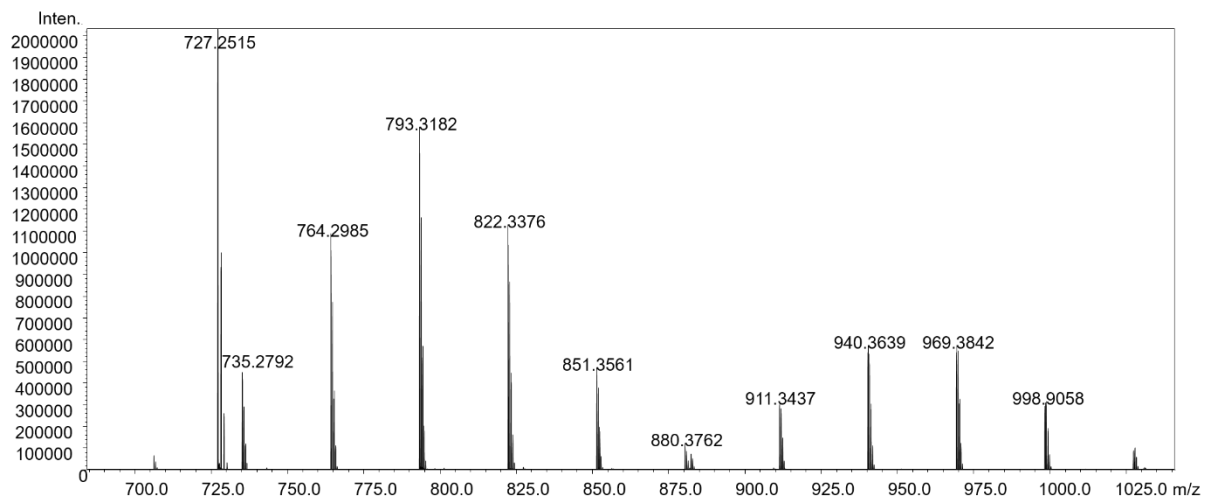


Abbildung 19. Massenspektrum von Xanthohumol C Einschusskomplex gemessen über den Infusion Modus in Wasser.

Die Peaks, die im Bereich von  $m/z$  911 bis  $m/z$  1027 detektiert werden, stammen vom Einschusskomplex. Diese Peaks unterscheiden sich – wie beim nicht-komplexierten Cyclodextrin vorher beschrieben – um  $m/z$  29, was den unterschiedlichen Substitutionsgrad des Zuckers aufzeigt. Zu jedem Peak des Einschusskomplexes kann man einen Peak vom leeren Cyclodextrin zuordnen, die sich jeweils um eine Differenz von  $m/z$  176 unterscheiden. Diese Masse entspricht der molaren Masse von Xanthohumol C ( $M = 352$ ). Der Einschusskomplex liegt – wie auch bei den Hydroxypropyleinheiten – als zweifach geladenes Molekül vor.



Tabelle 1: Zusammenfassung der Molekülpeaks aus den massenspektrometrischen Messungen von leeren Cyclodextrin und Xanthohumol-Einschlusskomplex. Die angegebenen Massen liegen als doppelt geladene Natriumaddukte von Cyclodextrin bzw. Einschlusskomplex vor.

HP-Einheiten	9	8	7	6	5	4
Molare Masse (CD)	1656	1598	1540	1482	1424	1366
Molare Masse (Komplex)	2008	1950	1892	1834	1776	1718
Cyclodextrin gemessen	850	822	793	764	735	706
Komplex gemessen	1027	998	969	940	911	880

Tabelle 1 zeigt den Zusammenhang zwischen den Massen des leeren Cyclodextrins und den dazugehörigen Xanthohumol C Einschlusskomplexen. Während das Spektrum von nicht komplexierten Cyclodextrin nur einen Maximumpeak mit sieben Hydroxypropylgruppen besitzt, zeigen die Maximumpeaks des Komplexes eine Substitution von sechs bzw. sieben Hydroxypropylgruppen. Dies könnte bedeuten, dass sich Xanthohumol C besser in sechsfach substituiertes Cyclodextrin einschließt als in die restlichen Zucker. Dies könnte bedeuten, dass sich aufgrund der geometrischen Änderung, die aus den unterschiedlichen Substitutionsmustern resultiert, ein besserer Einschluss möglich ist. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Maximum bei sechs Hydroxylgruppen auch durch eine gute Ionisierung in der ESI Quelle zustande kommen kann. Diese Fragestellung kann jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht hinreichend geklärt werden.

Bisher konnte gezeigt werden, dass Cyclodextrin die Löslichkeit von Xanthohumol C in Wasser stark erhöht. Die DSC-Messungen deuten darauf hin, dass ein Einschluss des Flavonoids in das Wirtsmolekül nachgewiesen werden. Der Komplex konnte im Massenspektrometer bestätigt werden. Nun stellt sich die Frage, wie Xanthohumol C im Cyclodextrin räumlich angeordnet liegt. Dafür kann die Kernspinresonanzspektroskopie Aufschlüsse liefern. Dabei vergleicht man die chemische Verschiebung von Protonen der Reinsubstanz Xanthohumol C (Zuordnung siehe Abbildung 20) mit den chemischen Verschiebungen der Substanz im Komplex [150,165-167].

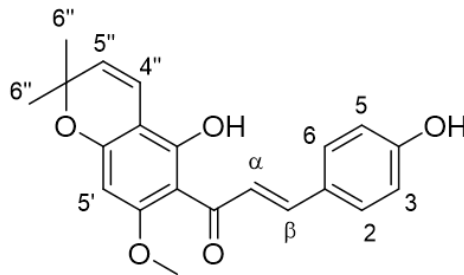


Abbildung 20: Struktur von Xanthohumol C mit Beschriftung der für die NMR-Auswertung relevanten Protonen.

Die Protonen, die im Inneren der Cyclodextrin-Kavität liegen, verschieben sich aufgrund der anderen chemischen Umgebung im Gegensatz zu den Protonen, die nicht mit dem Cyclodextrin interagieren. Dadurch ist es möglich, die räumliche Struktur des Einschlusses zu beschreiben. Da reines Xanthohumol C nur sehr schlecht wasserlöslich ist, kann man in reinem D<sub>2</sub>O nicht genug Flavonoid lösen, um ein <sup>1</sup>H Spektrum aufzunehmen. Da die Löslichkeit aber steigt, je basischer die wässrige Phase ist, kann man durch den Zusatz von deuteriertem Natriumhydroxid (NaOD) die Löslichkeit des Flavonoids steigern. Die NMR Messungen wurden aus diesem Grund in D<sub>2</sub>O mit 1 % NaOD gemessen. In diesem Lösungsmittel kann man ausreichende Mengen Xanthohumol C lösen. Außerdem ist auch der Komplex in diesem Lösungsmittel löslich.

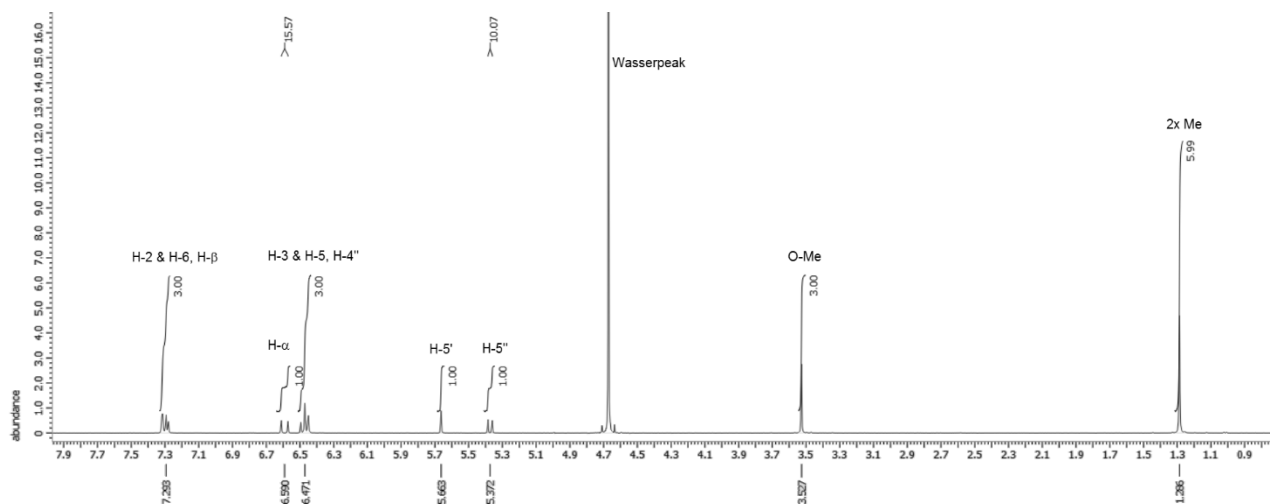
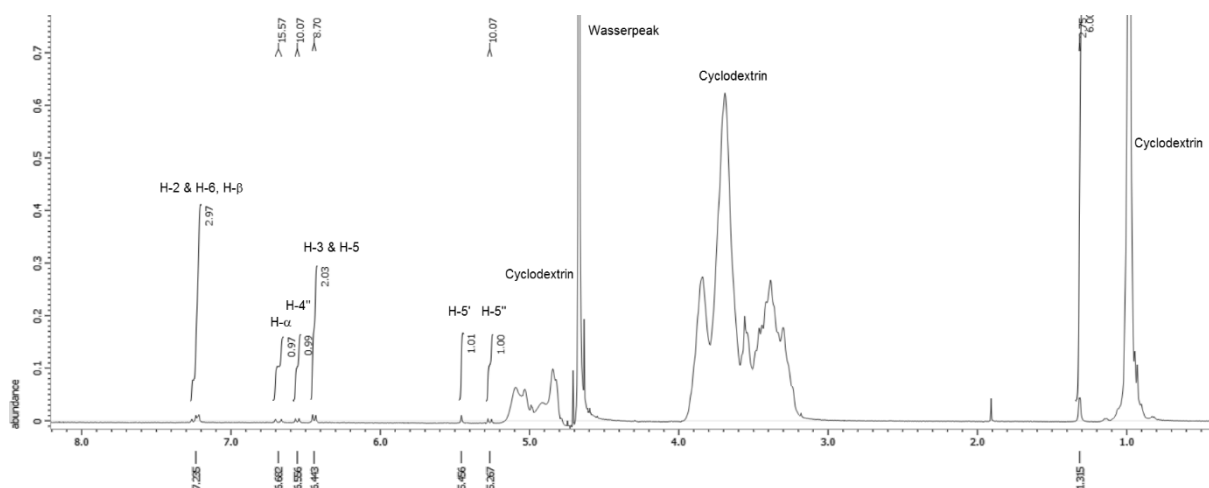
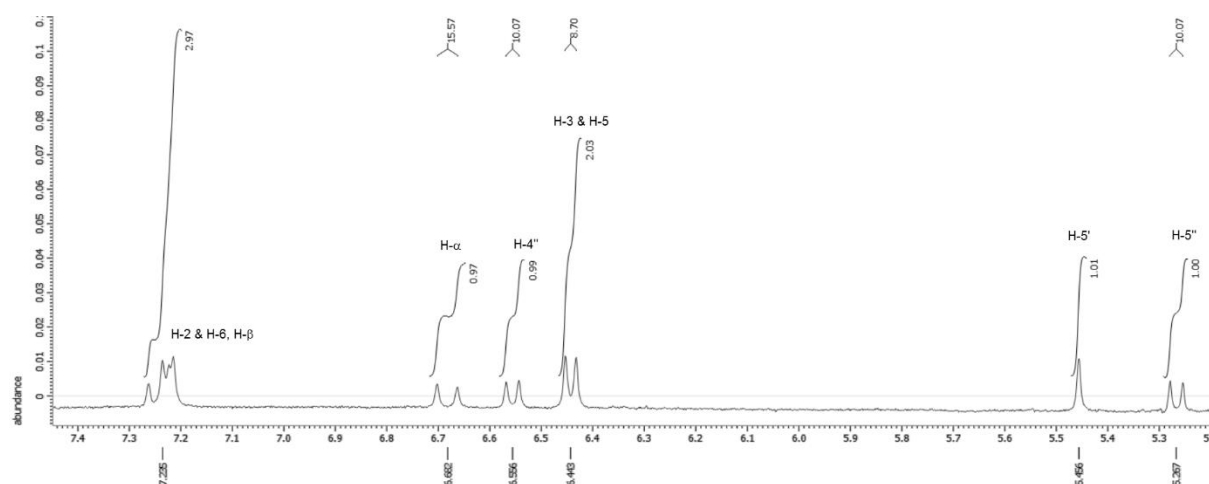


Abbildung 21: <sup>1</sup>H Spektrum von reinem Xanthohumol C in D<sub>2</sub>O mit 1 % NaOD.

Abbildung 21 zeigt das <sup>1</sup>H Spektrum von reinem Xanthohumol C. Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte über 2D-Spektren. Die Signale des Dupletts vom H-4'' und des Dupletts von H-3 & H-5 fallen zusammen und bilden ein Multiplett ( $\delta = 6.47$ ). Ebenso verhält es sich mit den Protonen von H- $\beta$  und H-2 & H-6 ( $\delta = 7.29$ ). Vergleicht man nun dieses Spektrum mit dem Spektrum des Xanthohumol C-Cyclodextrin-Komplexes in D<sub>2</sub>O (pH = 8) (Abbildung 22, Abbildung 23), so erkennt man zum Teil größere Unterschiede.

Abbildung 22:  $^1\text{H}$  Spektrum des Xanthohumol C Einschlusskomplexes in  $\text{D}_2\text{O}$  mit 1 % NaOD.Abbildung 23: Ausschnitt des  $^1\text{H}$  Spektrum des Xanthohumol C Einschlusskomplexes in  $\text{D}_2\text{O}$  mit 1 % NaOD.

Die chemische Verschiebung der Protonen H-3 & H-5 überlagert im Komplex nicht mehr mit dem Proton H-4''. Im Gegensatz dazu hat sich bei den Protonen H-2 & H-6 und H- $\beta$  nichts geändert, diese überlagern offenbar im Komplex immer noch. Auffällig ist auch die chemische Verschiebung der drei Dupletts von den Protonen H-3 & H-5, H-4'' und H- $\alpha$ , die im Vergleich zum Spektrum der Reinsubstanz weiter getrennt vorliegen. Der Grund hierfür ist die unterschiedlich große Verschiebung der einzelnen Peaks der Protonen des Komplexes durch die veränderte chemische Umgebung verglichen mit der Reinsubstanz.

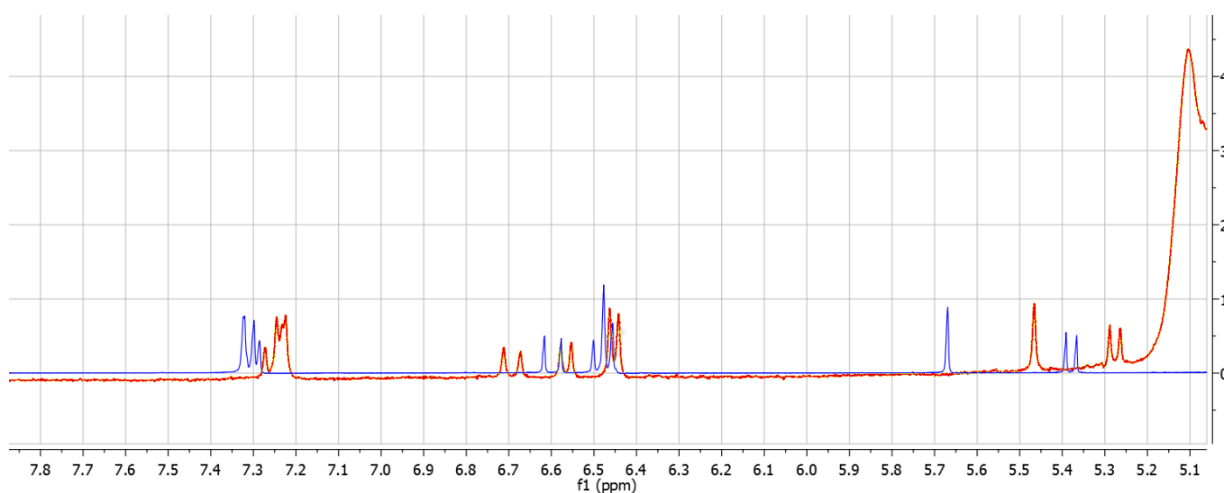


Abbildung 24: Überlagertes  $^1\text{H}$  Spektrum von Xanthohumol C (blau) und Einschlusskomplex Xanthohumol C in HP- $\beta$ -CD (rot). Der Ausschnitt zeigt nur die relevanten Peaks zwischen 5.1 und 7.5 ppm.

Wie man in Abbildung 24 erkennt, verschieben sich die einzelnen Peaks unterschiedlich stark in den beiden Spektren. Während sich die Protonen H-6'' (im Ausschnitt nicht erkennbar) und H-3 & H-5 fast nicht verschieben ( $\Delta\delta = 0,029$  ppm), ist die chemische Verschiebung von H-2 & H-6 sowie von H- $\beta$  etwas größer ( $\Delta\delta = 0,058$  ppm). Die Protonen H-5', H-5'', H-4'' und H- $\alpha$  verschieben sich im Vergleich zur Reinsubstanz doch recht stark ( $\Delta\delta = 0,085 - 0,207$  ppm) (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Chemische Verschiebung der Protonen von Xanthohumol C in Reinform und im Einschlusskomplex mit HP- $\beta$ -CD.

Proton	$\delta(\text{Reinsubstanz}) / \text{ppm}$	$\delta(\text{Komplex}) / \text{ppm}$	Differenz / ppm
H-6''	1,286	1,315	0,029
H-5''	5,372	5,267	0,105
H-5'	5,663	5,456	<b>0,207</b>
H-3 & H-5	6,471	6,443	0,028
H-4''	6,471	6,556	0,085
H- $\alpha$	6,59	6,682	0,092
H-2 & H-6, H- $\beta$	7,293	7,235	0,058

Um die Lage des Xanthohumol C-Moleküls im Cyclodextrin charakterisieren zu können, müssen die Verschiebungen der Protonen betrachtet werden. Hier gilt, Protonen, die eine große Verschiebung aufzeigen, liegen in räumlicher Nähe zu Protonen des Cyclodextrins [168]. Mit dieser Methode kann man eine mögliche Struktur des Komplexes formulieren. Bei der genauen Betrachtung der Protonen, die eine große Verschiebung aufweisen fällt auf, dass es sich hierbei um die Protonen am A-Ring (H-5', H-5'' und H-4'') sowie des direkt benachbarten Proton H- $\alpha$  handelt. Die genannten Protonen wechselwirken am stärksten mit den Protonen des Cyclodextrins und lägen demnach im inneren Hohlraum des Wirtsmoleküls. Dabei wäre es denkbar, dass der komplette A-Ring vom Cyclodextrin umschlossen ist, während der Mittelteil und der B-Ring herausragen. H- $\alpha$  liegt wohl noch in der Kavität oder wechselwirkt mit Cyclodextrin-Protonen am äußeren Rand, da auch dieses Proton relativ stark verschoben ist. Bei der Betrachtung der Protonen H- $\beta$ , H-2 und H-6 sowie H-3 und H-5 zeigt sich, dass mit größerer Entfernung der Protonen zum A-Ring auch die Verschiebung abnimmt. Dieser Trend bestätigt die formulierte Theorie, dass sich nur der A-Ring im Inneren des Hohlraums befindet. Auch die Protonen der beiden Methylgruppen (H-6'') zeigen eine geringe Verschiebung. Aus diesem Grund geht die Annahme hervor, dass sich auch diese beiden Gruppen außerhalb des Cyclodextrins befinden. Möglicherweise ragen beide Methylgruppen so nach außen, dass sich kein Proton des Cyclodextrins in räumlicher Nähe befindet und dadurch die chemische Verschiebung beeinflussen kann. Abbildung 25 zeigt eine mögliche Struktur des Einschlusskomplexes unter Berücksichtigung der chemischen Verschiebungen.

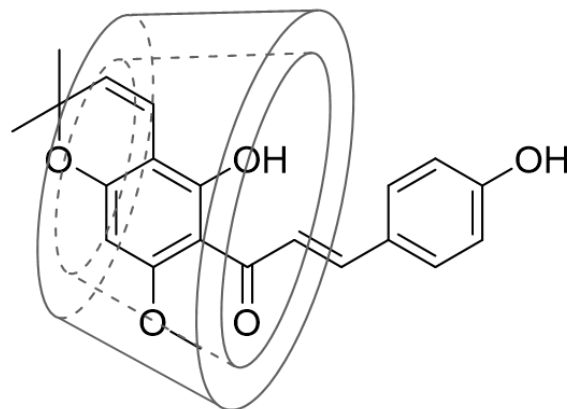
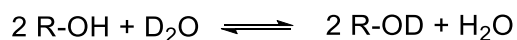


Abbildung 25: Mögliche Struktur des Xanthohumol C Einschlusskomplexes in HP- $\beta$ -CD.

Die Lage der Hydroxylgruppe kann hier nicht analysiert werden. Durch den sehr schnellen intermolekularen Austausch zwischen OH-Gruppe und Lösungsmittel kann in protischen Lösungsmitteln keine Hydroxylgruppe aufgenommen werden. Durch den Austausch des Lösungsmittels von Wasser hin zu beispielsweise Dimethylsulfoxid (DMSO) könnte die OH-Gruppe analysiert werden. Zudem findet in D<sub>2</sub>O auch ein ständiger Austausch zwischen den Hydroxylgruppen und Wasser statt:



Durch die Anwesenheit von Zusätzen wie beispielsweise Natriumdeuteroxid kann es auch – je nach vorherrschendem pH-Wert – zu einem Austausch des Protons der Hydroxylgruppe durch ein Natriumion  $\text{Na}^+$  kommen. Diese Effekte sollten jedoch keinen Einfluss auf die resultierende Struktur des entstehenden Komplexes haben [169].

Nachdem die Struktur des Einschlusskomplexes analysiert wurde, stellt sich abschließend die Frage, ob das eingeschlossene Flavonoid biologisch ebenso aktiv ist wie die freie Form. Wie bereits in Zellversuchen mit embryonalen Stammzellen aus dem Vorderhirn von Mäusen gezeigt werden konnte, aktiviert Xanthohumol C die Differenzierung zu Nervenzellen [33]. Für die Untersuchungen der Aktivität wurden in einem Dual-Luciferase Assay sowohl Xanthohumol C als Reinsubstanz als auch der Einschlusskomplex eingesetzt und die resultierende Aktivität bestimmt (Beschreibung des Assays in Kapitel 4.1). Der hergestellte Xanthohumol C-Einschlusskomplex wurde zuerst auf den prozentualen Anteil an Flavonoid untersucht. Die Herstellung des Komplexes erfolgte durch Zugabe eines Überschusses an Cyclodextrin zu einer vorgelegten Menge Flavonoid, bis das eingesetzte Xanthohumol C komplett in Lösung war. Anschließend wurde die Mischung noch mittels Faltenfilter von eventuell nicht gelöstem Xanthohumol C Rückständen gereinigt. Durch diese Art der Herstellung kann der letztendlich vorhandene Flavonoid-Gehalt im Komplex variieren. Deshalb war es nötig, die genaue prozentuale Zusammensetzung zu ermitteln. Für die Zelltests musste gewährleistet werden, dass sowohl der Reinstoff als auch der Komplex im selben molaren Verhältnis getestet wurden. Die stöchiometrische Zusammensetzung des Einschlusskomplexes wurde mittels HPLC Messung bestimmt. Es resultierte – je nach eingesetzter Cyclodextrin-Menge bei der Herstellung – ein Flavonoid-Gehalt (Masse Flavonoid pro Gesamtmasse Einschlusskomplex) zwischen 2 % und 8 %. Die teils doch sehr stark abweichenden Werte kamen zustande, da das Hauptaugenmerk nicht auf dem höchst möglichen Xanthohumol C Gehalt lag, sondern nur auf dem kompletten Lösen des Flavonoids. Für die Zelltests spielt dieser Wert aber nur eine untergeordnete Rolle, da durch das Einsetzen des Komplexes in der immer gleichen molaren Konzentration der aktiven Substanz Xanthohumol C die immer gleiche Menge an differenzierungsinduzierenden Substanz vorhanden ist. Eine höhere Konzentration als 8 % konnten aber nicht erreicht werden. Vergleicht man aber diesen Wert mit der Steigung der Gerade, die bei der Löslichkeitsuntersuchung (siehe Abbildung 12) resultierte, stimmen die Verhältnisse von Xanthohumol C und Cyclodextrin der Löslichkeitsuntersuchung und der Konzentration des Flavonoids im Komplex überein. Die Steigung beträgt 0,079, das bedeutet, dass pro Cyclodextrinmolekül 0,079 Xanthohumol C Moleküle eingeschlossen werden können. Hochgerechnet ergeben sich 12,7 Cyclodextrinmoleküle auf ein Xanthohumol C Molekül, was

näherungsweise 8 % entspricht. Diese Ergebnisse stehen keineswegs im Widerspruch zu der ermittelten Komplexstöchiometrie. Es ist durchaus denkbar, dass durch die unterschiedlichen Substitutionen des Cyclodextrins Wirtsmoleküle entstehen, die durch ihre räumliche Anordnung der Hydroxypropylgruppen nicht geeignet sind, Xanthohumol C zu komplexieren. Diese Theorie könnte man belegen, indem man HP- $\beta$ -CD in seine einzelnen Bestandteile auf trennt und mit jeder Fraktion versucht, den Einschlusskomplex zu bilden. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Methoden ist es jedoch leider nicht möglich, das Cyclodextrin zu fraktionieren. Außerdem gibt es auf dem Markt nur unterschiedlich substituierte HP- $\beta$ -CD zu erwerben, definiert-substituierte Cyclodextrine sind technisch (noch) nicht möglich (Telefonat mit Wacker Chemie AG).

Um die Neurodifferenzierungsaktivität von Komplex und Reinsubstanz zu vergleichen, wurden sowohl Xanthohumol C als Reinsubstanz als auch der Xanthohumol C Einschlusskomplex in derselben Konzentration *in vitro* auf embryonischen Vorderhirnzellen der Maus in einem dualen Luciferase Assay getestet. Sowohl der Komplex als auch Xanthohumol C wurden in einer Konzentration von 50  $\mu$ M auf die präparierten Zellen gegeben und für drei Tage inkubiert. Wie bereits in Kapitel 2.9 beschrieben, löst Xanthohumol C (ENDF1) die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu Nervenzellen aus [33]. Abbildung 26 zeigt die neurodifferenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol C und vom Einschlusskomplex. Beide Substanzen liegen bei einer differenzierungsinduzierten Aktivität (DIA) von 12. Dies bedeutet, dass durch die Komplexbildung von Xanthohumol C die Aktivität nicht verringert wird. Ob das Chalkon als Reinsubstanz oder in Form des Komplexes in die Zelle aufgenommen wird, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Es wäre denkbar, dass die Zellen nur das freie Xanthohumol C, welches durch die Gleichgewichtsreaktion zwischen komplexierter und freier Form in Wasser vorliegt, aufnehmen. Durch die Aufnahme und der dadurch bedingten Verschiebung des Gleichgewichts würde neues Xanthohumol C aus dem Komplex frei werden und wieder für die Aufnahme zur Verfügung stehen. Auf der anderen Seite ist es auch denkbar, dass der gesamte Komplex in die Zelle aufgenommen wird und erst durch pH-Änderungen im Zellinneren das Chalkon freisetzt. Entscheidend ist ohnehin nur die Aufnahme von Xanthohumol C für die neuro-aktive Wirkung. Um die Differenzierung der Stammzellen zu Neuronen auszulösen, ist also der Komplex im Zelltest genauso gut geeignet wie Xanthohumol C als Reinsubstanz. Zudem besitzt der Komplex durch seine deutlich erhöhte Wasserlöslichkeit eine größere Bioverfügbarkeit, was den Einsatz des Einschlusskomplexes für *in vivo* Tests begünstigt.

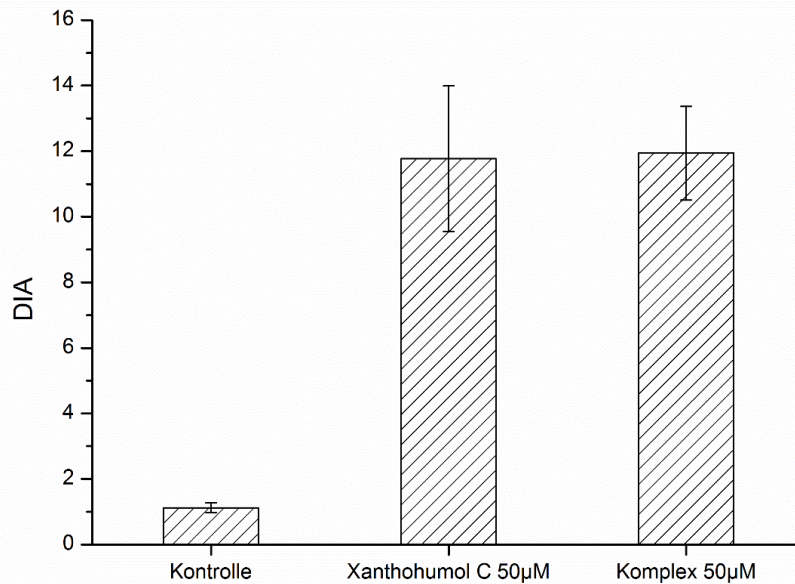


Abbildung 26: Differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol C und Xanthohumol C HP- $\beta$ -CD Komplex in 50  $\mu$ M in Dreifachbestimmung. Aufgetragen wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen.

### 3.4 Teildiskussion der Cyclodextrin-Komplexe

Der Einsatz von unpolaren Flavonoiden in medizinischen Zelltests bzw. in lebenden Organismen ist aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit nicht einfach. Es kann in der Regel nicht ausreichend Substanz in Wasser oder Puffer gelöst werden, um eine hinreichend hohe Konzentration zu erreichen. Zudem besteht die Gefahr, dass die Verbindung aufgrund der geringen Löslichkeit ausfällt und somit keine reproduzierbaren Messungen durchgeführt werden können. In lebenden Organismen ist dieses Ausfallen sehr bedenklich. Bei der direkten Injektion in die Blutbahn kann es durch das Ausflocken im schlimmsten Fall zu Verstopfungen der Blutgefäße kommen und somit zu Thrombosen führen. Denkbar sind auch weniger kritische Szenarien wie beispielsweise das Anhaften an unpolare Stoffe wie Proteine oder Lipide. Dies führt zwar zu keiner akuten Gefahr für den Organismus, senkt aber die Konzentration der Substanz, was zu einer Verringerung der Wirkung führt. Beim Einsatz des neuroaktiven Flavonoids Xanthohumol C besteht aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von 2.2  $\mu$ g/mL eben beschriebene Problematik. Um dieser geringen Löslichkeit entgegenzuwirken, wurde in dieser Arbeit 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine gängige in der Medizin eingesetzte Substanz, die sowohl für orale wie auch intravenöse Verabreichungen zugelassen ist [155,157]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich durch die Formulierung von Xanthohumol C in Cyclodextrin die Wasserlöslichkeit um das ca. 650-fache erhöht werden konnte. Dieser Wert liegt – verglichen



mit anderen Flavonoiden – etwas höher, was der ursprünglich sehr geringen Wasserlöslichkeit von Xanthohumol C geschuldet ist. So konnte – verglichen mit der in dieser Arbeit verwendeten Cyclodextrinkonzentration von 50 mM - die Löslichkeit von Quercetin um das 40-fache [170], von Hesperidin um das 50-fache [171] und von Naringenin um das 140-fache [171] erhöht werden.

Die Komplexbildungskonstante  $K_{1:1}$  konnte aus den Ergebnissen der HPLC-Messungen mit unterschiedlichen Cyclodextrin-Konzentrationen nach Ravelet *et al.* [153] bestimmt werden. Der Wert für diesen Komplex liegt im gleichen Bereich wie der für andere Flavonoid-Komplexe mit  $\beta$ -Cyclodextrin wie Hesperitin und Naringenin [172], was vermuten lässt, dass sich die Bildungsrate von struktur-ähnlichen Flavonoiden mit Cyclodextrin vergleichen lassen. Die Frage, ob das Flavonoid Xanthohumol C in die Kavität des Cyclodextrins eingeschlossen wird oder sich nur an dessen Oberfläche adsorbiert wurde, konnte durch die Ergebnisse der dynamischen Differenzkalorimetrie wohl geklärt werden. Nach dem Stand der Literatur von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen spricht das Verschwinden der Flavonoid-Peaks im Komplex gegen eine Anlagerung des Flavonoids an der Oberfläche des Zuckers und weist auf einen Einschlusskomplex von Xanthohumol C in Cyclodextrin hin [173-176]. Die bisherigen Erkenntnisse über den Cyclodextrin-Einschlusskomplex konnten mittels Massenspektrometrie bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die unterschiedlich substituierten Cyclodextrine Komplexe mit Xanthohumol C eingehen. Bei allen Spezies konnte die Bildung eines stöchiometrischen 1:1-Komplexes nachgewiesen werden, was sich auch mit anderen Studien über HP- $\beta$ -CD Komplexe deckt [177]. Die dreidimensionale Struktur des Komplexes konnte durch die Verschiebungen der Protonensignale in der Kernspinresonanzspektroskopie ermittelt werden. Die Ergebnisse deuten auf einen Einschluss des Chromanrings in die unpolare Kavität des Cyclodextrins hin. Aus dem apolaren Hohlraum ragen die Methylgruppen des Chromanrings einerseits sowie die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung und der B-Ring auf der anderen Seite heraus. Um dieses Ergebnis einordnen zu können, würden sich Simulationen der Wechselwirkungsenergien zwischen Cyclodextrin und Flavonoid anbieten. Hierbei würde die dreidimensionale Struktur mit der minimalsten Energie die stabilste und damit wahrscheinlichste Form des Komplexes darstellen [178].

Entscheidend für biologische Tests ist die gleichbleibende Bioverfügbarkeit der eingeschlossenen Substanz. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das freie als auch das komplexierte Flavonoid dieselbe differenzierungsinduzierende Aktivität auf die neuronalen Stammzellen haben. Hier zeigt sich wieder das große Potential der Cyclodextrine als Trägerstoffe für Arzneimittel [179,180]. Das Flavonoid wird zwar vom Cyclodextrin umschlossen, es kann allerdings immer noch in die Zellen aufgenommen werden [181], in denen es seine neurodifferenzierungsinduzierende Wirkung entfalten kann.

Durch diese Modifikation wurde Xanthohumol C zugänglicher für den Einsatz in Zelltests gemacht. Außerdem kann der Flavonoid-Cyclodextrin-Komplex auch in zukünftigen *in vivo* - Experimente eingesetzt werden.

## 4 Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von Flavonoiden

### 4.1 Hintergrund Neuroanatomie

Allgemein versteht man unter neurodegenerativen Erkrankungen die Verringerung der funktionellen Reserven des Gehirns durch das Absterben von Neuronen [182]. Neben diesen signalübertragenden Nervenzellen liegen im Gehirn auch Gliazellen vor. Diese unterteilen sich in Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikrogliazellen. Letztere sind Teil des Immunsystems und stammen aus dem Knochenmark. Sie werden für die Abwehr von Erreger benötigt, da die Antikörper die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Die Ependymzellen dienen als Trennschicht zwischen dem eigentlichen Gehirn und der Gehirnflüssigkeit. Die Astrozyten verbinden die Nervenzellen mit den Blutgefäßen und versorgen so die Nervenzellen mit Nährstoffe. Sie sind bei der Regulation des Flüssigkeits- und des Kaliumhaushalts des Gehirns essentiell. Außerdem sind sie am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Die Oligodendrozyten bilden die sogenannte Myelinscheide, die die Nervenzellen umschließt und somit schützt. Außerdem wird durch die Isolierung die Impulsleitung der Nervenzellen verbessert und die Übertragungsgeschwindigkeit erhöht. Bei Verletzungen der Nervenzellen bilden die Astrozyten und Oligodendrozyten eine feste Narbenschicht. Diese verhindert allerdings die Regeneration des Gewebes, weshalb diese Bildung bei der Therapie derartiger Verletzungen zu unterbinden wären [183]. Entscheidend für die Leistungsfähigkeit des Gehirns ist die Vernetzung der einzelnen Nervenzellen miteinander. Dies wird durch die Ausbildung sogenannter Synapsen bewerkstelligt. Die Neu- und Umverknüpfung durch Synapsen findet über das ganze Leben hinweg statt, nimmt jedoch mit steigendem Alter ab. Man nennt diese Eigenschaft des Gehirns Plastizität. Bei kleinen Verletzungen des Gehirns können diese Verluste durch die Plastizität ausgeglichen und regeneriert werden. Bei größeren Verletzungen oder neurodegenerativen Erkrankungen müssen Nervenzellen nicht nur neu vernetzt, sondern auch neu gebildet werden. Im Gegensatz zu kardiovaskulären Erkrankungen sind bei neurodegenerativen Erkrankungen die Risikofaktoren durch den Lebensstil umstritten. Während die eine Seite vom protektiven Effekt gesunder Ernährung, geistiger Aktivität und regelmäßiger Bewegung überzeugt sind, behauptet die Gegenseite, dass ausschließlich genetische Faktoren und das Alter einen Einfluss darauf haben [184]. Die Tatsache betreffend, dass sich Neurodegeneration mit zunehmendem Alter häufen, sind sich jedoch beide Lager einig. Aufgrund der immer steigenden Lebenserwartung in den höher entwickelten Ländern werden auch diese Erkrankungen immer weiter zunehmen.

Die für die Regeneration neurodegenerativer Erkrankungen benötigten Nervenzellen können neu gebildet werden, da im adulten Gehirn im Hippocampus sowie im Bulbus olfactorius noch

neuronale Stammzellen vorhanden sind [185]. Diese können sich unbegrenzt teilen und sich sowohl zu Nerven- wie auch zu Gliazellen ausbilden. Transplantationsexperimente mit neuronalen Stammzellen haben gezeigt, dass sich nur im Hippocampus und im Bulbus olfactorius Nervenzellen ausbilden können. Es wird vermutet, dass sich dort andere Astrozyten befinden, die durch das Ausschütten spezieller Signalmoleküle die Differenzierung anregen [185]. Es wird angenommen, dass Serotonin und BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) als solche Signalmoleküle dienen. Außerdem wurde festgestellt, dass sich bei Mäusen mit mehr Bewegung auch vermehrt Nervenzellen – hauptsächlich in der Nähe von Blutgefäßen – gebildet haben. Es besteht zudem die Vermutung, dass auch die Wachstumsfaktoren IGF-1 (insulin-like growth factor-1) aus der Leber und VEGF (vascular endothelial growth factor) aus den Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Neurogenese einnehmen [186,187]. Es zeigten sich auch Unterschiede in der Differenzierung beim Einsatz von verschiedenen Wachstumsfaktoren. Durch intraventrikuläre Infusionen wurden VEGF und FGF-2 (fibroblast growth factor) verabreicht. Dabei zeigte sich, dass bei VEGF die gliale Differenzierung und bei FGF-2 die neuronale Differenzierung induziert wird [188]. Außerdem wird vermutet, dass die beiden Gehirnareale Hippocampus und im Bulbus olfactorius die neugebildeten Nervenzellen vor neurogenese-feindlichen Einflüssen schützen [189]. Die Tatsache, dass die adulte Neurogenese in diesen beiden Regionen stattfindet, liegt wohl an dem Bedarf vieler neuer Verknüpfungen in diesen Bereichen, denn der Hippocampus hat eine entscheidende Funktion beim Lernen und bei der Gedächtnisleistung [190,191]. Im Bulbus olfactorius werden Gerüche verarbeitet, da in ihm die Riechnerven enden. An Untersuchungen bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass dort gebildete, neue Neuronen für die Erinnerung an neue Gerüche essentiell sind [192]. Durch die adulte Neurogenese und die anschließende Migration der Zellen werden immer wieder neue Nervenzellen in das zentrale Nervensystem (ZNS) eingebaut und vernetzt.

So entstehen bei der Neurogenese täglich einige tausend neue Neuronen. Die meisten davon überstehen jedoch die Reifephase nicht und sterben durch Apoptose ab. Dieser Prozess der Regulierung der Neurogenese und Apoptose wird durch das Zusammenspiel von Neurotransmittern, Hormonen und Wachstumsfaktoren bestimmt. Außerdem steigt die Überlebenszahl der jungen Neuronen mit der mentalen Aktivität [193]. Je nach Bedarf kann also die Neurogeneserate kontrolliert werden [194]. Im Durchschnitt entstehen im adulten Hippocampus ca. 700 Zellen pro Tag, die letztendlich auch ins ZNS eingebunden werden. Im Hinblick auf die Gesamtzahl der Nervenzellen werden somit jährlich knappe 2 % aller Neuronen ausgetauscht [195]. Allerdings reduziert sich die durch adulte Neurogenese gebildete Zahl an Zellen mit dem Alter, wodurch der Austausch weiter abnimmt [196]. Bei Schädigungen der Hirnstruktur durch Verletzungen oder Erkrankungen scheint es zudem möglich, auch an anderen Orten wie dem Hippocampus und dem Bulbus olfactorius Neurogenese stattfinden zu lassen kann. Dabei spielen eine Vielzahl von Signalmolekülen

eine entscheidende Rolle [197]. Neuronale Stammzellen können somit im gesamten Gehirn gefunden werden, jedoch sind nur die beiden Regionen Hippocampus und Bulbus olfactorius neurogen. Aus diesem Grund gilt die Annahme, dass nicht nur neuronale Stammzellen für die Bildung von Nervenzellen essentiell sind, sondern dass die Signalmoleküle einen sehr wichtigen Teil bei der Auslösung der Neurogenese einnehmen [198]. In den letzten Jahren konnten einige Zelltests zeigen, dass sich nach Verletzungen des Gehirns auch aus Gliazellen Nervenzellen bilden können. Diese Re-Differenzierung im Gehirn wurde anfangs konträr diskutiert, findet aber immer mehr Bestätigung in der Medizin. Ob diese Re-Differenzierung einen großen Einfluss auf die Regeneration im Gehirn hat oder ob es sich nur als einen zusätzlichen Weg bei der Regeneration handelt, ist bis dato nicht vollständig geklärt [199,200].

Die für die Neurogenese unabdingbaren neuronalen Stammzellen sind in der Lage zu proliferieren und sich sowohl in Glia- wie auch Nervenzellen zu differenzieren. Der Start der Neurogenese wird durch einen Proliferationsstopp der neuronalen Stammzellen beschrieben [189]. Diese neuronalen Vorläuferzellen zeigen eine starke Ähnlichkeit mit den radialen Gliazellen der embryonalen Neurogenese. Spezifisch für diese Zellen ist das Expressieren der Proteine Nestin und GFAP (glial fibrillary acidic protein). Aufgrund des Fehlens von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen und der gleichzeitigen dichten Verteilung von spannungsunabhängigen Kaliumkanäle – ähnlich wie in Astrozyten – sind diese Vorläuferzellen elektrisch nicht erregbar [201]. Die daraus entstehenden neuronalen Vorläuferzellen exprimieren zwar noch das Protein Nestin, jedoch nicht mehr GFAP. Außerdem steigt die Teilungsrate stark im Vergleich zu den neuronalen Stammzellen [202]. Diese Zellen besitzen bereits Rezeptoren für Neurotransmitter wie beispielsweise GABA [203] und zeigen aufgrund des Verlusts der Kaliumkanäle einen höheren Eingangswiderstand als die neuronalen Stammzellen [201]. Die Reifung der postmitotischen Neuronen dauert ca. vier Wochen. In dieser Zeit wird das Protein DCX (Doublecortin) exprimiert. In dieser Entwicklungsphase beginnen die Dendriten der Zelle in Richtung Molekularschicht zu wachsen, während die Axone in Richtung Hippocampus wandern [204]. Während dieser Reifung werden alle glialen Kaliumkanäle abgebaut, wodurch der Eingangswiderstand weiter steigt [205]. Für das Dendritenwachstum der ersten beiden Wochen ist die Erregung durch GABA von elementarer Bedeutung. Nach und nach nimmt die Affinität zu GABA durch das Austauschen der Rezeptoren ab, wodurch GABA dann inhibitorisch wirkt [206]. Es entstehen synaptische Eingänge für Glutamat, das die Reifung zu jungen Neuronen abschließt. Falls diese Zellen weitere vier Wochen überleben und nicht vorher durch Apoptose wieder abgebaut werden, können sie sich vernetzen und bilden einen Teil des Hippocampus [207].

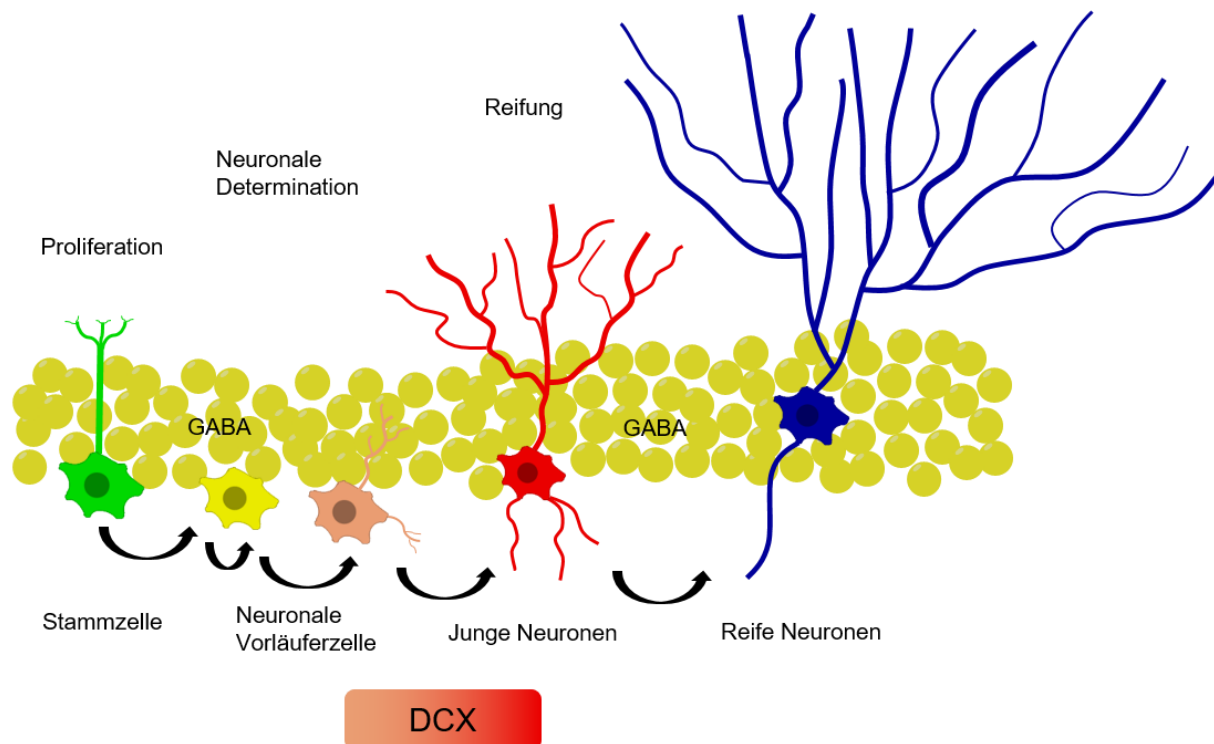


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Neurogenese. Aus den neuralen Stammzellen bilden sich neuronale Vorläuferzellen. Deren Proliferationsrate ist im Vergleich zu den Stammzellen deutlich erhöht. Nach einigen Tagen entstehen Neuronen, die sich vollständig in vorhandene Zellstruktur integrieren. Abbildung nach [207].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Auslösen der Neurogenese durch Signalmoleküle verschiedener Art geregelt wird. Die Entwicklung unterliegt jedoch der spezifischen Umgebung der neuronalen Nischen [207]. Die Entwicklung der Neuronen aus Stammzellen läuft dann aber immer gleich – unabhängig vom Ort – ab (vgl. Abbildung 27).

Wie bereits oben erwähnt, zeigte Xanthohumol C eine sehr starke differenzierungsinduzierende Aktivität. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Chalkon eine signifikant höhere DIA besitzt als das üblicherweise eingesetzte Gemisch aus 10  $\mu\text{M}$  Retinsäure und 50  $\mu\text{M}$  Valproinsäure [33,136]. In dieser Arbeit wird als Standard zur Abschätzung der DIA Xanthohumol C verwendet, da die Bewertung immer im Vergleich zu der bisher am wirksamsten Substanz Xanthohumol C erfolgen soll.

Ziel dieser Studie war es unter anderem, die wichtigsten Struktureigenschaften für diese starke Aktivität herauszufinden. Mittels Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von ähnlichen Molekülen und deren resultierende Aktivität sollte festgestellt werden, welche Gruppen bzw. Strukturmerkmale ausschlaggebend für die Neurodifferenzierung sind und gegebenenfalls noch aktivere Verbindungen zu finden. Um weitere Informationen über wichtige Strukturelemente herausfinden zu können, wurden verschiedene Verbindungen synthetisiert. Es wurde sowohl der A-Ring als auch der B-Ring modifiziert. Am A-Ring wurde die Position des Rings verändert. Außerdem wurden durch den Austausch des Sauerstoffatoms der

Position 4 durch andere Heteroatome verschiedene chemische Umgebungen erzeugt. Am B-Ring wurde zum einen die Stellung bzw. die Anzahl der Hydroxygruppen variiert, zum anderen wurde die Hydroxygruppe an Position 4 durch unterschiedliche Atome ersetzt. Das Schema ist in Abbildung 28 dargestellt.

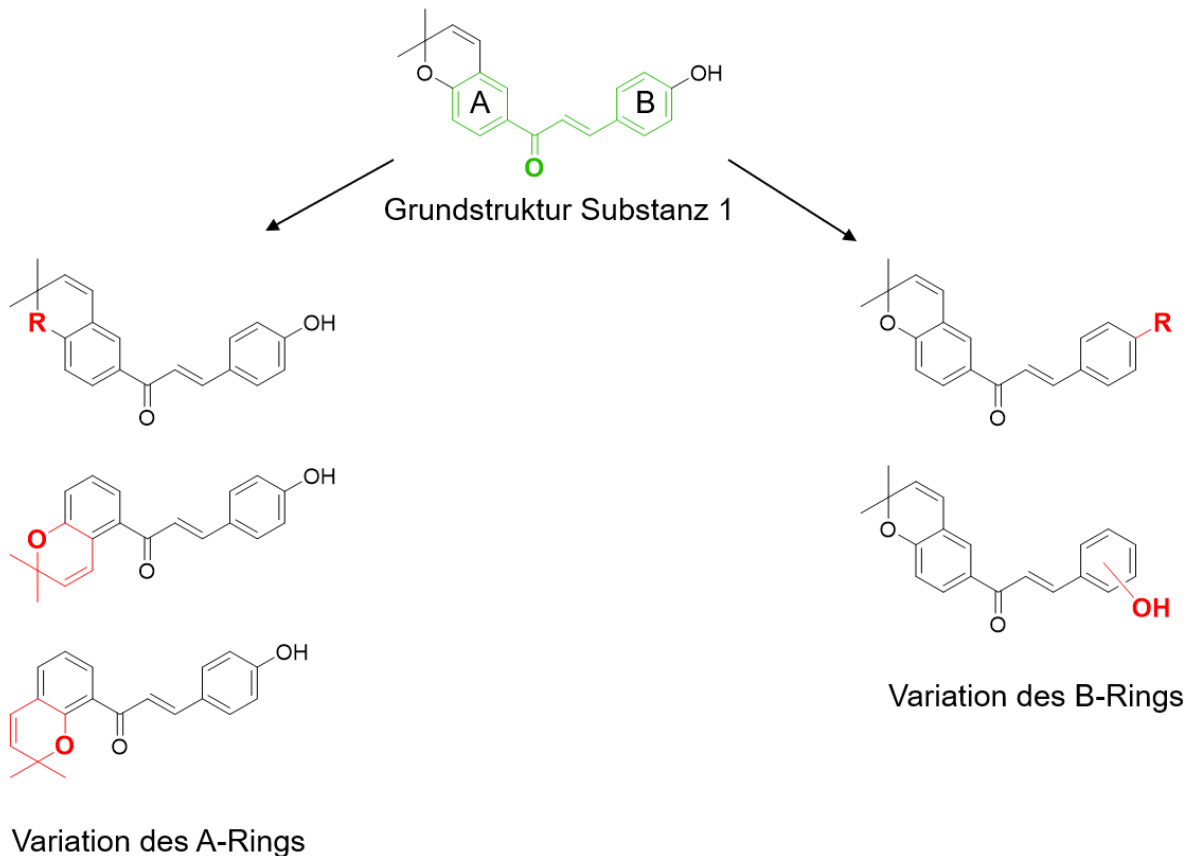


Abbildung 28: Schema zu den Veränderungen der Struktur-Aktivitäts-Untersuchung. Die rot-markierten Teile wurden variiert, während die grüne Struktur unverändert bleibt. Der Rest R steht beim A-Ring für die Elemente Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, während der Rest R beim B-Ring für die unterschiedlichen Substituenten (OMe, OEt, OPr, SMe, Cl, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N(Me)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>) steht.

Um die hergestellten Substanzen auf ihre differenzierungsauslösende Aktivität zu testen, wurde ein dualer Luciferase-Assay eingesetzt [137,138]. Dieser Assay testet das Potential von Substanzen auf ihre neurodifferenzierungsinduzierende Aktivität. Dadurch soll zum einen neue Erkenntnisse über die für die Differenzierung wichtige Strukturelemente gefunden werden. Zum anderen sollen neue Substanzen gefunden werden, die ebenfalls eine differenzierungsinduzierende Aktivität auf neurogene Stammzellen haben. Die Substanzen wurden von Frau Lara Bieler am Lehrstuhl für experimentelle Neuroregeneration der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Salzburg unter Leitung von Prof. Dr. Sébastien Couillard-Després getestet. Der Assay wird unter Verwendung von embryonischen Vorderhirnzellen der Maus durchgeführt. Es kommen zwei verschiedene Luciferasen zum Einsatz. Zum einen wird die Luciferase vom Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) eingesetzt. Diese soll die Gesamtdifferenzierungsaktivität anhand des Markerproteins Doublecortin

messen. Doublecortin wird – wie bereits oben beschrieben – ab einer gewissen Entwicklungsstufe der Neurogenese exprimiert. Zum anderen wird die Seeschwamm-Luciferase (*Renilla reniformis*) verwendet. Diese soll die Gesamtzahl der transfizierten Zellen anzeigen. Je höher dieser Wert ist, desto mehr Nervenzellen sind noch lebendig. Eine aktive Substanz, die gut geeignet für zur Induzierung der Differenzierung ist, zeigt neben einem hohen Wert der Photinus-Luciferase für viele neugebildete Nervenzellen auch einen hohen Wert der Renilla-Luciferase. Jede Substanz wurde in einer Vierfachbestimmung getestet. Um die Ergebnisse unabhängig überprüfen zu können, wurde diese Vierfachbestimmung insgesamt dreimal auf verschiedenen 96-Well-Platten durchgeführt. Etwaige Ausreißer wurden über den Dean-Dixon-Ausreißer-Test ermittelt; Signifikanzunterschiede zwischen den Aktivitäten der getesteten Substanzen wurden mittels T-Test bestimmt. Dabei wurden die Unterschiede in drei Signifikanzniveaus eingeteilt:  $p < 0.5\%$  (\*\*\*),  $p < 1\%$  (\*\*) und  $p < 5\%$  (\*) und in den Diagrammen entsprechend gekennzeichnet. Die Werte der Substanzen wurden durch die Werte der unbehandelten Zellen (Kontrolle) dividiert, um die Werte auf die Kontrolle zu normen. Betrachtet wurde die differenzierungsinduzierende Aktivität (DIA). Sie wurde als Quotient aus der normierten Photinus-Aktivität und der normierte Renilla-Aktivität gebildet.

$$\text{DIA} = \frac{\text{Photinus (normiert)}}{\text{Renilla (normiert)}}$$

Je höher dieser Wert ist, desto stärker ist die differenzierungsinduzierende Aktivität der Substanz. Da es sich hierbei um den Quotienten aus beiden Luciferasen handelt, haben sowohl die Zahl der neu-differenzierten Nervenzellen als auch die Zahl der überlebenden Zellen einen Einfluss auf den Wert. Einzig bei stark erniedrigten Renilla-Werten wird der Quotient fälschlicherweise ins positive beeinflusst. Dieser Aspekt wird bei den auftretenden Fällen separat beschrieben und angemerkt. Für Substanzen, bei denen die Renilla-Werte in annehmbaren – also nicht toxischen – Bereich liegen, kann die DIA gut verglichen werden.

## 4.2 Synthese der Flavonoide

Viele der Verbindungen in dieser Arbeit sind weder natürlichen Ursprungs, noch zuvor in der Literatur beschrieben worden. Dabei konnten zum einen Derivate ausgehend von Xanthohumol und Xanthohumol C semi-synthetisch hergestellt werden. So wurden die hydrierten Verbindungen der beiden Chalkone aus den beiden Naturstoffen synthetisiert. Die vollhydrierten Derivate Substanz 3 und Substanz 6 wurden durch Hydrieren mit Wasserstoff und Palladiumkatalysator hergestellt (vgl. Abbildung 29).



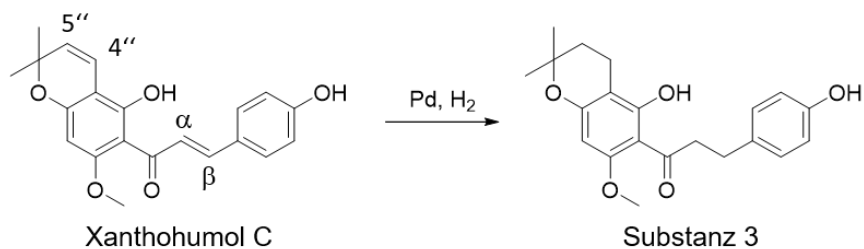


Abbildung 29: Total-Hydrierung von Xanthohumol C mit Palladium und Wasserstoff.

Das vollhydrierte Produkt zeigt verglichen mit dem Edukt im  $^1\text{H-NMR}$  zwei neue Triplets bei 1,80 ppm bzw. 2,54 ppm, welche von den Protonen H-5'' und H-4'' stammen. Außerdem verschwindet das Singulett der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung von H- $\alpha$  und H- $\beta$  bei 7,71 ppm. Dafür zeigen sich zwei weitere Triplets der ehemaligen H- $\alpha$  und H- $\beta$  Protonen bei 2,83 ppm und 3,25 ppm. Im Massenspektrometer ist der silylierte Massenpeak von  $m/z$  500 zu erkennen. Die Synthese des hydrierten Xanthohumol-Derivats Substanz 6 lief analog und zeigte die erwarteten Spektren.

Für die Synthese der an der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung teilhydrierten Derivate von Xanthohumol und Xanthohumol C (Substanz 2 und Substanz 7) wurde der Katalysator nach Stryker eingesetzt und mit Diphenylsilan hydriert. Diese Methode erlaubt die selektive Hydrierung  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Ketone [208]. Der Stryker-Katalysator  $[(\text{PPh}_3)\text{CuH}]_6$  ist ein Kupfer(I)-hydrid-Komplex, welcher eine gute Hydrid-Quelle zur selektiven Hydrierung darstellt (vgl. Abbildung 30) [209].

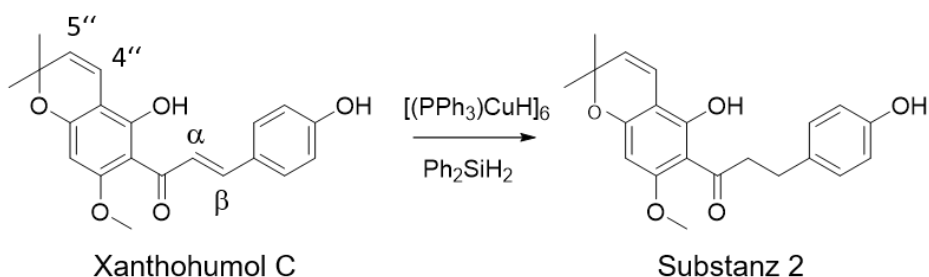


Abbildung 30: Selektive Hydrierung der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung mittels Katalysator nach Stryker und Diphenylsilan.

Im Vergleich zum Edukt weist Substanz 2 im  $^1\text{H-NMR}$  kein Singulett-Signal bei 7,71 ppm ( $\alpha,\beta$ -Doppelbindung) auf. Dafür liegen jedoch zwei Dubletts von Dubletts bei 2,85 ppm und 3,25 ppm vor. Die Protonen H-5'' und H-4'' liegen wie beim Edukt Xanthohumol C bei 5,54 ppm bzw. bei 6,59 ppm als Dublett vor. Der silylierte Massenpeak von  $m/z$  498 im Massenspektrometer weist ebenfalls auf das richtige Produkt hin.

Neue Verbindungen:

Die übrigen Substanzen wurden allesamt durch basisch-katalysierte Aldolkondensation gewonnen. Hierfür wurden sowohl das A-Ring Derivat als auch das B-Ring Derivat je nach zu synthetisierendem Produkt hergestellt und anschließend unter Wasserabspaltung zusammenkondensiert (vgl. Abbildung 31).

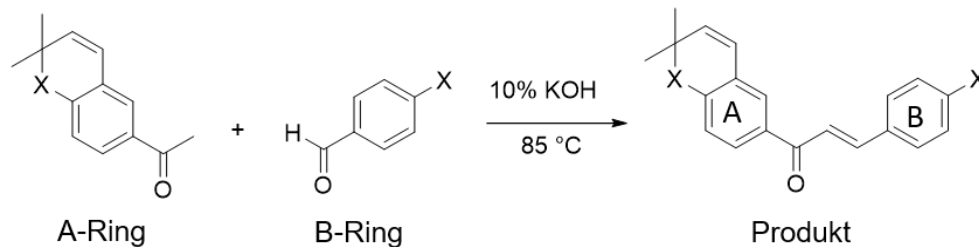


Abbildung 31: Schema der basischen Aldolkondensation eines A-Rings mit einem B-Ring zur Produktsubstanz.

Die drei unterschiedlichen A-Ring Derivate wurden synthetisch hergestellt. Das Sauerstoff-Analogon wurde ausgehend von 4-Hydroxyacetophenon hergestellt. Dieses wurde hierfür mit 3-Chloro-3-methyl-1-butin umgesetzt. Dabei bildet sich zuerst eine offenkettige Zwischenstufe. Die Kette wurde thermisch bei 195 °C zum Chromanring geschlossen. Die Anlagerung konnte im Massenspektrometer durch den Massenpeak von  $m/z$  202 detektiert werden. Den erfolgreichen Ringschluss zum Chromanring zeigte sich durch die Änderung der Retentionszeit im Gaschromatogramm. Während die offenkettige Form (vgl. Abbildung 32) eine Retentionszeit von  $R_T = 8,28$  min hat, hat der geschlossene Chromanring eine Retentionszeit von  $R_T = 8,90$  min. Bei der Fragmentierung zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied. Das offenkettige Zwischenprodukt zeigt eine Abspaltung von  $m/z$  135, was der Kette am Sauerstoff entspricht. Im Produkt ist diese Abspaltung nicht mehr zu erkennen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass sich die Kette zum Chromanring geschlossen hat. Der geschlossene Chromanring zeigt im  $^1\text{H-NMR}$  ein charakteristisches Singulett mit sechs Protonen der zwei Methylgruppen H-6“ bei 1,43 ppm. Außerdem erkennt man die beiden Protonen der Doppelbindung H-4“ und H-5“ bei 6,48 ppm und 5,80 ppm.

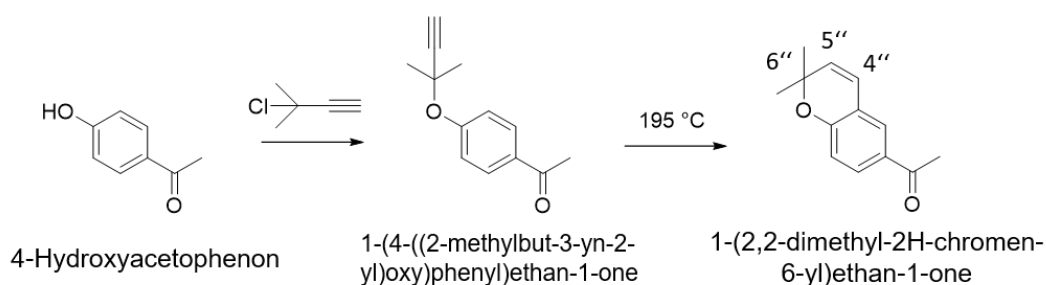


Abbildung 32: Syntheseweg zur Herstellung des A-Ring Derivats 1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)ethan-1-one aus 4-Hydroxyacetophenon.

Der A-Ring mit Stickstoff als Heteroatom konnte in einer Stufe mit 4-Aminoacetophenon und 2-Methyl-3-buten-2-ol hergestellt werden (vgl. Abbildung 33). Charakteristisch für das Produkt ist vor allem das Proton am Stickstoff im Quinolinring, welches im  $^1\text{H-NMR}$  bei 5,99 ppm als Singulett zu sehen ist. Außerdem liegen die Signale der neu-gebildeten Protonen H-4'' (6,31 ppm), H-5'' (5,52 ppm) und der beiden Methylgruppen H-6'' (1,32 ppm) vor. Das Massenspektrum mit einem Massenpeak von  $m/z$  201 weist ebenso auf das Produktmolekül hin.

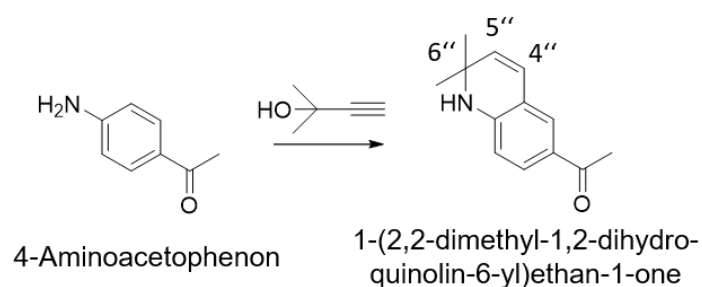


Abbildung 33: Syntheseweg zur Herstellung des A-Ring Derivats 1-(2,2-dimethyl-1,2-dihydro-quinolin-6-yl)ethan-1-one aus 4-Aminoacetophenon.

Die Herstellung des Thiochromen-Derivats war etwas aufwendiger, da die Reaktion analog zum Chromanring von 4-Thioacetophenon mit 3-Chloro-3-methyl-1-buten nicht zum gewünschten Produkt führte. Der Grund hierfür ist wohl bei der hohen Affinität zur Dimerisierung der Thiolgruppe des Ausgangsprodukts zurückzuführen. Im Massenspektrometer konnten einige Produkte mit der Masse des Dimers identifiziert werden. Möglicherweise könnte dieses Problem mit dem Austausch des Chlors gegen das weichere Brom in 3-Chloro-3-methyl-1-buten gelöst werden können, jedoch ist dieses Produkt nicht käuflich erwerblich. Deshalb wurde ein fünfstufiger Syntheseweg ausgehend von Thiophenol gewählt (vgl. Abbildung 34). Um die geringe Ausbeute des Produkts nach diesen fünf Stufen (3 % Gesamtausbeute) durch Aufreinigung nicht noch weiter zu senken, wurde der positive Verlauf der Reaktion nur mittels Massenspektrometrie überwacht und auf eine säulenchromatische Aufreinigung verzichtet. Die Anlagerung der Dimethylacrylsäure an das Thiophenol im ersten Schritt zeigte sich mit einem Massenpeak von  $m/z$  210 im

Massenspektrum. Der Massenpeak des mit Polyphosphorsäure (PPA) geschlossenen Thiochromanring lag bei  $m/z$  192 im Massenspektrum. Das erfolgreiche Reduzieren der Carbonylgruppe mit Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) zeigt sich mit einem Massenpeak von  $m/z$  194 an. Die erfolgreiche Wasserabspaltung mit *para*-Toluolsulfonsäure (pTsOH) zeigte sich durch einen Massenpeak von  $m/z$  176. Im  $^1\text{H-NMR}$  zeigen sich die beiden entstandenen H-4'' und H-5'' Protonen als Dublett bei 6,45 ppm und 5,80 ppm. Zudem ist das Singulett der beiden Methylgruppen H-6'' bei 1,39 ppm zu erkennen. Die restlichen aromatischen Peaks fallen zu einem Multipllett mit der Intensität von vier Protonen zusammen.

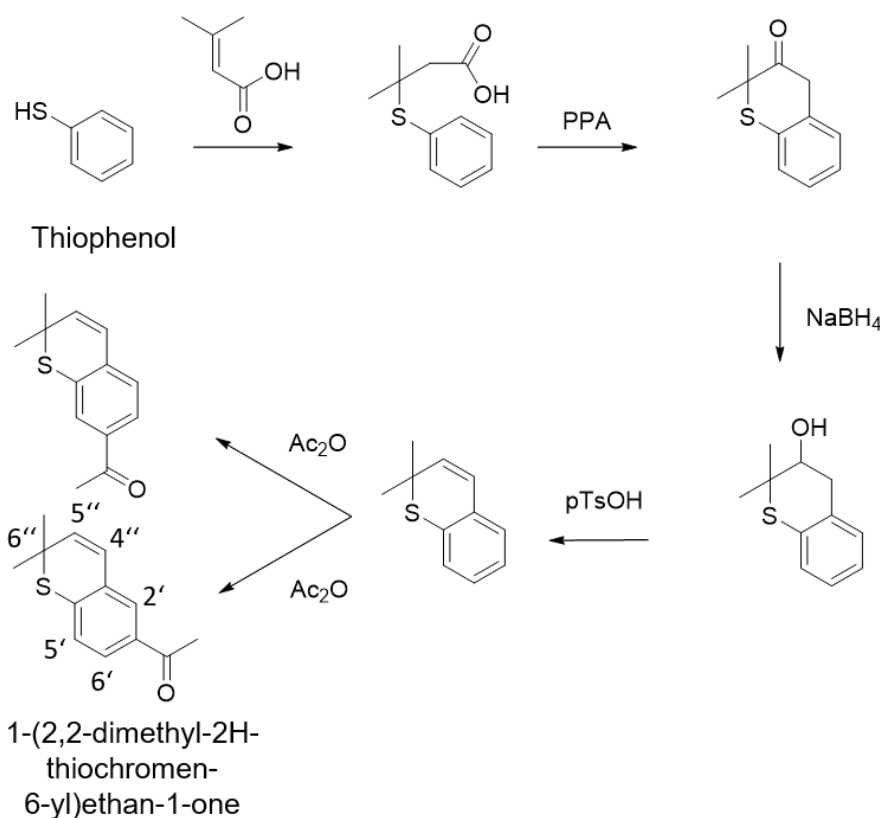


Abbildung 34: Syntheseweg zur Herstellung des A-Ring Derivats 1-(2,2-dimethyl-2H-thiochromen-6-yl)ethan-1-one aus Thiophenol.

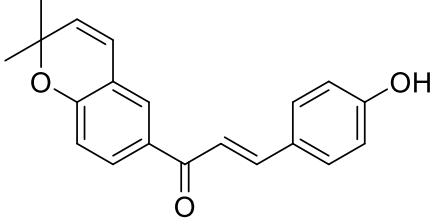
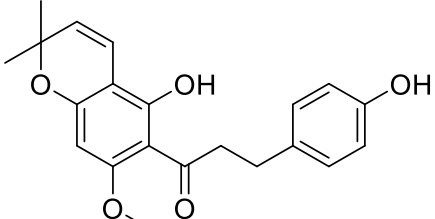
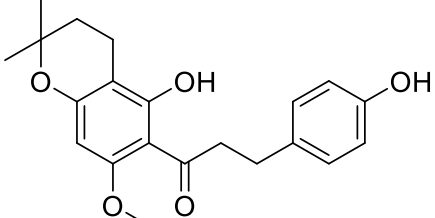
Die erfolgreiche Anlagerung der Acetylgruppe ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) konnte im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Das Produkt zeigte einen Massenpeak von  $m/z$  218. Bei der Anlagerung der Acetylgruppe gibt es mehrere mögliche Positionsisomere. Die gewünschte Position 4 konnte durch das  $^1\text{H-NMR}$  eindeutig zugeordnet werden. Dabei ist neben der Aufspaltung der einzelnen Peaks auch die Zahl der Protonen der Peaks ausschlaggebend. Entscheidend sind hierfür vor allem die Peaks der Protonen H-2', H-5' und H-6'. Im Produkt mit der Acetylgruppe an Position 4 spalten sich die Protonen H-5' und H-6' als Dubletts auf, die bei 7,30 ppm bzw. 7,74 ppm liegen. H-2' liegt als Singulett bei 7,79 ppm vor. Diese

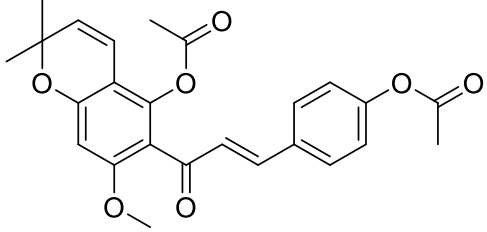
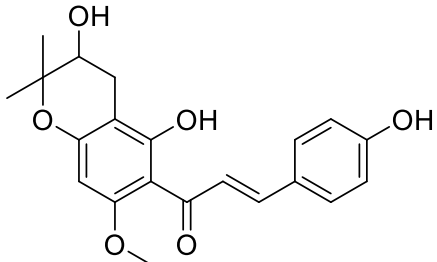
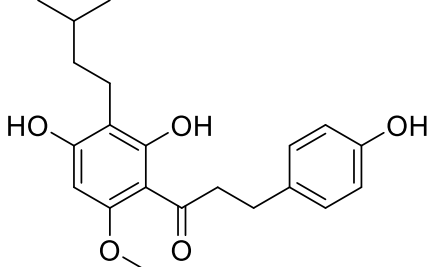
Aufspaltung wäre bei der Acetylierung an Position 3 äquivalent. Um beide Substanzen zu unterscheiden, wurden 2D-NMR Spektren aufgenommen. Bei der Produksubstanz mit der Acetylgruppe in Position 4 zeigte sich im HMBC-Spektrum eine eindeutige Wechselwirkung von H-2' mit den Protonen H-4'' und H-5'', welche bei der Substanz mit Acetylgruppe in Position 3 fehlt. Somit konnte die richtige Struktur des Thiochromans eindeutig bewiesen werden.

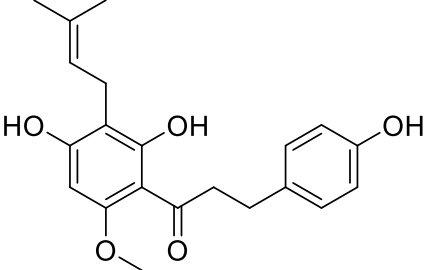
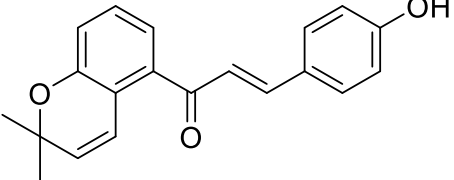
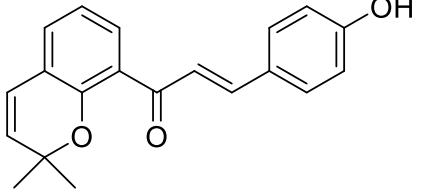
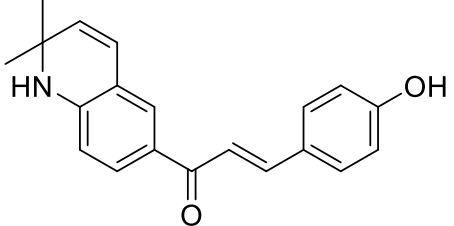
Ausgangsprodukte zur Synthese der B-Ring Derivate konnten meist käuflich erworben werden. Jedoch müssen freie Hydroxygruppen mit Chloromethyl-methyl-ether geschützt werden. Ohne diesen Schritt verringert sich die Ausbeute der Aldolkondensation signifikant. Um das Produkt zu erhalten, können die Schutzgruppen anschließend unter basischen Bedingungen bei 40 °C abgespaltet werden.

Um die Produkte aus den hergestellten A-Ringen und B-Ringen herzustellen, wurde – wie in Abbildung 31 gezeigt – eine basische Aldolkondensation durchgeführt. Da alle Produkte eine Chalkonstrukture mit  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung haben, äußert sich die erfolgreiche Kondensation neben dem Massenpeak im Massenspektrum auch im Vorhandensein der zusätzlichen Peaks der beiden Protonen dieser Doppelbindung. Diese Peaks liegen im Bereich bei 7,5-8,1 ppm (vgl. Tabelle 3).

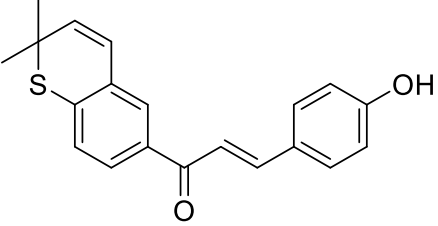
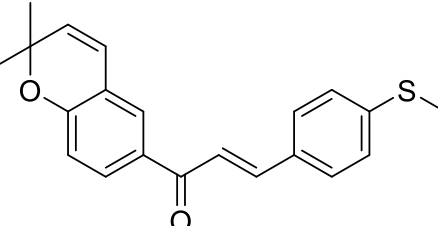
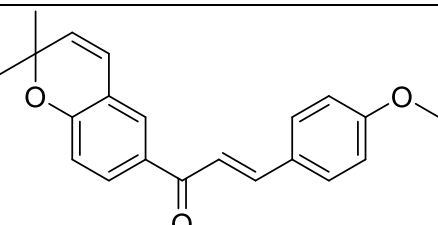
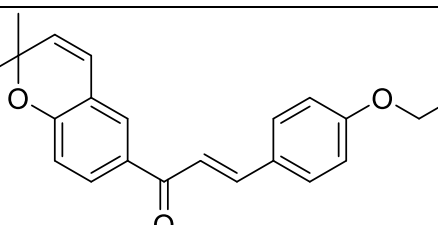
Tabelle 3: Vergleich der molaren Massen und der chemischen Verschiebung im  $^1\text{H-NMR}$  der Protonen der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung der synthetisierten Substanzen.

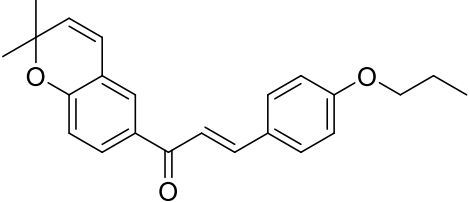
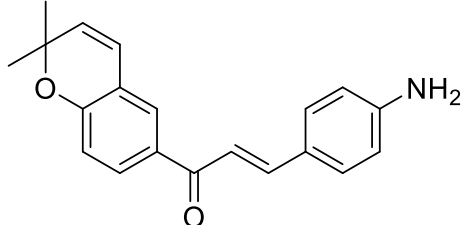
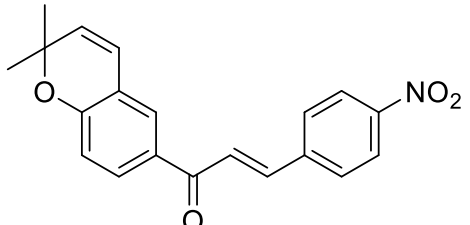
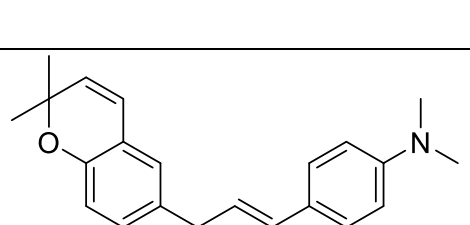
Struktur	Molare Masse g/mol	H- $\alpha$ , H- $\beta$ im $^1\text{H-NMR}$ / ppm
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 1)</p>	306	7.68 (m)
 <p>1-(5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one (Substanz 2)</p>	354	2.85 (ehemals $\beta$ ), 3.25 (ehemals $\alpha$ )
 <p>1-(5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethylchroman-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one (Substanz 3)</p>	356	2.88 (ehemals $\beta$ ), 3.18 (ehemals $\alpha$ )

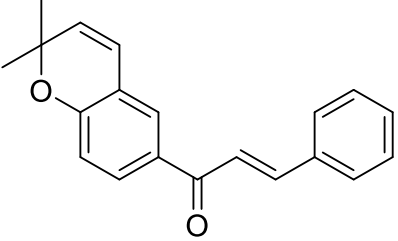
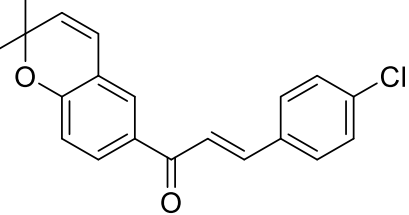
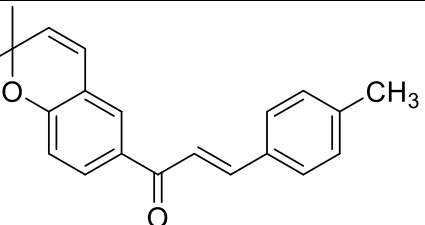
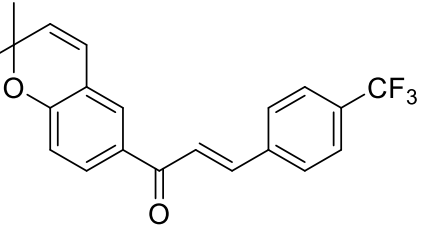
 <p>(E)-4-(3-(5-acetoxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl acetate (Substanz 4)</p>	436	7.62 ( $\alpha$ ), 8.06 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(3,5-dihydroxy-7-methoxy-2,2-dimethylchroman-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 5)</p>	370	7.60 ( $\alpha$ ), 7.92 ( $\beta$ )
 <p>1-(2,4-dihydroxy-3-isopentyl-6-methoxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one (Substanz 6)</p>	358	2.77 (ehemals $\beta$ ), 3.18 (ehemals $\alpha$ )

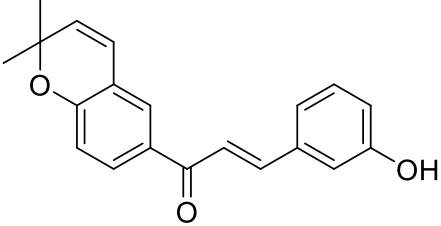
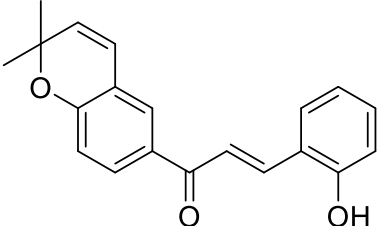
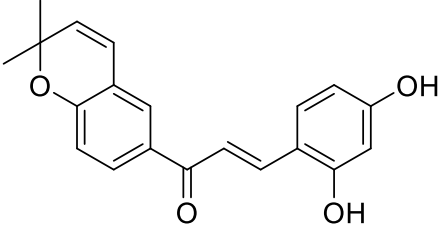
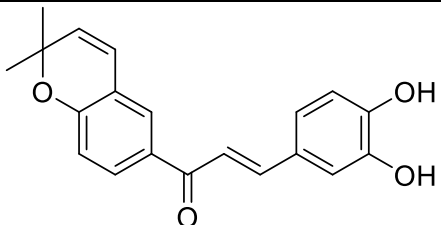
 <p>1-(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one (Substanz 7)</p>	356	2.85 (ehemals $\beta$ ), 3.22 (ehemals $\alpha$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-5-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 8)</p>	306	7.64 (m)
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-8-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 9)</p>	306	7.66 (m)
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-1,2-dihydroquinolin-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 10)</p>	305	7.63 (m)

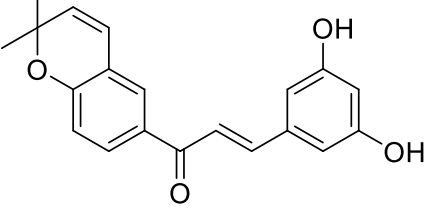
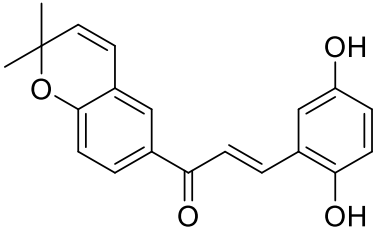
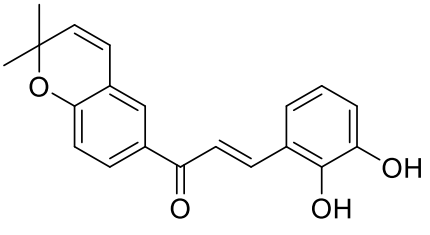


 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-thiochromen-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 11)</p>	322	7.70 (m)
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-(methylthio)phenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 12)</p>	336	7.73 ( $\alpha$ ), 7.82 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 13)</p>	320	7.72 (m)
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-ethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 14)</p>	334	7.71 (m)

 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-propoxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 15)</p>	348	7.72 (m)
 <p>(E)-3-(4-aminophenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 16)</p>	305	7.54 ( $\alpha$ ), 7.67 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 17)</p>	335	7.89 ( $\alpha$ ), 8.02 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 18)</p>	333	7.65 (m)

 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (Substanz 19)</p>	290	7.76 ( $\alpha$ ), 7.84 ( $\beta$ )
 <p>(E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 20)</p>	324	7.60 ( $\alpha$ ), 7.80 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(p-tolyl)prop-2-en-1-one (Substanz 21)</p>	304	7.74 ( $\alpha$ ), 7.79 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 22)</p>	358	7.55 (m)

 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(3-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 23)</p>	306	7.66 ( $\alpha$ ), 7.77 ( $\beta$ )
 <p>(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (Substanz 24)</p>	306	7.84 ( $\alpha$ ), 8.13 ( $\beta$ )
 <p>(E)-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 25)</p>	322	7.42 ( $\alpha$ ), 8.27 ( $\beta$ )
 <p>(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 26)</p>	322	7.87 ( $\alpha$ ), 7.94 ( $\beta$ )

 <p>(E)-3-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 27)</p>	322	7.56 ( $\alpha$ ), 7.68 ( $\beta$ )
 <p>(E)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 28)</p>	322	7.75 ( $\alpha$ ), 8.09 ( $\beta$ )
 <p>(E)-3-(2,3-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one (Substanz 29)</p>	322	7.81 ( $\alpha$ ), 8.12 ( $\beta$ )

### 4.3 Ergebnisse der Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen

Um genauere Aufschlüsse über wichtige Strukturelemente für die Aktivität der Differenzierungsinduktion zu erhalten, wurden unterschiedliche Modifikationen der Grundstruktur einer Struktur-Aktivitätsuntersuchung unterworfen. Dabei wurde von der bisher aktivsten Substanz - Xanthohumol C – ausgegangen. Es wurden verschiedene Hydrierungen im Molekül Xanthohumol C vorgenommen. Die Derivate unterschieden sich in der Hydrierung der Doppelbindung zwischen dem 4"- und 5"-C-Atom am A-Ring (Xanthohumol A) oder der  $\alpha$ -,  $\beta$ -Doppelbindung (Substanz 2) im Mittelteil der Ausgangssubstanz. Die Herstellung von Xanthohumol A erfolgte durch säurekatalysierten Ringschluss der Prenylgruppe von Xanthohumol. Die selektive Hydrierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ -Doppelbindung wurde mit Hilfe des auf Kupfer-basierenden Katalysators nach Stryker mit Diphenylsilan durchgeführt. Neben diesen beiden teilhydrierten Verbindungen wurde Xanthohumol C auch vollhydriert getestet (Substanz 3). Diese Verbindung wurde ausgehend von Xanthohumol C mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoffgas reduziert. Außerdem wurde ein voll-acetyliertes Derivat von Xanthohumol C (Substanz 4) und ein Derivat mit zusätzlicher Hydroxygruppe am A-Ring (Substanz 5) synthetisiert und getestet (vgl. Strukturen in Abbildung 35). Xanthohumol C zeigt eine differenzierungsauslösende Aktivität DIA = 5. Dieser Wert wurde bereits von Urmann im Rahmen ihrer Dissertation beschrieben [210]. Auch die Substanz 3 und Xanthohumol A wurden im Rahmen ihrer Arbeit untersucht. Xanthohumol A zeigte sowohl bei Urmann als auch in diesem Test keine signifikanten Unterschiede zu Xanthohumol C. Die Doppelbindung im A-Ring hat also keinen erheblichen Einfluss auf die Aktivität. Substanz 3 zeigte in dieser Untersuchung einen signifikant höheren Wert als die Referenzsubstanz Xanthohumol C. Jedoch sind die Renilla-Werte (vgl. Abbildung 36) deutlich niedriger als die Werte von Xanthohumol C. Folglich ist auch die Aktivität von Substanz 3 niedriger, was sich wiederum mit den Daten von Urmann deckt. Substanz 2 unterscheidet sich im Vergleich zu Xanthohumol C nur in der hydrierten  $\alpha$ , $\beta$ -Doppelbindung. Die Doppelbindung scheint kein notwendiges Strukturelement zu sein, da die DIA keine signifikanten Unterschiede zu Xanthohumol C aufweist. Die acetylierte Form (Substanz 4) zeigt zwar eine signifikant erhöhte DIA, jedoch sind auch hier die Renilla-Werte im Vergleich zu Xanthohumol C leicht erniedrigt. Das Derivat (Substanz 5) mit der zusätzlichen Hydroxylgruppe am A-Ring weist keine Differenzierungsinduzierende Aktivität auf. Die Form des A-Rings als Chromanring ist demnach wichtig für die Aktivität der Verbindung.

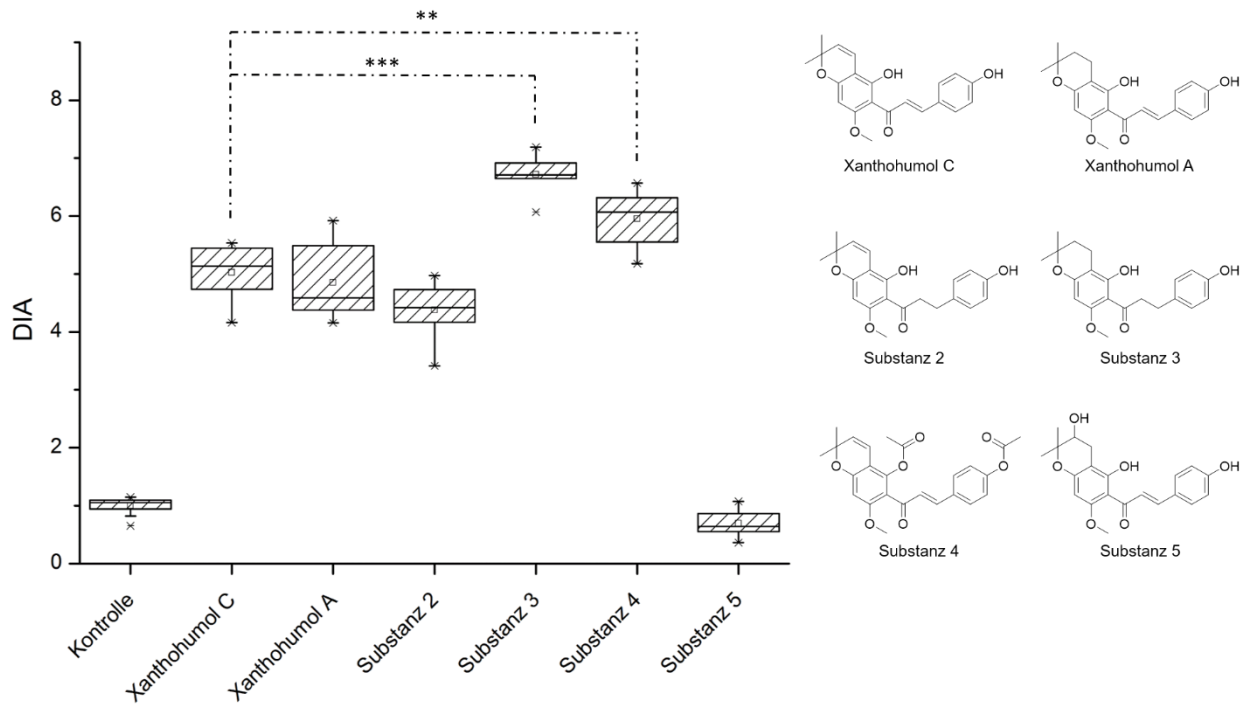


Abbildung 35: Differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol C-Derivaten, getestet in 10  $\mu\text{M}$ .

Bei der Betrachtung der Renilla-Werte der Xanthohumol C-Derivate (vgl. Abbildung 36) fallen besonders die hohen Werte von Substanz 5 auf. Möglicherweise verringert die zusätzliche Hydroxylgruppe die Zytotoxizität auf die Zellen. Die Werte von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zeigten auch keine signifikanten Unterschiede, diese Substanz scheint auch in höheren Konzentrationen nicht toxisch zu wirken. Bei den Substanzen 3, 4 und Xanthohumol A lagen die Renilla-Werte von 10  $\mu\text{M}$  unter den von 1  $\mu\text{M}$ . Die Toxizität der Verbindungen nimmt also in diesem Bereich konzentrationsabhängig zu. Substanz 2 zeigt bei beiden Konzentrationen den selben Renilla-Wert. Folglich wirkt die Substanz mit der hydrierten Doppelbindung in diesem Bereich auch in höheren Konzentrationen weniger toxisch auf die Zellen als die anderen getesteten Verbindungen.

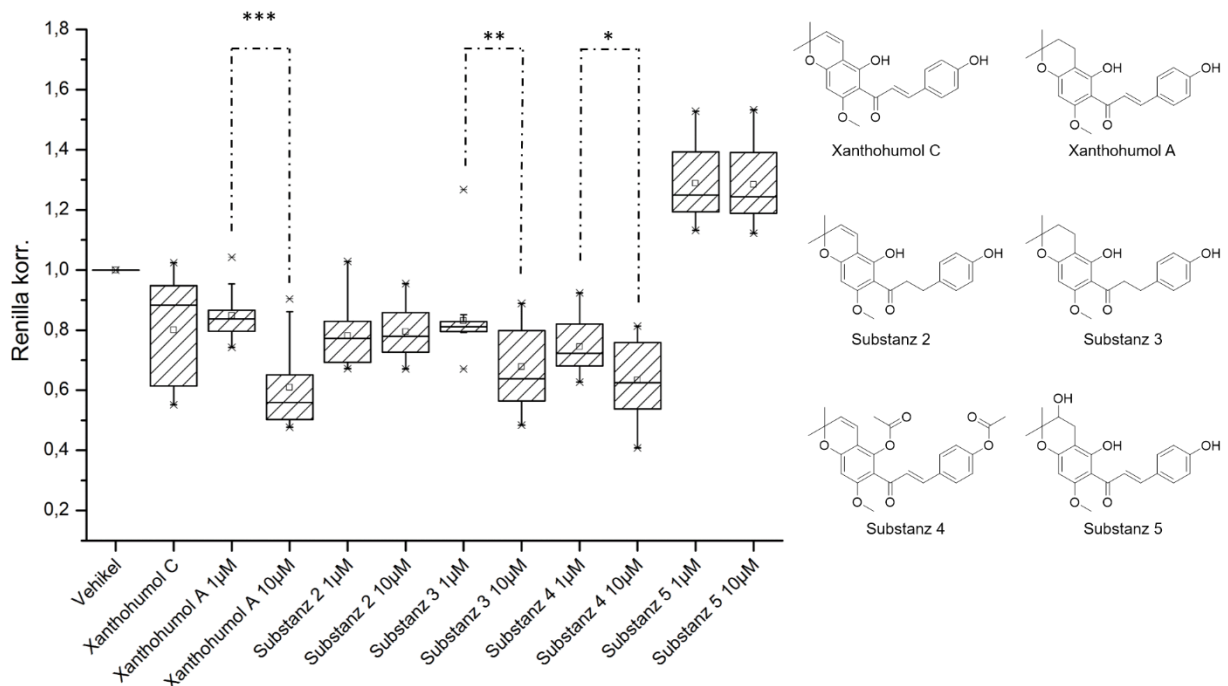


Abbildung 36: Normierte Renilla-Aktivität von Xanthohumol C-Derivaten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei der Variation der Xanthohumol C-Struktur das Hydrieren der Doppelbindungen nicht oder nur wenig auf die DIA auswirkt. Die Struktur des Chromanrings in Kombination mit der Chalkonstruktur scheint die größte Aktivität zu besitzen. Dabei spielt es anscheinend keine Rolle, ob die ursprüngliche Doppelbindung im A-Ring (4''-C, 5''-C) bzw. zwischen dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoff neben der Carbonylgruppe hydriert oder nicht-hydriert vorliegt. Die Aktivität ist bei allen Varianten im selben Bereich. Den größeren Effekt erkennt man bei der Toxizität auf die Zellen. Die Hydrierung der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung scheint sich positiv auf das Überleben der Nervenzellen auszuwirken, denn beide Substanzen mit hydrierter  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung haben höhere Renilla-Werte verglichen mit den nicht-hydrierten Formen.

Die Hydrierungsversuche wurden neben Xanthohumol C ebenfalls mit Xanthohumol durchgeführt. Dabei wurde Xanthohumol mit der vollständig hydrierten Form (Substanz 6) und dem Derivat mit hydrierter Doppelbindung (Substanz 7) verglichen (vgl. Strukturen in Abbildung 37). Aus Abbildung 37 geht hervor, dass Substanzen mit offenem Chromanring, d.h. mit normaler Prenylgruppe einen sehr schlechten Effekt auf die differenzierungsauslösende Aktivität hat. Damit konnten die Daten von Urmann über den positiven Effekt des Chromanrings auf die DIA bestätigt werden. Weder das Derivat mit beiden hydrierten Doppelbindungen (Substanz 6) noch die Hydrierung der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung (Substanz 7) konnten einen signifikanten Anstieg der DIA bewirken.



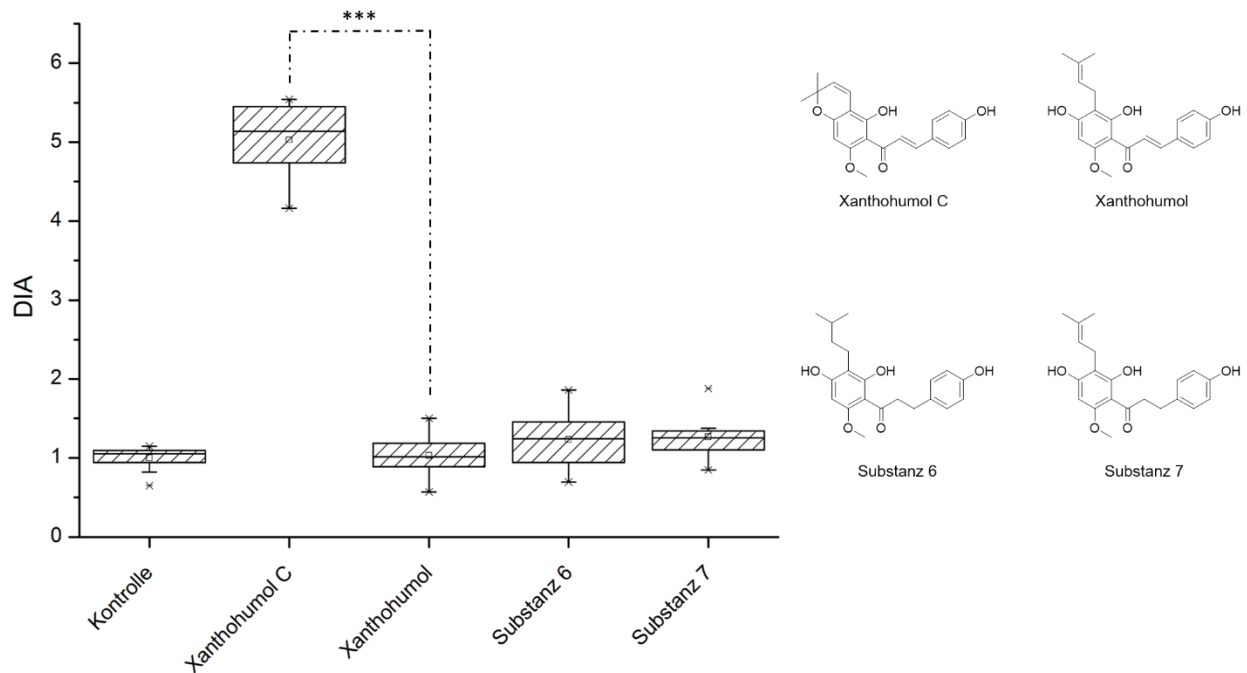


Abbildung 37: Differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol-Derivaten, getestet in 10  $\mu\text{M}$ .

Einzig auf die Renilla-Werten (vgl. Abbildung 38) zeigte die Hydrierung einen Einfluss. Während die vollhydrierte Form (Substanz 6) sich nicht signifikant von den Renilla-Werten von Xanthohumol C unterscheidet, fallen die Werte bei der teilweise hydrierten Form leicht ab. Die Ausgangssubstanz Xanthohumol zeigte einen starken Abfall der Renilla-Werte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die offene Prenylgruppe bei Xanthohumol und Substanz 7 sehr toxisch auf die Nervenzellen wirkt. Die Substanz 6 mit hydrierter Prenylgruppe wirkt hingegen nicht zytotoxisch. Hier zeigt auch die höhere Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) keine signifikant höhere Toxizität. Daraus lässt sich schließen, dass nur die Prenylgruppe, nicht aber die hydrierte Prenylgruppe zur Zytotoxizität auf die Nervenzellen beiträgt.

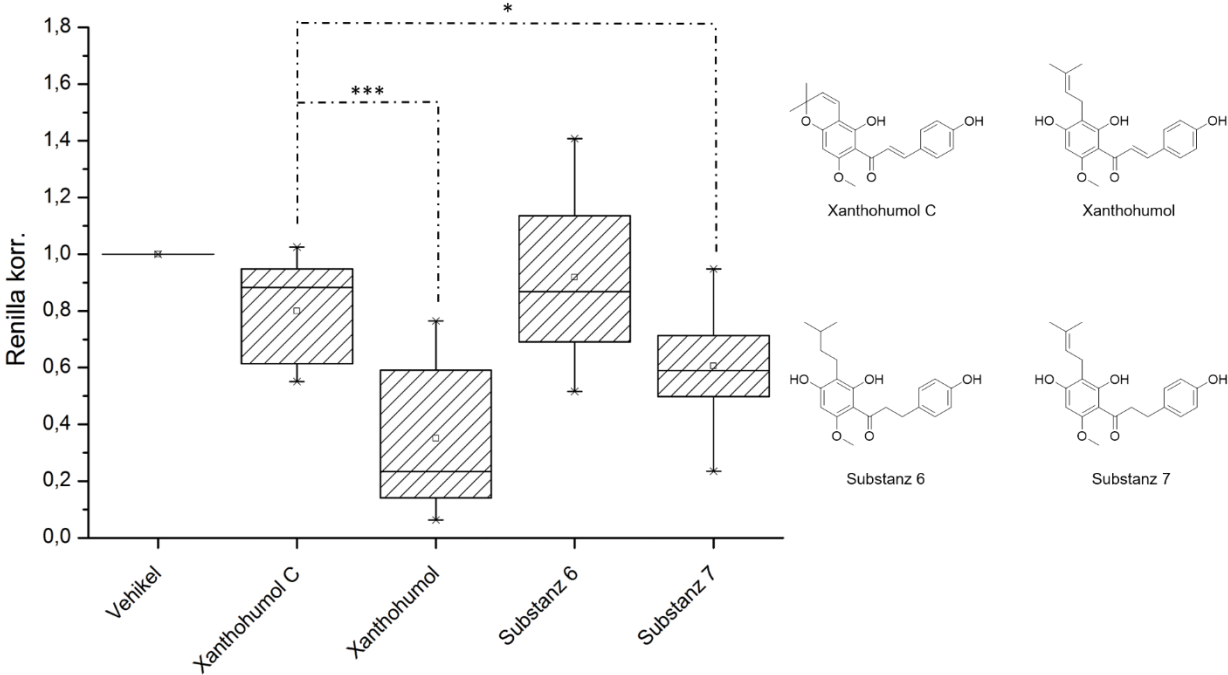


Abbildung 38: Normierte Renilla-Aktivität von Xanthohumol-Derivaten gemessen in 10 µM Konzentration.

## Variationen des A-Rings

Im Folgenden wurde die Bedeutung des A-Rings auf die differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht. Im Rahmen ihrer Dissertation zeigte Urmann bereits, dass die Substanz 1 (vgl. Strukturen in Abbildung 39) die Differenzierung zu Nervenzellen ebenso stark induziert wie dies bei Xanthohumol C der Fall ist. Beide Substanzen unterscheiden sich nur in der Substitution am A-Ring. Während Xanthohumol C eine Hydroxy- und eine Methoxygruppe in Position 2 bzw. 6 aufweist, ist der A-Ring von Substanz 1 nicht substituiert. Auch in dieser Arbeit wurde die DIA von Substanz 1 getestet. Das Ergebnis von Urmann konnte bestätigt werden (Abbildung 39). Dies zeigt, dass weder die Hydroxy- noch die Methoxygruppe am A-Ring ein essentielles Strukturelement für die Aktivität darstellt.

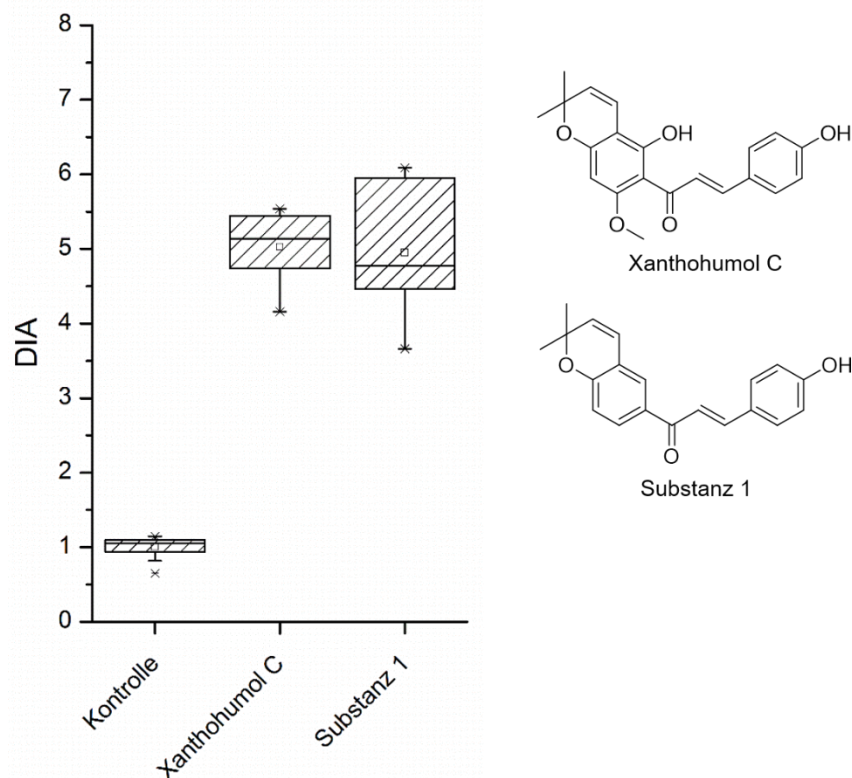


Abbildung 39: Differenzierungsinduzierende Aktivität von Xanthohumol C und Substanz 1 im Vergleich. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde im Folgenden die Grundstruktur von Substanz 1 modifiziert. Dabei wurden zwei Untersuchungsreihen der A-Ring Derivate durchgeführt. Ausgehend von 2-, 3- und 4-Hydroxyacetophenon wurden drei unterschiedliche A-Ring Derivate synthetisiert, bei denen das Sauerstoffmolekül an den Positionen 4', 5' oder 6' im Ring sitzt (vgl. Strukturen in Abbildung 42). Die unterschiedliche Nummerierung der Positionen des A-Ring Derivats und des Produkts der Aldolkondensation resultieren aus der Nomenklatur der Flavonoide. Abbildung 40 zeigt die Nummerierung der synthetisierten Chalkone.

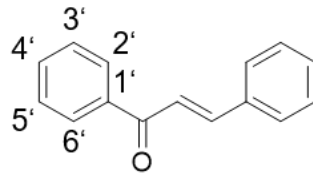


Abbildung 40: Schema der Nummerierung des A-Rings am Beispiel des E-Chalkons.

Durch das Fehlen der Hydroxygruppe in Position 2 bei allen Derivaten hat diese Struktur zudem den Vorteil, dass die intramolekulare Cyclisierung vom Chalkon zum Flavanon nicht möglich ist (vgl. Abbildung 41). Nach Urmann nimmt jedoch die DIA durch diese Umwandlung ab, wodurch sich die Grundstruktur von Substanz 1 positiv von der Xanthohumol C-Struktur unterscheidet.

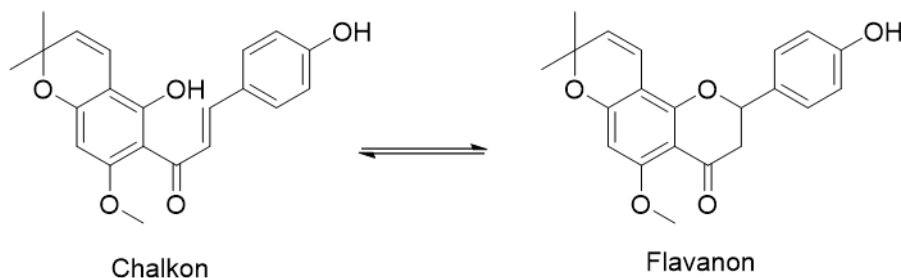


Abbildung 41: Gleichgewicht zwischen Chalkon und Flavanon am Beispiel von Xanthohumol C.

Aus Abbildung 42 erkennt man, dass die Position des Chromanrings am A-Ring einen erheblichen Einfluss auf die DIA hat. Während die Struktur von Substanz 1 mit dem Sauerstoffatom auf Position 4' im Ring eine DIA vergleichbar wie Xanthohumol C aufweist, sind die beiden anderen Substanzen mit dem Sauerstoff in Position 5' bzw. 6' signifikant schlechter. Beide Substanzen zeigen so gut wie keine Aktivität. Dies zeigt, dass die Position des Chromanrings bzw. des Sauerstoffatoms im Ring sehr entscheidend für die DIA ist. Folglich ist die Wirksamkeit des Derivats mit dem Grundgerüst der natürlichen Struktur von Xanthohumol C am besten für das Auslösen der Differenzierung geeignet.

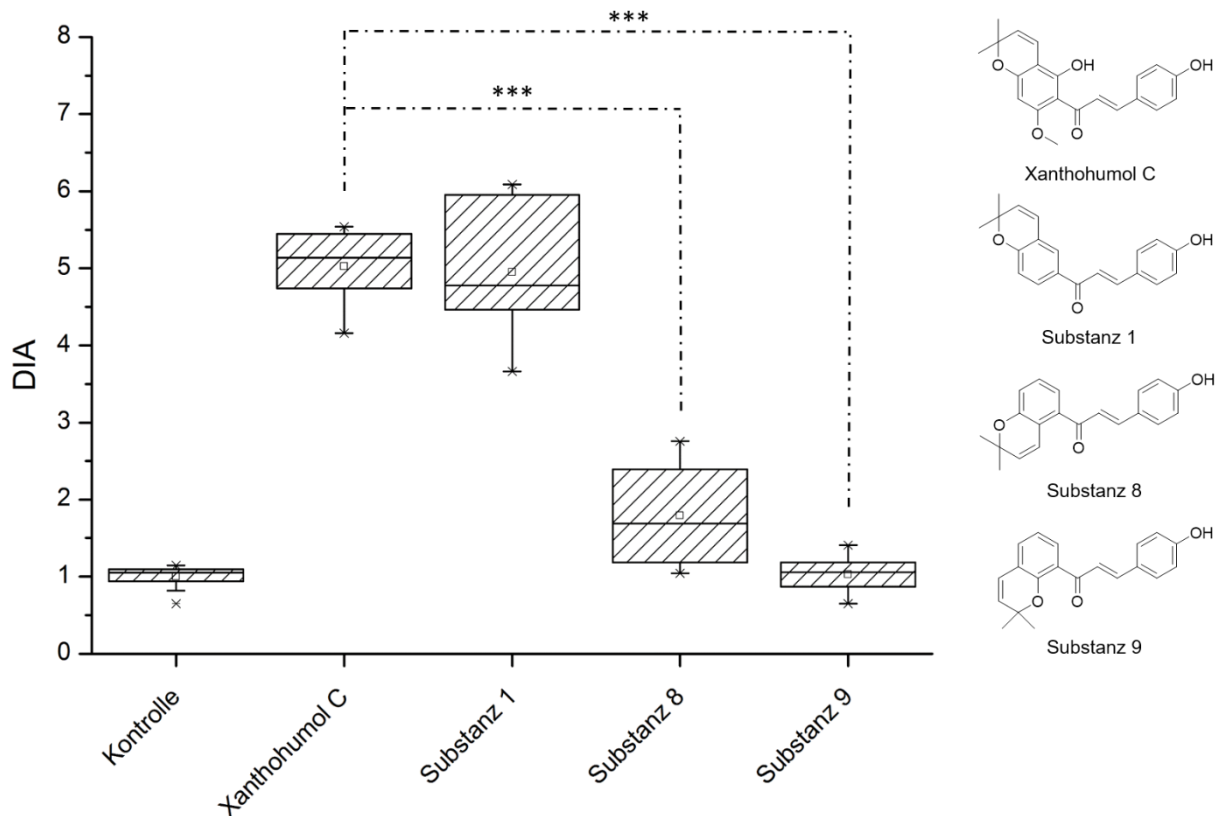


Abbildung 42: Differenzierungsinduzierende Aktivität der A-Ring Modifikationen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Bei der Betrachtung der Renilla-Werte der getesteten A-Ring Derivate zeigte sich, dass alle drei unterschiedlichen Verbindungen keine Zytotoxizität aufzeigen. Substanz 1 und Xanthohumol C liegen im gleichen Bereich. Die Substanzen 8 und 9 hingegen zeigen sogar signifikant höhere Renilla-Werte im Vergleich zur Kontrolle.

Die Veränderungen am A-Ring zeigten grundsätzlich keine negativen Auswirkungen auf die Renilla-Werte. Bei den zwei Verbindungen mit dem Sauerstoffatom in Position 4' (Xanthohumol C und Substanz 1) war eine leichte Abnahme der Renilla-Aktivität verglichen mit der Kontrolle zu verzeichnen. Die beiden anderen Verbindungen mit dem Sauerstoffatom in Position 6' (Substanz 9) bzw. 5' (Substanz 8) zeigten jedoch höhere Werte als die Referenz Xanthohumol C und lagen im Bereich der Kontrolle. Bei allen getesteten Substanzen waren keine (Substanz 8 und 9) beziehungsweise nur sehr kleine Unterschiede (Substanz 1) der Renilla-Aktivität zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Beide getesteten Konzentrationen wirkten also nicht zytotoxisch im getesteten Bereich. Es konnte auch keine konzentrationsabhängige Toxizität nachgewiesen werden.

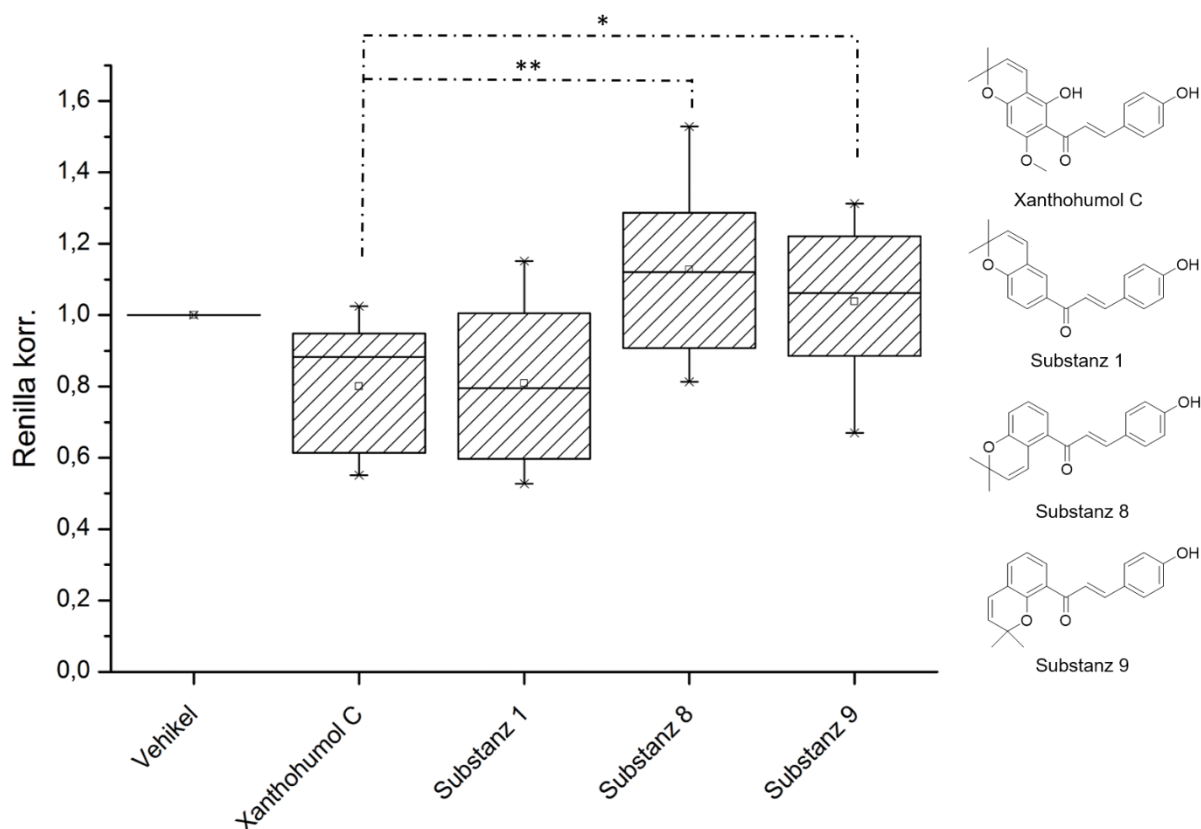


Abbildung 43: Normierte Renilla-Aktivität der A-Ring Derivate gemessen in 10  $\mu\text{M}$  Konzentration.

Da die Position 4' des Heteroatoms im Chromanring als die aktivste Position für die Differenzierungsinduktion festgestellt wurde, sollte der Einfluss des Elements an dieser Stelle getestet werden. Anstatt des Sauerstoffatoms wurde Stickstoff und Schwefel in den A-Ring eingebracht. Durch die unterschiedlichen Größen, Bindungseigenschaften und Elektronegativitäten der variierenden eingebrachten Heteroatome sollte der Einfluss auf die differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht werden. Verglichen wurde Xanthohumol C mit den Sauerstoff- (Substanz 1), Stickstoff- (Substanz 10) und Schwefel-Derivaten (Substanz 11) der Grundstruktur (vgl. Strukturen in Abbildung 44). Beim Vergleich der drei Substanzen zeigte sich, dass sowohl Sauerstoff als auch Stickstoff im A-Ring keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Referenzsubstanz Xanthohumol C auf die differenzierungsauslösende Aktivität haben. Allerdings waren die Renilla-Werte (vgl. Abbildung 45) von Substanz 10 signifikant niedriger als die Renilla-Werte der anderen getesteten Substanzen. Daraus resultierte zwar eine höhere DIA, die Aktivität der Differenzierungsinduktion erwies sich damit aber als nicht so groß wie bei Xanthohumol C bzw. Substanz 1, außerdem überleben weniger der gebildeten Nervenzellen. Das Schwefel-Analogon (Substanz 11) zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität. Möglicherweise wirkt sich der deutlich größere Atomradius von Schwefel im Vergleich zu Sauerstoff ( $66 \cdot 10^{-12} \text{ m}$  Sauerstoff,  $106 \cdot 10^{-12} \text{ m}$  Schwefel) negativ auf DIA aus.

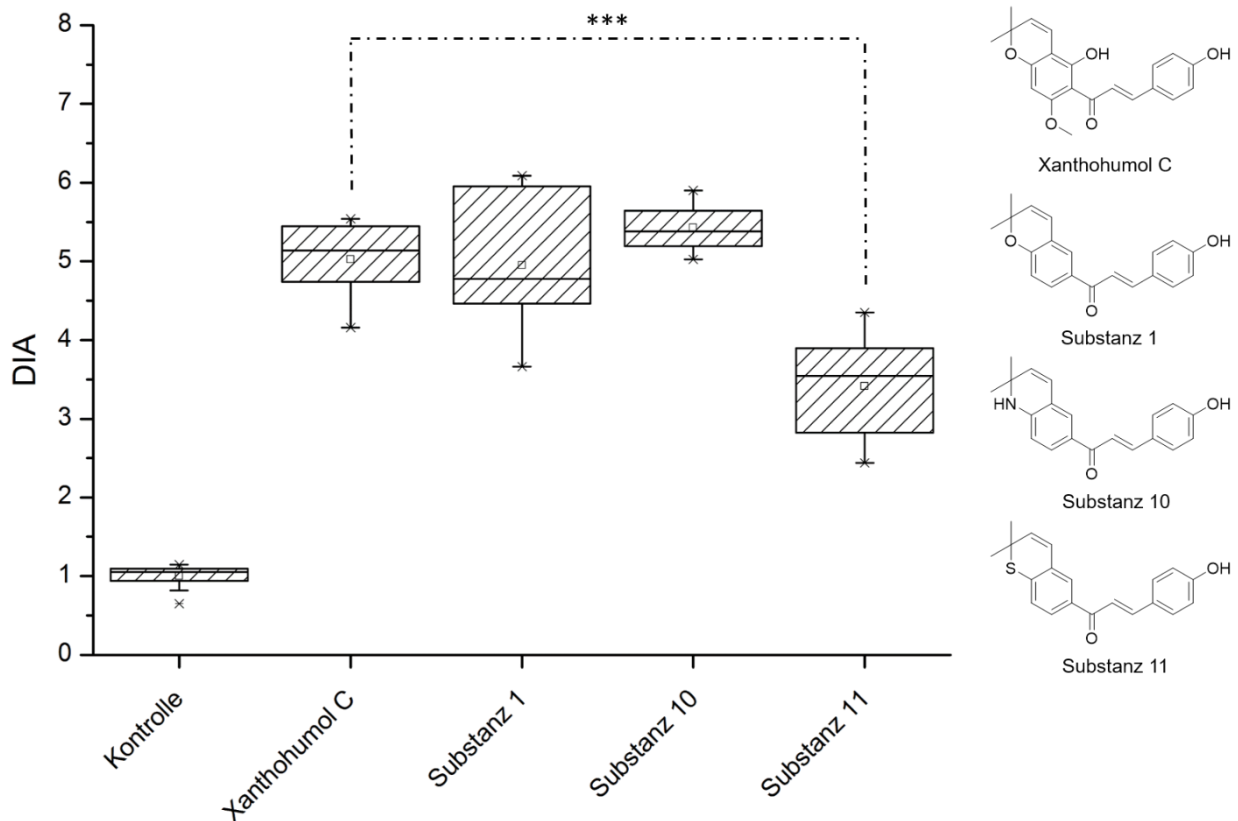


Abbildung 44: Differenzierungsinduzierende Aktivität der A-Ring Modifikationen mit verschiedenen Heteroatomen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Auch bei der Betrachtung der Toxizität der getesteten Substanzen sind Abweichungen erkennbar. Während sowohl Substanz 1 als auch 11 in 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Konzentration keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität zeigen, fällt die Zellzahl beim Stickstoff-Derivat (Substanz 10) signifikant ab. Beide Substanzen (10 und 11) wurden bis dato nicht in der Literatur beschrieben, weshalb auch keine weiteren Daten über diese Verbindungen bekannt sind. Aufgrund der signifikant niedrigeren differenzierungsinduzierenden Aktivitäten (Substanz 11) und Renilla-Werte (Substanz 10) eignen sie sich jedoch nicht als mögliche Leitstruktur für potentielle neuro-protektive Substanzen. Aufgrund der konzentrationsabhängigen Toxizität auf die Zellen könnte Substanz 10 möglicherweise als anti-kanzerogene Substanz Anwendung finden. Damit bleibt als A-Ring das Grundgerüst vom natürlich vorkommenden Xanthohumol C bzw. Substanz 1 die aktivste Verbindung.

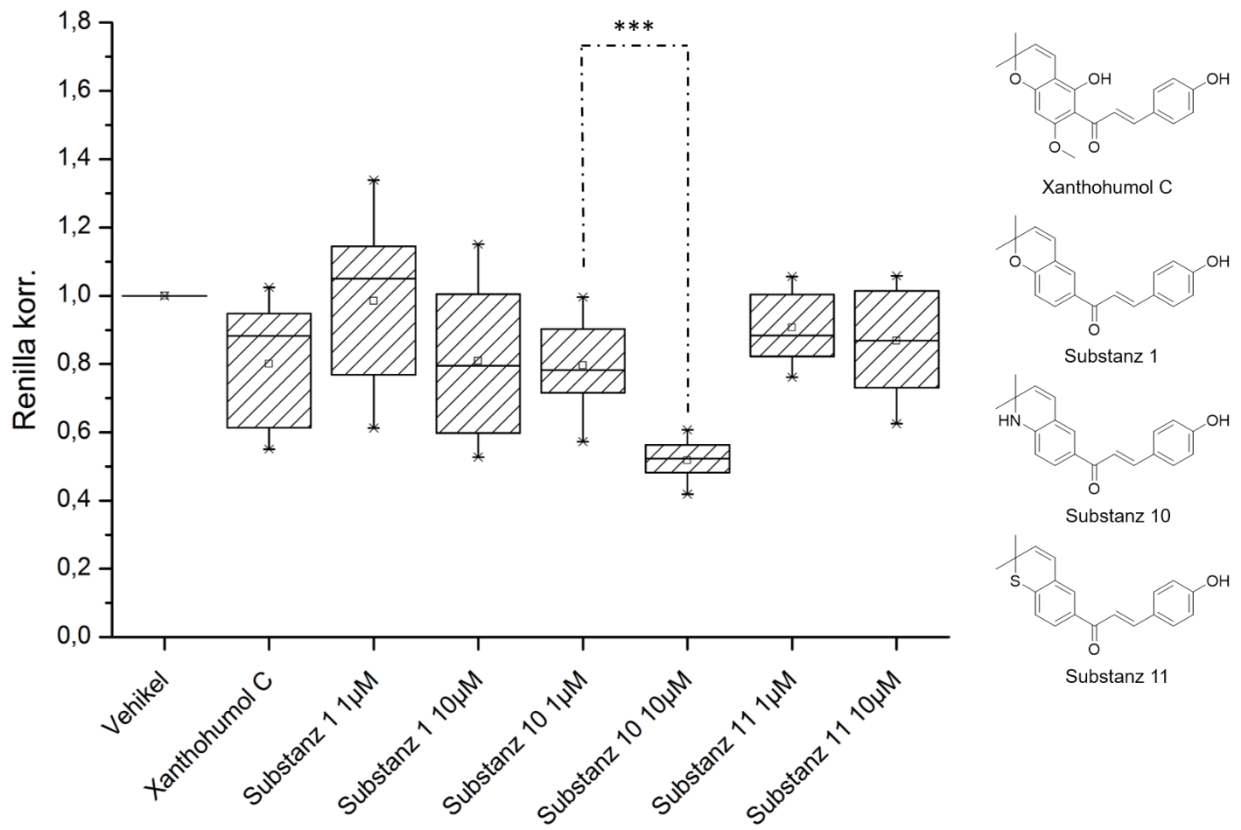


Abbildung 45: Normierte Renilla-Aktivität der A-Ring Derivate gemessen in 1 µM und 10 µM Konzentrationen.



### Variation des B-Rings

Im Folgenden soll der Einfluss des B-Rings auf die differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht werden. Durch die Blockierung der Hydroxylgruppe durch eine Methyl-, Ethyl- und Propylgruppe soll der Einfluss der Hydroxylgruppe auf die Aktivität bestimmt werden. Zudem wurde der Sauerstoff der dadurch entstandenen Methoxygruppe durch Schwefel ausgetauscht und mit den Ethern verglichen. Neben dieser Modifizierung der Kettenlänge wurden an Stelle der Hydroxylgruppe in Position 4 Stoffgruppen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften eingeführt. Dies soll den Einfluss der chemischen Umgebung näherbringen. Außerdem sollen der Effekt der Position sowie der Anzahl der Hydroxylgruppen auf die differenzierungsinduzierende Aktivität ermittelt werden.

Die Veränderungen der Kettenlänge an der Hydroxylgruppe an Position 4 wurde durch den Einsatz entsprechender Edukte in einer Aldolkondensation mit dem Chromanring (Substanz 12, 13 und 14) bzw. durch die Reaktion von n-Propanol mit Substanz 1 synthetisiert. Die getesteten Substanzen sind in Abbildung 46 dargestellt. Durch die Methode mit DIAD (vgl. Kapitel 6.3.2) konnten auch längere Ketten eingeführt werden. Diese wurden jedoch aufgrund der sehr geringen Wasserlöslichkeit nicht auf den Zellen getestet. Bei der Betrachtung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (vgl. Abbildung 46) zeigt sich, dass die Blockierung der Hydroxylgruppe an Position 4 einen sehr starken Abfall der Aktivität bewirkt. Die getesteten Verbindungen liegen allesamt im Bereich der Kontrolle und lösen damit keine Differenzierung zu Nervenzellen aus. Vergleicht man die Verbindungen untereinander, so stellt man fest, dass die Methoxygruppe (Substanz 13) und der Methyl-Thioether (Substanz 12) keine signifikanten Unterschiede in der DIA aufweisen. Je länger jedoch die eingebrachte Kette wird, desto niedriger wird die resultierende Aktivität. Der Ethylether (Substanz 14) und der Propylether (Substanz 15) zeigen signifikante Unterschiede der Aktivität im Vergleich mit dem Methylether bzw. dem Schwefelanalogon. Eine Verlängerung der Kette bringt also keinen Anstieg der Aktivität.

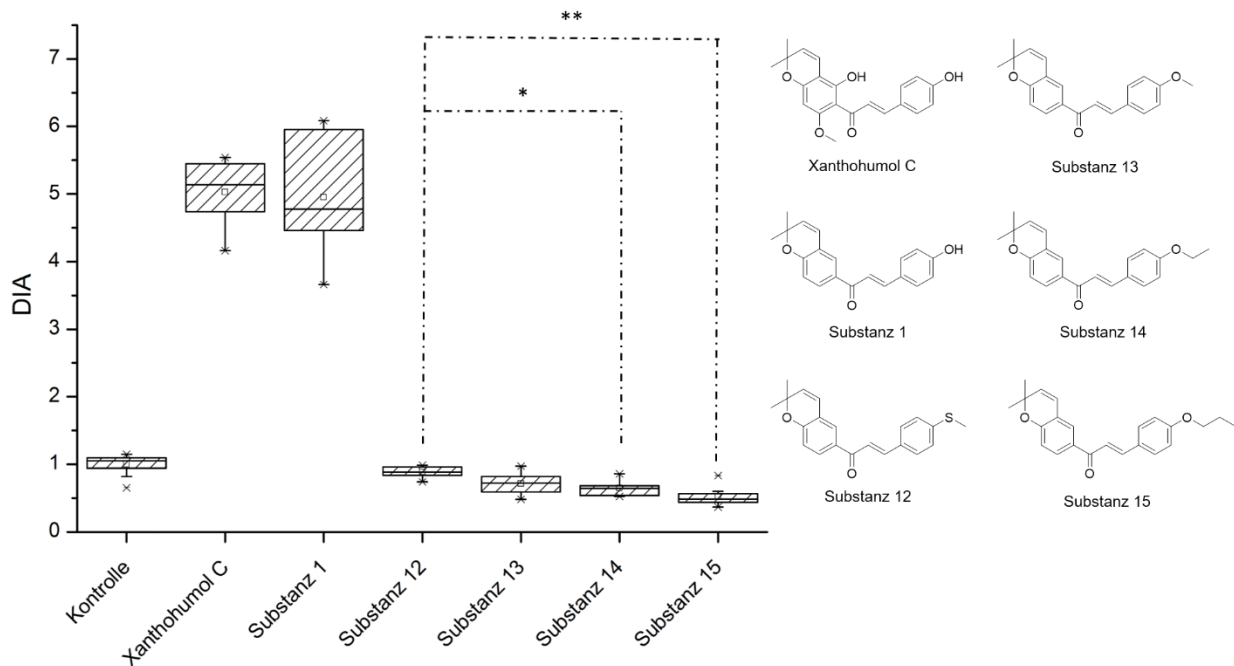


Abbildung 46: Differenzierungsinduzierende Aktivität der B-Ring Modifikationen mit unterschiedlichen Kettenlängen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Bei der Betrachtung der Toxizität der eingesetzten Substanzen wird deutlich, dass sich eine Verlängerung der Kette positiv auf die Zahl der überlebenden Zellen auswirkt. Während Substanz 12 (Methyl-Thioether) und Substanz 13 (Methylether) bei 1  $\mu\text{M}$  die gleichen Renilla-Werte wie Xanthohumol C zeigen, sinkt bei 10  $\mu\text{M}$  die Zahl der Zellen signifikant. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Substanz 14 (Ethylether) eine signifikante Erhöhung der Zellzahl beim Einsatz der höheren Konzentration. Substanz 15 (Propylether) zeigt auch bei der niedrigen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  schon eine signifikante Erhöhung der Zellzahl im Vergleich mit der Referenzsubstanz Xanthohumol C. Das Einbringen einer unpolaren Kette scheint sich demnach positiv auf die Renilla-Werte auszuwirken. Allerdings ist dieses Vorgehen in der praktischen Anwendung nicht sinnvoll, da zum einen die Firefly-Werte mit länger werdender Kette sinken, zum anderen die Wasserlöslichkeit der Verbindung immer geringer wird. Da die Substanz im wässrigen Milieu der Zellen eingesetzt werden soll, ist eine geringe Wasserlöslichkeit nicht geeignet.

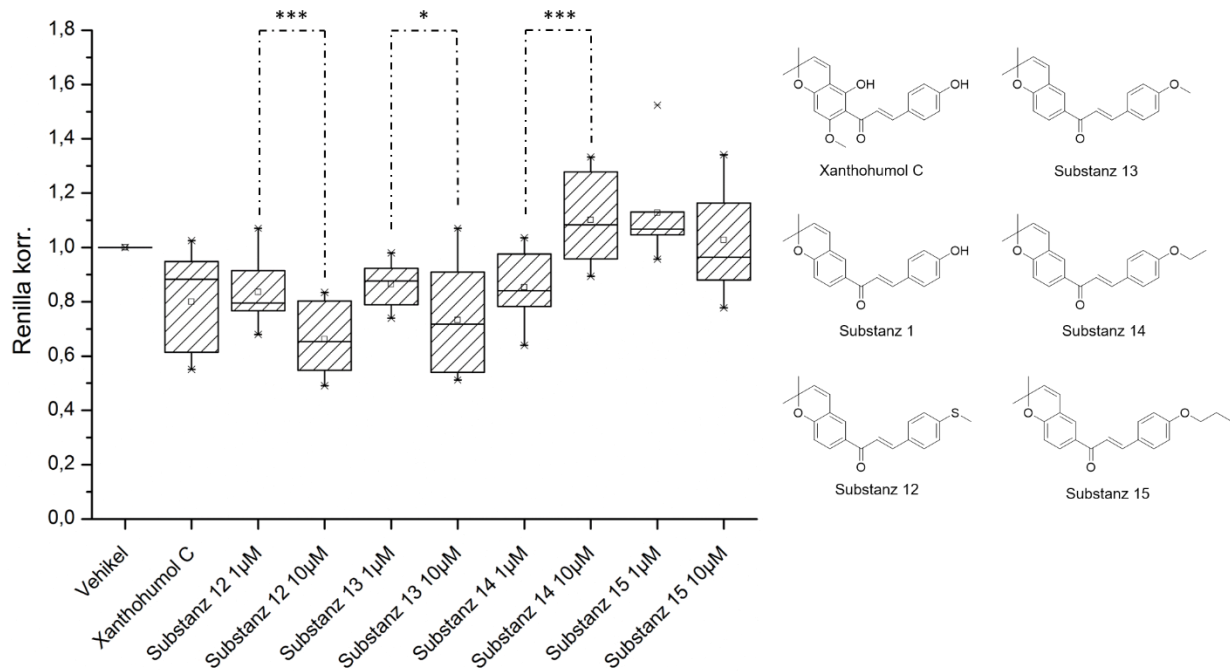


Abbildung 47: Normierte Renilla-Aktivität der B-Ring Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge gemessen in 1 µM und 10 µM Konzentrationen.

Im Folgenden wurde der Einfluss des Austauschs von Sauerstoff durch Stickstoff am B-Ring auf die differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht. Dabei wurden drei Derivate synthetisiert: Aminogruppe (Substanz 16), Nitrogruppe (Substanz 17) und Dimethylamino-Gruppe (Substanz 18). Die Strukturen sind in Abbildung 48 abgebildet. Die DIA der eingesetzten Substanzen wurden neben der Referenz Xanthohumol C aufgetragen (vgl. Abbildung 48). Die Substanz 16 (Aminogruppe) zeigt zwar eine signifikante Erniedrigung der differenzierungsinduzierenden Aktivität, liegt aber mit ca. 2.5 noch in einem Bereich, bei dem man von der Differenzierung neuer Neuronen sprechen kann. Die Substanzen 17 (Nitrogruppe) und 18 (Dimethylamingruppe) zeigen dagegen kaum mehr eine Differenzierung. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen der veränderten Kettenlänge. Wie beim Sauerstoff scheint sich auch beim Stickstoff das Blockieren des Atoms mit einer Methylgruppe sehr negativ auf die Aktivität auszuwirken. Dabei ist die Nitrogruppe mit den endständigen Sauerstoffmolekülen signifikant aktiver als die endständigen Methylgruppen. Diese liegt – wie schon beim Sauerstoff-Analogon – im Bereich der Kontrolle und löst damit keine Differenzierung aus.

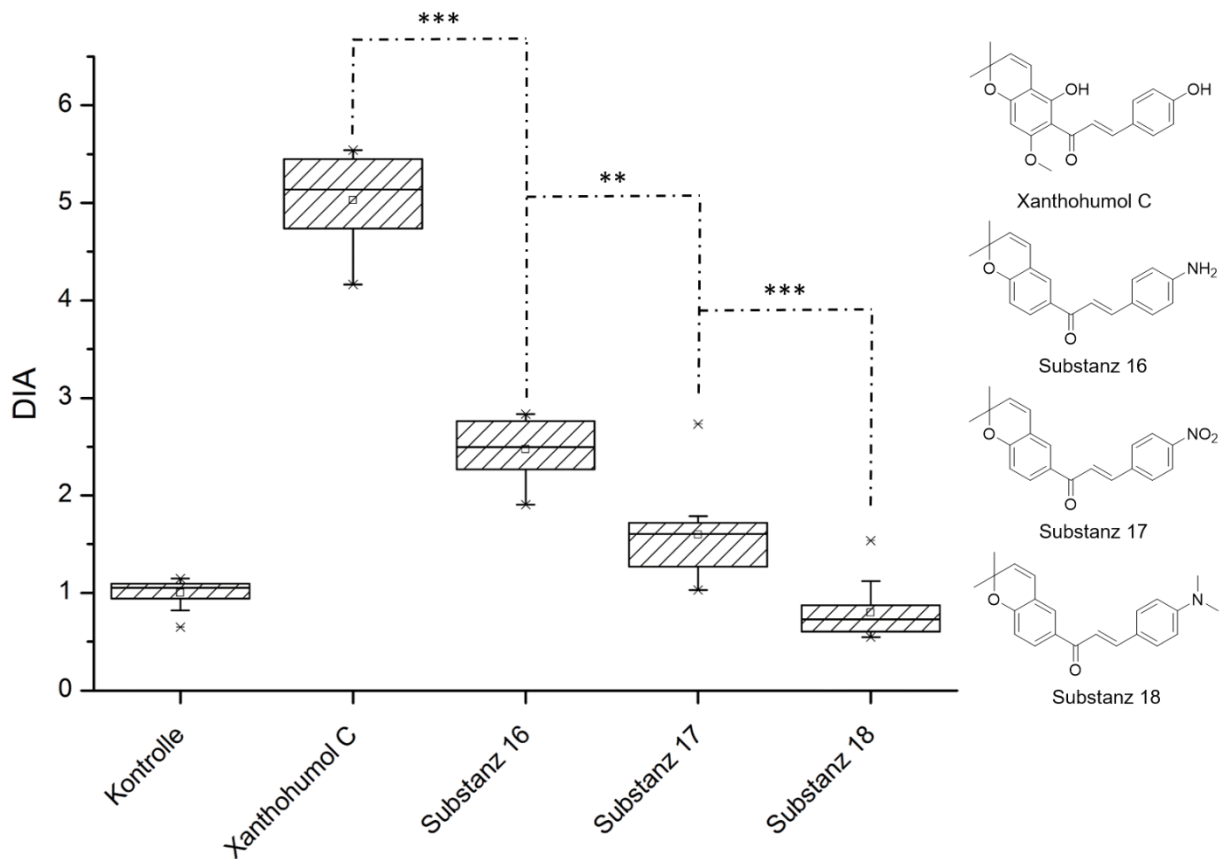


Abbildung 48: Differenzierungsinduzierende Aktivität der B-Ring Modifikationen mit Stickstoff im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Bei der Betrachtung der Zytotoxizität der eingesetzten Verbindungen auf die Zellen (vgl. Abbildung 49) zeigt sich, dass alle Stickstoff-Derivate keine signifikant niedrigeren Renilla-Werte haben. Substanz 16 (Aminogruppe) und Substanz 17 (Nitrogruppe) liegen im selben Bereich wie die Referenzsubstanz Xanthohumol C. Dabei zeigen die getesteten Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  keine signifikanten Unterschiede. Substanz 18 (Dimethylamingruppe) zeigt leicht erhöhte Renilla-Werte, jedoch auch keine konzentrationsabhängigen Unterschiede im hier betrachteten Bereich.

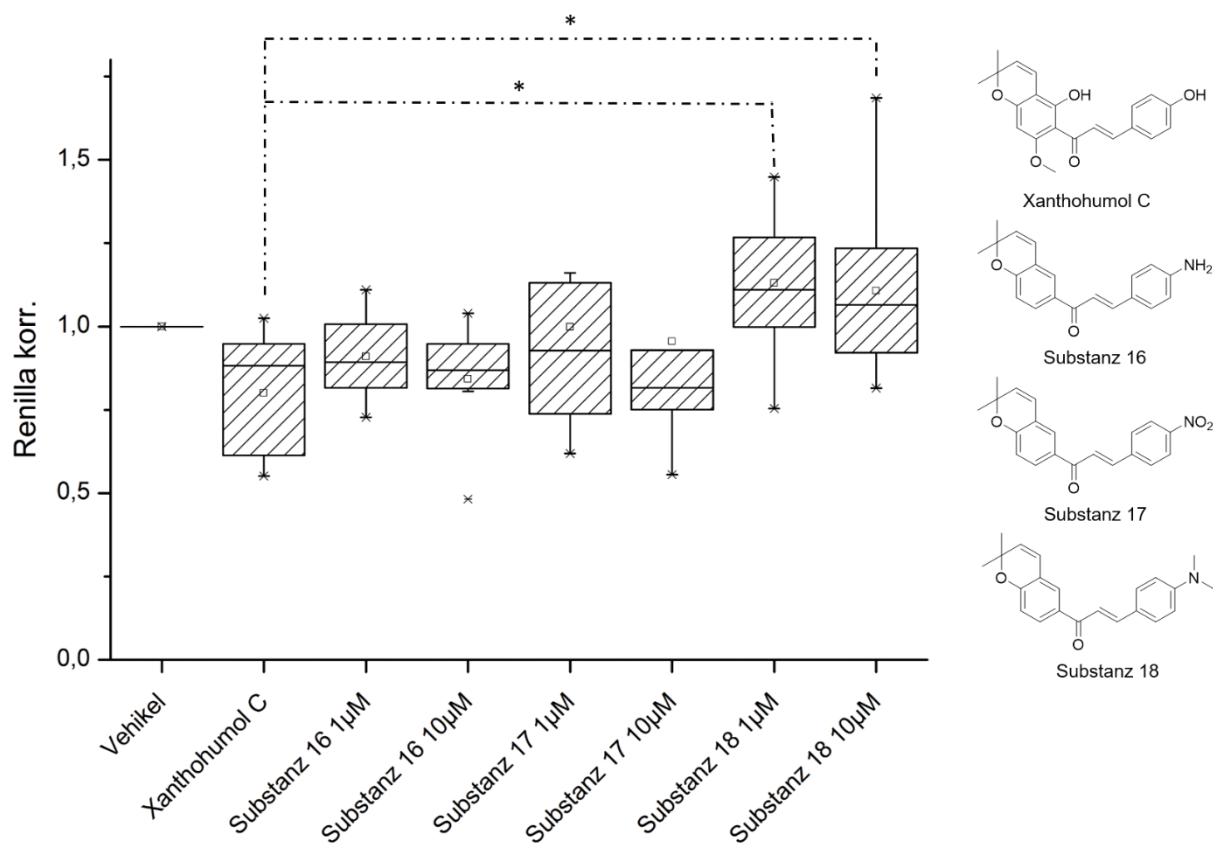


Abbildung 49: Normierte Renilla-Aktivität der B-Ring Modifikation mit Stickstoff gemessen in 1 µM und 10 µM Konzentration.

Gruppen mit Stickstoff als Ersatz für die Hydroxylgruppe zeigten keine Verbesserung der DIA. Alternativ dazu sollen Gruppen mit unterschiedlichen induktiven Effekten getestet werden. Substanz 19 hat nur ein Wasserstoffatom, also keine funktionelle Gruppe in Position 4. Diese Verbindung zeigt weder einen positiven noch einen negativen induktiven Effekt. Bei Substanz 20 befindet sich ein Chloratom mit negativem induktivem Effekt. Substanz 21 dagegen besitzt mit einer Methylgruppe einen positiven induktiven Effekt. Die Substanz 22 besitzt an der Position 4 eine Trifluoromethylgruppe. Diese weist wie die Chloridgruppe einen negativen induktiven Effekt auf. Außerdem wird die  $CF_3$ -Gruppe oft eingesetzt, um Verbindungen über die Blut-Hirn-Schranke zu bringen. Die Blut-Hirn-Schranke lässt nur unpolare Verbindungen passieren, wodurch sich die lipophilere  $CF_3$ -Gruppe besser eignet als die Hydroxylgruppe. Bei der Betrachtung der differenzierungsinduzierenden Aktivität zeigt sich, dass keine funktionelle Gruppe in Position 4 (Substanz 19) zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität führt (vgl. Abbildung 50). Jedoch liegen die gemessenen Renilla-Werte (Abbildung 51) dieser Verbindung deutlich unter denen der Referenz Xanthohumol C, wodurch sich dieser Wert der Aktivität relativiert. Die Aktivitäten der Substanzen 20, 21 und 22 weichen signifikant nach unten ab verglichen mit Xanthohumol C. Dabei ist das Chloratom als Substituent in Position 4 noch aktiver als die Trifluoromethylgruppe, welche im selben Bereich wie die Kontrolle liegt. Sowohl die Chlorid-, als auch die  $CF_3$ -Gruppe haben einen negativ induktiven Effekt. Der

positiv inductive Effekt der Methylgruppe (Substanz 21) liegt annähernd im Bereich von Substanz 20 und 22 und zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität.

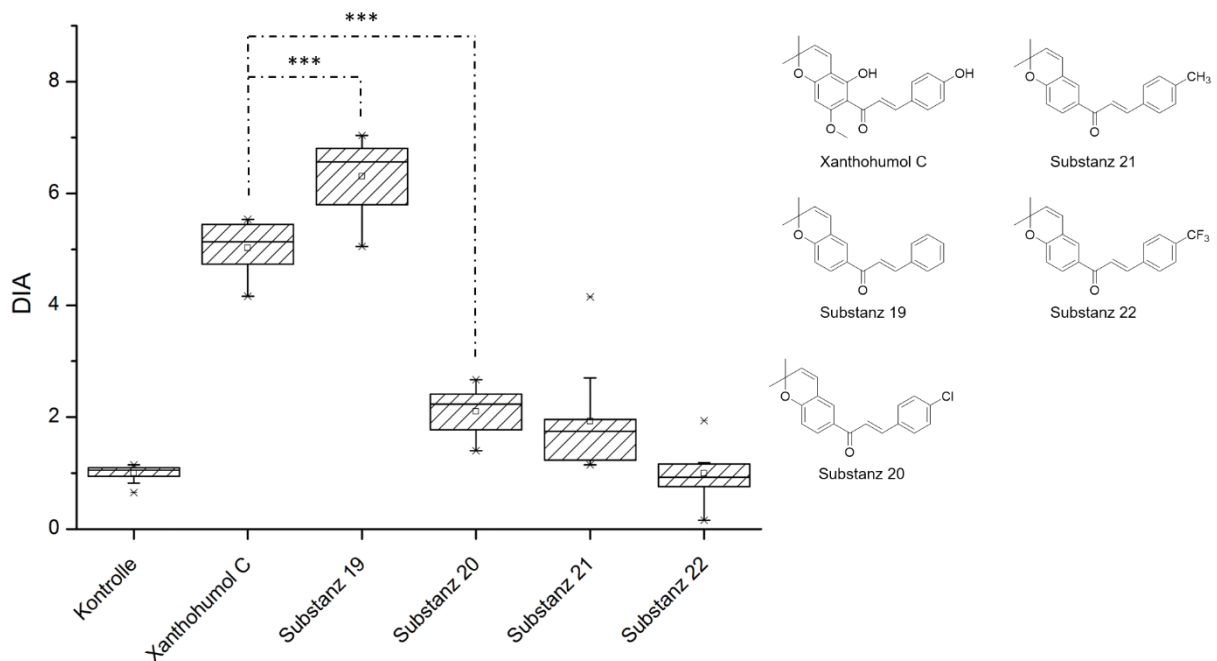


Abbildung 50: Differenzierungsinduzierende Aktivität der B-Ring Modifikationen mit Heteroatomen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Wie bereits beschrieben fällt der Renilla-Wert von Substanz 19 signifikant im Vergleich zu Xanthohumol C ab (vgl. Abbildung 51). Dabei liegt der Wert der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  noch im Bereich von 10  $\mu\text{M}$  der Referenz Xanthohumol C, während 10  $\mu\text{M}$  um fast die Hälfte abgesunken ist. Im Gegensatz dazu liegt der Renilla-Wert des Chlorid-Derivats signifikant höher als Xanthohumol C. Zwar ist eine konzentrationsabhängige Toxizität der Verbindung erkennbar, allerdings liegt der Wert von 10  $\mu\text{M}$  noch höher als der Wert der Referenz. Die Methyl- (Substanz 21) bzw. Trifluoromethyl-Gruppe (Substanz 22) zeigt in den gemessenen Konzentrationen keine Unterschiede in der Toxizität. Beide Renilla-Werte liegen im Bereich der Referenz. Im durchgeführten Test konnte kein positiver Einfluss des induktiven Effekts auf die differenzierungsinduzierende Aktivität festgestellt werden. Sowohl die funktionellen Gruppen mit positiv als auch mit negativ induktivem Effekt hatten signifikante Unterschiede der Aktivität zur Folge. Einzig bei den Renilla-Werten zeigt sich, dass ein Substituent am B-Ring die Zytotoxizität verringert.

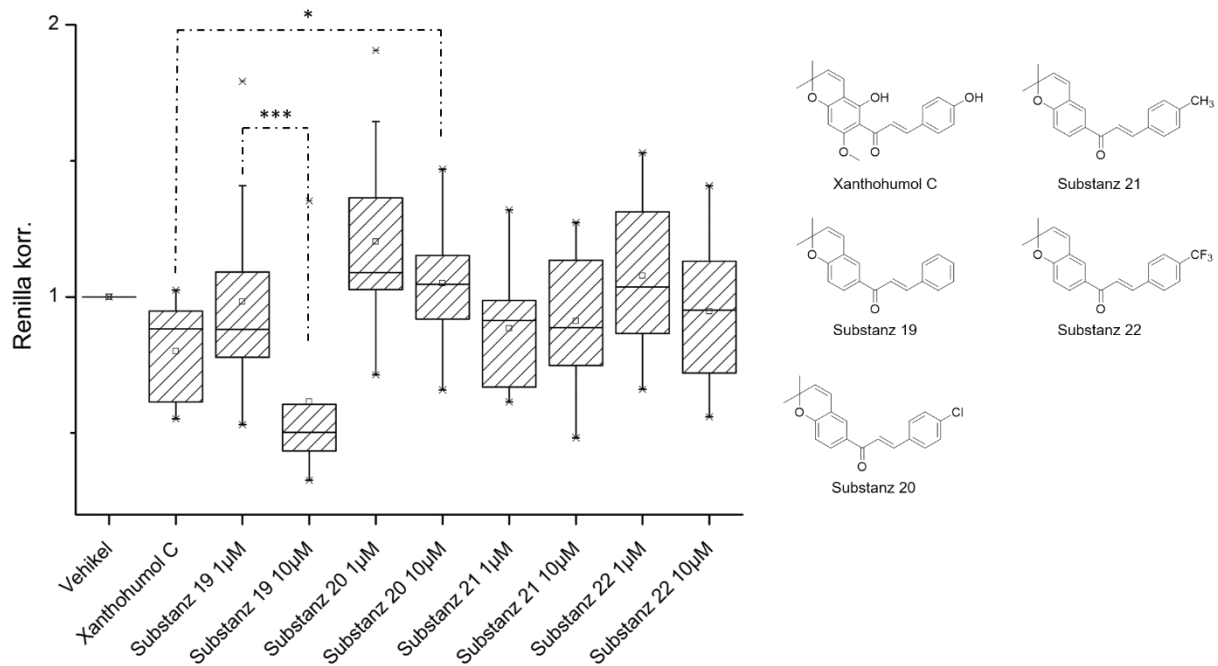


Abbildung 51: Normierte Renilla-Aktivität der B-Ring Modifikation mit Heteroatome gemessen in 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Konzentration.

Nachdem bereits unterschiedliche funktionelle Gruppen an Stelle der Hydroxylgruppe getestet wurden, soll im Folgenden die Position der Hydroxylgruppe variiert werden. Dabei wurden drei Substanzen mit einer Hydroxylgruppe am B-Ring in Position 2 (Substanz 24), 3 (Substanz 23) und 4 (Substanz 1) synthetisiert und auf die Zellen gegeben. Aus den Ergebnissen aus Abbildung 52 erkennt man, dass die Hydroxylgruppe ein sehr wichtiges Strukturelement für die differenzierungsinduzierende Aktivität ist. Alle drei Substanzen liegen mindestens in der Größenordnung der Referenz Xanthohumol C. Substanz 1 mit der Hydroxylgruppe an Position 4 hat – wie bereits aus den Ergebnissen der A-Ring Variation bekannt – dieselbe differenzierungsinduzierende Aktivität wie Xanthohumol C. Substanz 23 zeigt eine leicht erhöhte DIA, was sich jedoch aufgrund der sehr niedrigen Renilla-Werte (Abbildung 54) relativiert. Durch die hohe Zytotoxizität sterben zu viele neugebildete Neuronen. Substanz 24 mit der Hydroxylgruppe in Position 2 zeigt eine sehr signifikant höhere differenzierungsinduzierende Aktivität verglichen mit der Referenz. Zwar liegen auch hier die Renilla-Werte unter denen von Xanthohumol C, nichtsdestotrotz übersteigt die Aktivität von Substanz 24 die Aktivität von Xanthohumol C.

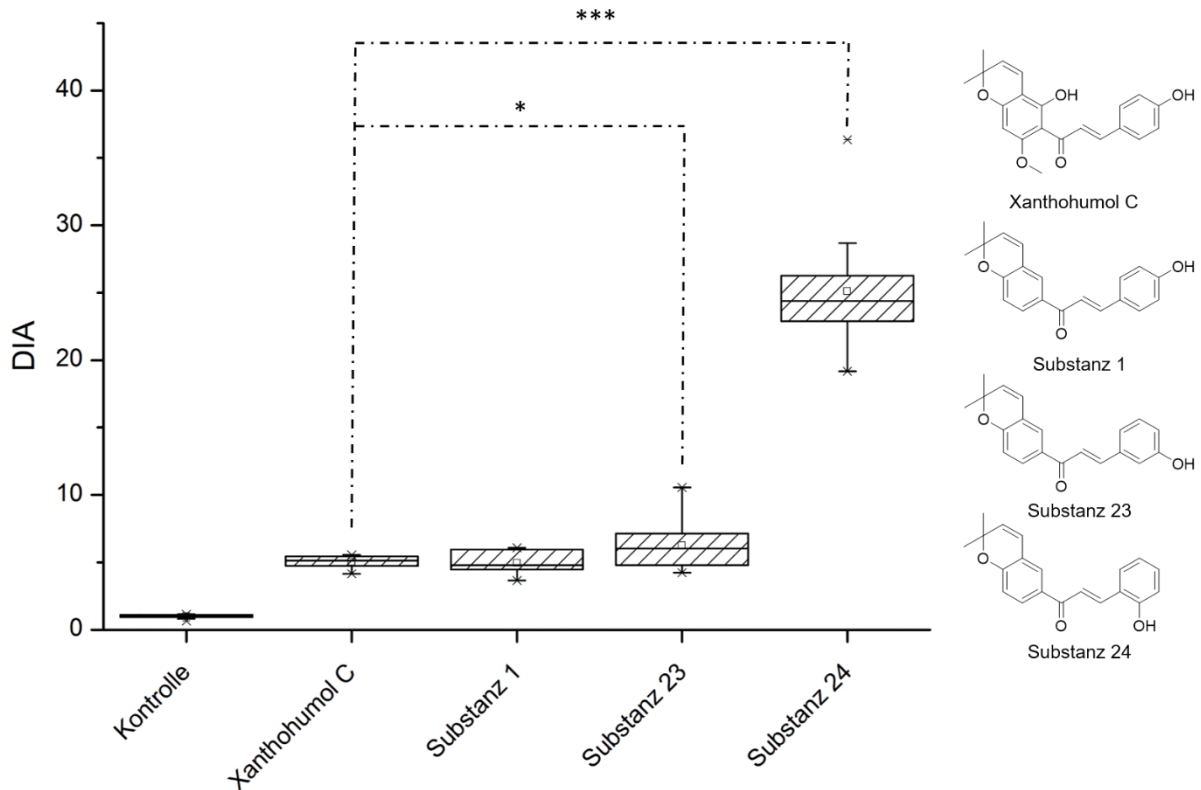


Abbildung 52: Differenzierungsinduzierende Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen der Hydroxylgruppe im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Deutlicher wird dieser Trend beim Vergleich einer niedrigeren Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) von Substanz 24 mit 10  $\mu\text{M}$  Xanthohumol C. Abbildung 53 zeigt die differenzierungsinduzierende Aktivität der beiden Verbindungen. Dabei liegt Substanz 24 auch in 1  $\mu\text{M}$  Konzentration signifikant über der Referenz 10  $\mu\text{M}$  Xanthohumol C. Zudem liegt der Renilla-Wert von Substanz 24 bei 1  $\mu\text{M}$  im selben Bereich wie der der Referenz. Dies zeigt, dass die Stellung der Hydroxylgruppe einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Aktivität hat. Dabei scheint die Position 2 der Hydroxylgruppe sehr geeignet für die Differenzierungsinduktion zu sein.



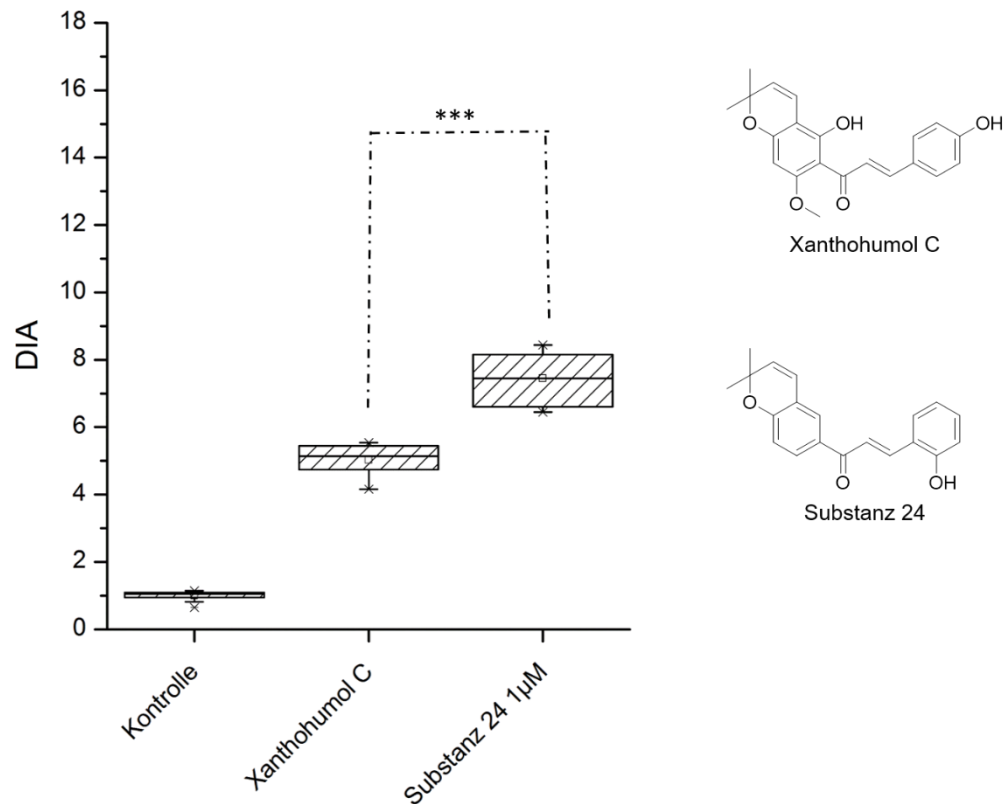


Abbildung 53: Differenzierungsinduzierende Aktivität von Substanz 24 (1 µM) im Vergleich zu Xanthohumol C (10 µM).

Die Renilla-Werte der Modifikationen der Hydroxylgruppen zeigen sowohl in Position 2 (Substanz 24) als auch in Position 3 (Substanz 23) und Position 4 (Substanz 1) einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Zytotoxizität. Bei allen drei Substanzen liegen die am niedrigsten getesteten Konzentrationen (1 µM) im selben Bereich wie 10 µM der Referenz Xanthohumol C. Bei der höheren Konzentration verringert sich die Zellzahl signifikant im Vergleich zu Xanthohumol C.

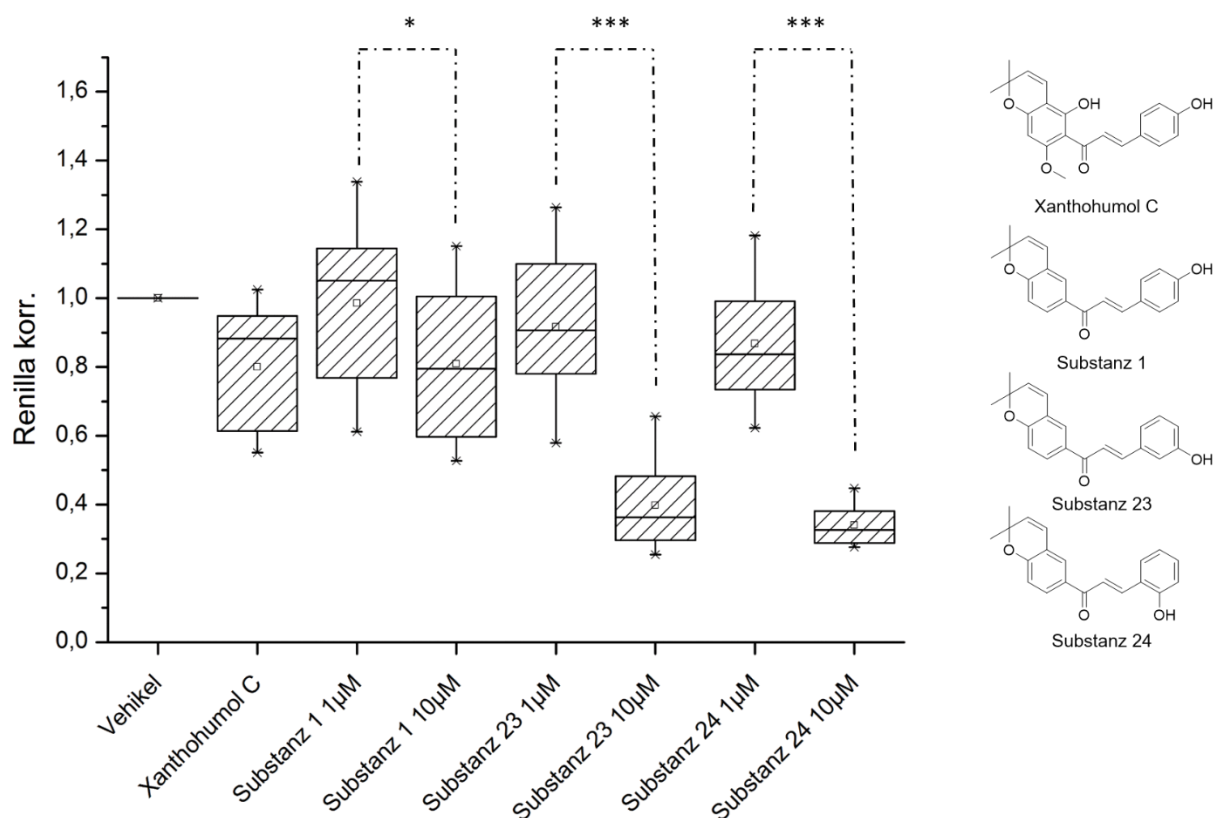


Abbildung 54: Normierte Renilla-Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen der Hydroxylgruppe gemessen in 1 µM und 10 µM Konzentration.

Die Hydroxylgruppe in Position 2 am B-Ring scheint die größte Aktivität für die Differenzierungsinduktion zu haben. Nun soll überprüft werden, wie sich zwei Hydroxylgruppen am B-Ring auf die Aktivität auswirken. Dabei wurden fünf Substanzen (25-29) synthetisiert und auf den Zellen getestet. Eingesetzt wurden Verbindungen mit immer zwei Hydroxylgruppen an den Positionen 2, 3, 4 und 5. Die funktionelle Gruppe war entweder direkt benachbart (Substanz 26 und Substanz 29) oder einem oder mehrere Wasserstoffatome zwischen den Hydroxylgruppen (Substanzen 25, 27 und 28). Abbildung 56 zeigt die Strukturen der Verbindungen.

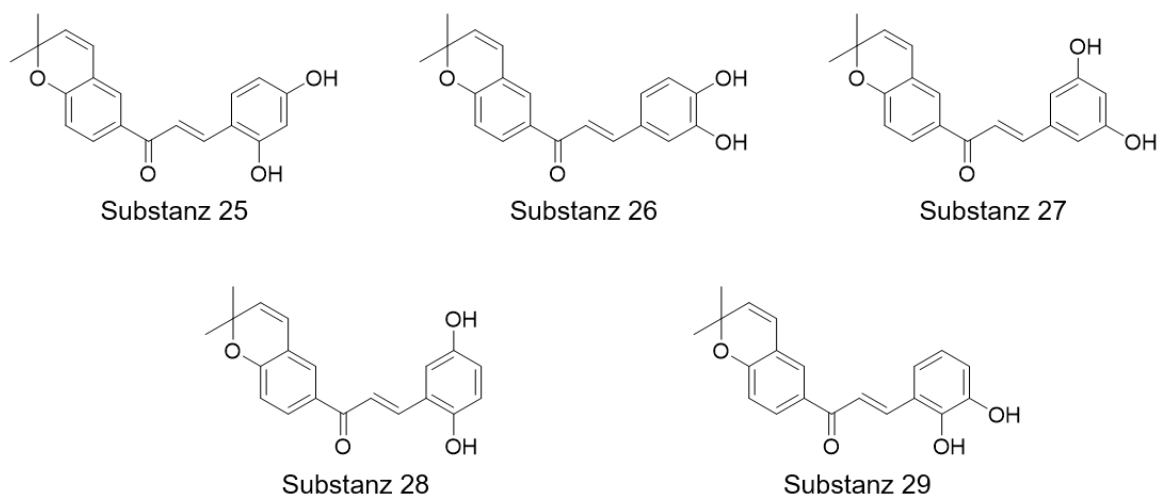


Abbildung 55: Synthetisierte und getestete Derivate des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen von zwei Hydroxylgruppen.

Bei der Betrachtung der differenzierungsinduzierten Aktivität der Substanzen zeigt sich, dass besonders die Substanzen 25 und 28 eine hohe Aktivität aufweisen. Beide Verbindungen haben eine Hydroxylgruppe in Position 2. In vorhergegangenen Tests konnte bereits gezeigt werden, dass diese Position einen sehr starken Einfluss auf die Differenzierungsinduktion hat. Dieser Trend kann hier bestätigt werden. Substanz 29 hat zwar ebenfalls eine Hydroxylgruppe in Position 2, jedoch liegt eine benachbarte OH-Gruppe daneben. Das zeigt sich auch bei Substanz 26. Hier sind zwar die DIA-Werte hoch, was jedoch an den sehr niedrigen Renilla-Werten (vgl. Abbildung 57) liegt. Auch bei zwei Hydroxylgruppen zeigt sich, dass die Position 2 eine große differenzierungsinduzierende Aktivität besitzt.

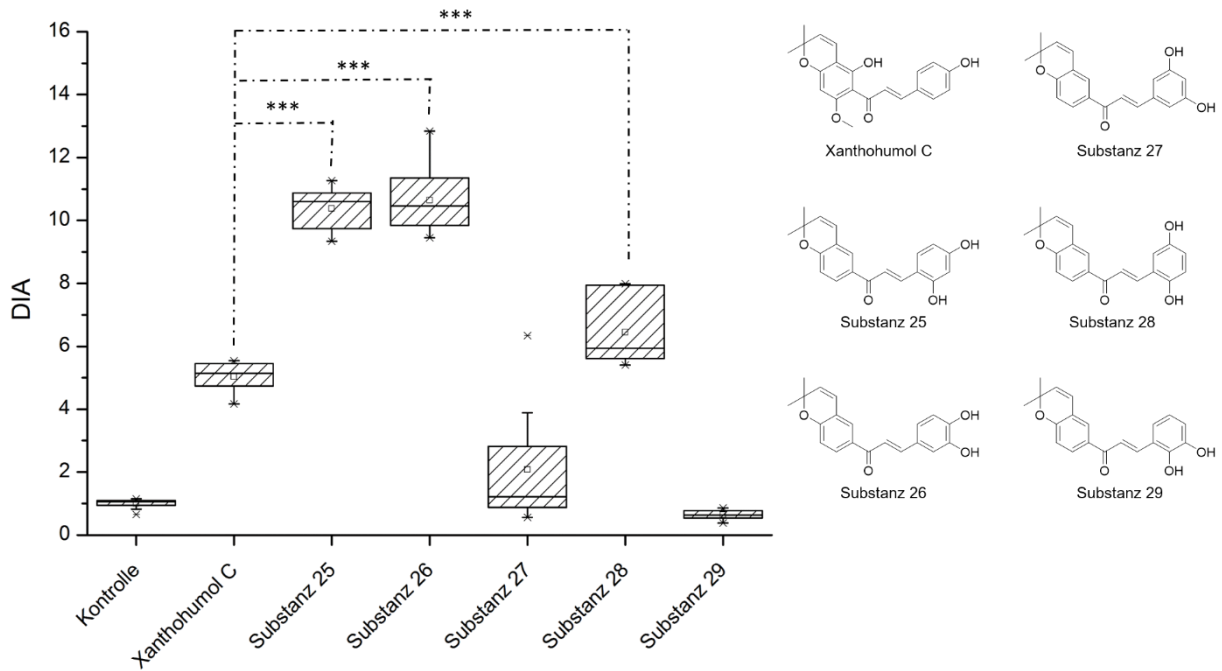


Abbildung 56: Differenzierungsinduzierende Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen von zwei Hydroxylgruppen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Bei der Betrachtung der Renilla-Werte zeigt sich deutlich, dass die Stellung der Hydroxylgruppen in benachbarten Positionen (Substanz 26 und Substanz 29) eine sehr große Zytotoxizität auf die Stammzellen hat. Bei beiden Substanzen sinkt die Zellzahl konzentrationsabhängig von 1  $\mu\text{M}$  zu 10  $\mu\text{M}$  sehr stark ab. Auch Substanz 27 zeigt sehr niedrige Renilla-Werte. Hier liegen die Hydroxylgruppen in Position 3 und 5, also folglich zu weit voneinander entfernt, um Metallionen zu komplexieren. In diesem Fall ist anscheinend die Stellung oder möglicherweise die Symmetrie der Gruppen der Grund für die Toxizität. Die Substanzen 25 und 28 sinken zwar beim Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  verglichen mit 1  $\mu\text{M}$  ebenfalls signifikant ab, jedoch liegen die Werte hier noch in einem annehmbar hohen Bereich.

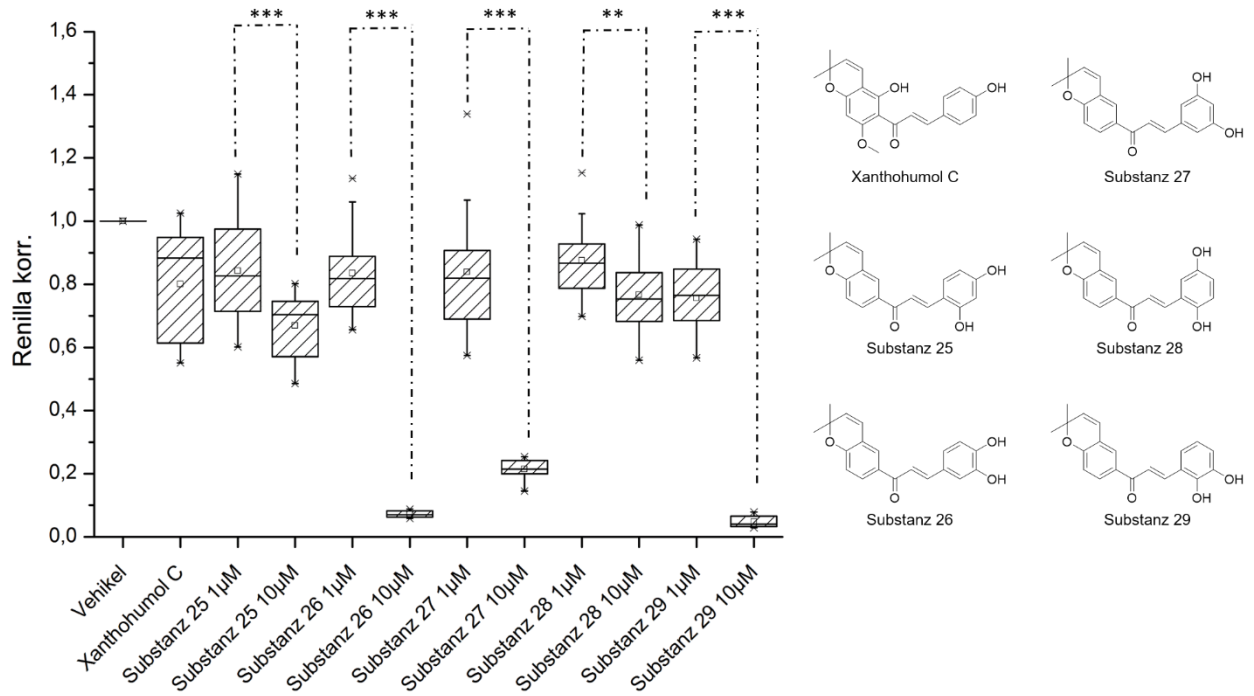


Abbildung 57: Normierte Renilla-Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen von zwei Hydroxylgruppen gemessen in 1 µM und 10 µM Konzentration.

#### 4.4 Teildiskussion der Struktur-Aktivitätsuntersuchungen

Zusammenfassend lässt sich über die wirkungsbestimmenden Struktur motive des Grundmoleküls sagen, dass sowohl der A-Ring wie auch der B-Ring einen erheblichen Einfluss auf die differenzierungsinduzierende Aktivität haben. Beim A-Ring ist es entscheidend, dass der Chromanring – wie beim natürlich vorkommenden Xanthohumol C – über das Sauerstoffatom an Position 4' geschlossen wird [33].

Sowohl die offenkettige Form als Prenylgruppe als auch die Chromanringe Position 2 und 3 zeigen einen erheblichen Verlust an differenzierungsinduzierender Aktivität. Das Vorhandensein einer Prenylgruppe ergibt neben einer niedrigen DIA auch sehr niedrige Renilla-Werte. Der signifikante Unterschied der Zytotoxizität zwischen offener Prenylgruppe und geschlossener Chromangruppe wird auch in der Literatur beschrieben [211]. Die Prenylgruppe – vor allem in dieser Position – hat offenbar den apoptotischen Zelltod der vorliegenden Zellen zur Folge [212]. Auch andere Verbindungen zeigen einen signifikanten Unterschied der Toxizität mit Prenylgruppe und ohne Prenylgruppe [213]. Substanzen mit Prenylgruppe wirken oft zu toxisch auf Zellen, um sie für die Differenzierung von Nervenzellen einsetzen zu können. Dadurch sind Substanzen mit diesem Strukturelement nicht als Neuroregenerator geeignet. Eine gezielte Hydrierung der funktionellen Gruppe kann allerdings diesen Effekt ausgleichen und so die Zytotoxizität verringern. Die getestete Substanz 6 (vollhydriertes Xanthohumol) weist eine signifikant erniedrigte Zytotoxizität auf. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Hydrierung dieser Gruppe positiv auf das Überleben der Zellen auswirkt. Beim Vergleich der neurodifferenzierenden Aktivität der offenkettigen Prenylgruppe mit der Chromangruppe zeigt sich eindeutig, dass der Chromanring die bessere Wahl als Neuroregenerators ist. Es hat sich auch gezeigt, dass es erhebliche Unterschiede in den Aktivitäten zwischen den Positionen des Sauerstoffatoms im Chromanring gibt. Die differenzierungsinduzierende Aktivität der Substanzen 8 und 9 (Sauerstoff im A-Ring auf Position 5' und 6') sind im Vergleich zu Substanz 1 (Sauerstoff in Position 4') stark reduziert. Das entscheidende Strukturelement für die höchste differenzierungsinduzierende Aktivität des A-Rings ist also der geschlossene Chromanring mit dem Sauerstoffatom an Position 4'. Der Austausch des Sauerstoffs durch Stickstoff oder Schwefel im A-Ring erweisen sich als ungünstig für neuronale Differenzierung. Das Stickstoff-Derivat zeigt einen signifikanten Abfall der Renilla-Werte, weshalb er sich zur Induktion der Neurodifferenzierung nicht eignet. Der Anstieg der Zytotoxizität auf Zellen beim Austausch von Kohlenstoff- oder Sauerstoffatome durch Stickstoff wurde bereits in der Literatur beschrieben [214]. Das Schwefel-Analogon weist zwar gute Renilla-Werte auf, jedoch ist die differenzierungsinduzierende Aktivität nicht hoch. Möglicherweise ist das größere Schwefelatom nicht so gut geeignet für die Induktion der Differenzierung der Stammzellen zu Nervenzellen. Für die Anwendung als Neuroregenerator

ist der A-Ring mit einem Sauerstoffatom am besten geeignet. Es spielt offensichtlich keine Rolle, ob sich in Position 2' des A-Rings eine Hydroxylgruppe und in Position 6' eine Methoxygruppe befindet oder nicht. Sowohl das natürliche Hopfenchalkon Xanthohumol C (mit beiden Substituenten) als auch das synthetische Chalkon Substanz 1 (ohne beide Substituenten) zeigen identische Wirkungen bezüglich DIA und Zytotoxizität. Als Leitstruktur für die Induktion der Neurodifferenzierung eignet sich also der A-Ring der natürlichen Form.

Bei den Experimenten mit den hydrierten  $\alpha,\beta$ -Doppelbindungen zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede der neurodifferenzierenden Aktivität zu den nicht-reduzierten Doppelbindungen gibt. Diese hydrierte Form hat den Vorteil, dass die Bioverfügbarkeit der Substanz steigt. Bei den Chalkonen kann die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung durch eine Michael Addition an ein Thiol von schwefelhaltigen Proteinen binden. Dadurch ist die Substanz an das Protein fixiert und nicht mehr frei verfügbar [215]. Diese Reaktion kann aber nur mit vorhandener Doppelbindung stattfinden. Außerdem ist der Ringschluss über die 2'-Hydroxylgruppe nicht möglich (vgl. Abbildung 41). Durch das selektive Hydrieren dieser Doppelbindung kann also die Bioverfügbarkeit ohne Einbußen der Aktivität gesteigert werden. Es konnte bereits von Miranda *et al.* gezeigt werden, dass sich die Xanthohumol-Derivate mit reduzierter  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung sowie das komplett reduzierte Xanthohumol nahezu identisch wie das natürliche Xanthohumol in *in vivo* Experimenten verhalten [216].

Die Experimente mit den unterschiedlichen B-Ring-Derivaten zeigten, dass sowohl die differenzierungsinduzierende Aktivität wie auch die Renilla-Aktivität stark von den B-Ringen abhängen. Die Kettenverlängerung an der 4-Hydroxylgruppe zeigt keine hohe differenzierungsinduzierende Aktivität. Mit länger werdender Kette nimmt auch die Aktivität ab, sodass sich durch diese Modifikation kein Gewinn als Neuroregenerator ergibt. Im Gegensatz dazu steigt die Renilla-Aktivität mit zunehmender Kettenlänge. Die Derivate mit Methoxy- und Methylthioethergruppe liegen im selben Bereich wie Xanthohumol C. Borges-Argaez *et al.* beschrieben das methylierte Xanthohumol C bereits als nicht zytotoxisch auf P-388-Mauszellen [217]. Bei den längeren Ketten jedoch lag die Renilla-Aktivität im Bereich der Kontrolle (Substanz 14) oder nahm signifikant zu (Substanz 15). Unabhängig von der schlechten DIA eignen sich diese Verbindungen nicht zum Einsatz als Neuroregenerator, da die Gefahr besteht, unkontrollierte Zellwucherungen zu induzieren. Der Austausch des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe gegen Stickstoff führte zu einer signifikanten Abnahme der DIA. Da die Renilla-Werte auf demselben Niveau wie Xanthohumol C lagen, verringerte dieser Austausch die neurogenese-induzierende Aktivität. Die Ergebnisse der Renilla-Aktivität stehen im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen stickstoffhaltigen Flavonoiden. Diese werden meist als sehr zytotoxisch beschrieben [218,219]. Diese Flavonoide enthielten jedoch den Stickstoff in einem zusätzlichem Ring am A-Ring und nicht als endständige

funktionelle Gruppe. Möglicherweise wirkt dieses Ringsystem zytotoxisch auf die Zellen. Die Derivate mit unterschiedlichen induktiven Gruppen zeigten alle durchweg keine guten differenzierungsinduzierenden Aktivitäten. Einzig die Aktivität von Substanz 19 (ohne funktionelle Gruppe) lag im Bereich der Positivkontrolle Xanthohumol C, jedoch war die Renilla-Aktivität hier so gering, dass sich auch diese Verbindung nicht als Neuroregenerator eignet. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Hydroxylgruppe die wohl höchste differenzierungsinduzierende Aktivität aller getesteten Gruppen am B-Ring besitzt und somit als Leitstruktur für Neuroregenerator in Frage kommt. Bei der Position der Hydroxylgruppe zeigte sich, dass die Position 2 signifikant aktiver ist als an Position 3 oder 4. Dabei zeigte sogar 1  $\mu\text{M}$  der Substanz 24 (Hydroxylgruppe in Position 2) eine höhere Aktivität als 10  $\mu\text{M}$  der Vergleichssubstanz Xanthohumol C. Bei beiden Konzentrationen sind die Renilla-Werte gleich. Bei Substanz 24 würden sich weitere Experimente mit Konzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$  anbieten, um die höchste Aktivität bei noch verträglichen Renilla-Werten zu ermitteln. Die Experimente mit zwei Hydroxylgruppen am B-Ring konnten bestätigen, dass die Position 2 sehr aktiv ist. Alle getesteten Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe in dieser Position weisen eine signifikant erhöhte differenzierungsinduzierende Aktivität verglichen mit der Kontrolle Xanthohumol C auf. Einzig Substanz 29 weist keine hohe Aktivität auf. Dies resultierte jedoch aus den beiden benachbarten Hydroxylgruppen in Position 2 und 3. Auch Substanz 26 mit zwei direkt benachbarten Gruppen zeigt eine sehr geringe Renilla-Aktivität. Diese Konstellation an benachbarten Hydroxylgruppen ist in der Lage, Übergangsmetalle in Chelatkomplexen zu binden, die so für die Zellen nicht mehr verfügbar sind. Den Hydroxylgruppen wird auch die anti-oxidative Eigenschaft nachgewiesen [220,221]. Für das Überleben der neuronalen Stammzellen war diese Konstellation nicht geeignet und führte zu einem starken toxischen Effekt.



## 5 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Steigerung der Bioverfügbarkeit des neuroaktiven Hopfen-Chalkons Xanthohumol C für *in vitro* Anwendungen und weiteren Verbesserungen bei der Differenzierung neuronaler Stammzellen.

Der Xanthohumol C-Cyclodextrin-Komplex konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben und analysiert werden. Die Analyse erfolgte hinsichtlich der Bildungseigenschaften, der Löslichkeit und die Charakterisierung der Struktur. Für die Ermittlung der Bildungskonstante wurde nicht Wasser, sondern ein leicht abgeändertes Medium verwendet. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von 2.2 µg/mL konnten diese Tests nicht in Wasser durchgeführt werden. So wurde als Messsystem eine Mischung aus Wasser und organischem Lösungsmittel verwendet. Der Wert der Bildungskonstante repräsentiert deshalb nicht den Zahlenwert in wässrigem Medium, sondern in diesem Lösungsmittelgemisch. In wässriger Umgebung ist der Entropiegewinn durch die Abschirmung der apolaren Oberfläche des Chalkons vom Wasser die Triebkraft für die Komplexbildung. Dieser Effekt wird durch den Zusatz von organischem Lösungsmittel abgeschwächt, da sich die Polarität des Lösungsmittels ändert [222]. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Moleküle des organischen Lösungsmittels ebenfalls in Cyclodextrin einschließen lassen und somit Xanthohumol C aus der Kavität verdrängen. Dies verringert wiederum die Bildung des Einschlusskomplexes und führt zu einer Verkleinerung der Bildungskonstanten [223]. Nichtsdestotrotz wird diese Methode bei vielen Flavonoiden eingesetzt [224-226], da sich aufgrund der genannten Problematik keine Alternative aufzeigt. Dieser Wert kann trotzdem als Abschätzung für das getestete System angesehen werden.

Dass es sich bei HP-β-Cyclodextrin um ein Vielkomponentengemisch mit einer variierenden Anzahl an Substituenten handelt, ist längst bekannt [227]. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sich der Einschlusskomplex mit verschiedenen substituierten Cyclodextrinen bilden lässt. Diese Ergebnisse decken sich unter anderem mit Studien, die einen Quinazolin-Komplex mit HP-β-CD untersucht haben [177]. Es bleibt jedoch ungeklärt, weshalb die Intensität der Einschlusskomplexe mit sechs und sieben Substituenten am höchsten ist. Ob hier die Stellung der substituierten Hydroxypropylgruppen am günstigsten für den Einschluss ist, oder ob nur eine bessere Ionisierbarkeit in der ESI-Quelle der Grund für diese Verteilung ist, kann mit den vorhandenen Mitteln nicht ausreichend geklärt werden. Zum derzeitigen Stand lässt sich auch aus der Literatur kein Lösungsansatz finden. Um diese Problematik hinreichend zu klären, müssten die Cyclodextrine nach der Zahl der Substituenten getrennt und erneut Einschlussversuche durchgeführt werden. Diese Aufgabenstellung

scheitert aber an der Trennleistung der Chromatographiesäulen und der immensen Menge an zu trennenden Molekülen.

Der dreidimensionale Strukturvorschlag des Cyclodextrin-Einschlusskomplexes wurde durch die Verschiebung der Protonen des Flavonoids ermittelt. Diese Methode wird in der Literatur zwar oft verwendet [165-167], ist jedoch nur eine indirekte Methode zur Bestimmung der Struktur. Besser wären zweidimensionale NMR-Aufnahmen, wie HSQC- (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) oder HMBC- (heteronuclear multiple bond correlation) Messungen, die die Wechselwirkungen der Cyclodextrin-Kerne mit den Flavonoid-Kernen aufzeigen [228]. Solche Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, jedoch schnell wieder verworfen. Die Messungen hätten in D<sub>2</sub>O durchgeführt werden müssen, jedoch ist die Löslichkeit des Xanthohumol C so gering, dass sich mit der Auflösung des NMRs keine Wechselwirkungen zeigten. Messungen dieser Art wurden bisher nur mit gut wasserlöslichen Substanzen wie Catechin beschrieben [229]. Möglicherweise wäre bei Xanthohumol C die Messung an einem leistungsstärkeren Gerät empfehlenswert.

Zur Bekämpfung von neuronalen Erkrankungen wird unter anderem oft die Steigerung der Plastizität des Gehirns angeführt. Dies bedeutet, dass sich durch Differenzierung neuronale Stammzellen zu Nervenzellen entwickeln. Manche Vertreter aus der Stoffklasse der Flavonoide zeigen diese neuroprotektiven Wirkungen [230,231]. Bei Xanthohumol C ist bereits eine neuroprotektive Verbindung nachgewiesen worden [33]. Aufgrund der Möglichkeit, durch das Differenzieren von neuronalen Stammzellen zu Nervenzellen körpereigene Reparaturmechanismen anzustoßen, bietet dieses Flavonoid eine sehr vielversprechende Möglichkeit zur Bekämpfung von neuronalen Erkrankungen. Die Struktur-Aktivitäts-Untersuchung wurde durchgeführt, um wichtige Gruppen der Struktur herauszufinden und gegebenenfalls neue aktive Substanzen zu identifizieren. Außerdem sollte geklärt werden, ob Modifikationen zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit einen Einfluss auf die differenzierungsinduzierende Aktivität haben. So wurde eine Trifluoromethyl-Gruppe eingebracht, die oftmals eingesetzt wird, um die Lipophilie zu erhöhen und Moleküle so leichter gehirngängig zu machen [232]. Diese Substitution verschlechterte die Aktivität erheblich. Nach den Ergebnissen aus Kapitel 4 wird deutlich, dass eine polare Gruppe, im Idealfall eine Hydroxygruppe, am Ring vorhanden sein muss. Deshalb wären weitere Tests mit mehrfach substituierten B-Ringen, an denen sich sowohl Trifluoromethyl- als auch Hydroxylgruppen befinden, sinnvoll.

Um die Anlagerung des Flavonoids an Proteine mittels Michael-Addition [233] zu unterbinden, wurde die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung hydriert. Die so hergestellten Substanzen zeigten keine signifikant abweichenden differenzierungsinduzierenden Aktivitäten, sodass die Verwendung von den hydrierten Substanzen beim Einsatz in lebenden Organismen zu empfehlen ist.

Zudem unterbindet man den intramolekularen Ringschluss der Doppelbindung mit der Hydroxylgruppe am Chromanring. Frühere Studien zeigten, dass Chalkone höhere neuroprotektive Wirkungen zeigen als geschlossene Flavanone [32,33,136], somit könnte durch die Verhinderung des Ringschlusses eine Erhöhung der Aktivität in *in vivo*-Tests erreicht werden.

Eine weitere neue Erkenntnis ergaben die Versuche bezüglich unterschiedlicher Positionen der Hydroxylgruppe am B-Ring. Die differenzierungsinduzierende Aktivität variiert abhängig von der Position dieser Gruppe. Bei Xanthohumol C befindet sich die Hydroxylgruppe an Position 4. Diese Verbindung wirkt bekanntermaßen neuroprotektiv. Befindet sich die Hydroxylgruppe an der Position 3, so verbessert sich die Aktivität signifikant. Die Hydroxylgruppe an Position 2 hingegen steigert die Wirkung nochmals erheblich. Die synthetisierte Substanz zeigt selbst in geringen Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ ) eine deutlich höhere Aktivität als Xanthohumol C (10  $\mu\text{M}$ ). Dadurch ist diese Substanz als Leitstruktur für spätere *in vivo*-Tests zu empfehlen, da sie auch schon in viel geringeren Konzentrationen ihre Wirkung entfaltet. Auch durch das Einbringen einer zweiten Hydroxylgruppe am B-Ring resultiert eine gesteigerte Aktivität, solange sich eine dieser Gruppen in Position 2 oder 3 befindet. Beide Hydroxylgruppen dürfen nur nicht unmittelbar benachbart sein, da sonst die Renilla-Werte sehr stark absinken. Diese Erkenntnis bedarf möglicherweise weiterer Untersuchungen, da sich die Ergebnisse bezüglich benachbarter Hydroxylgruppen in der Literatur unterscheiden. Es wird berichtet, dass sich die Induktion der Differenzierung von PC12-Zellen durch die Anwesenheit einer benachbarten Hydroxylgruppe steigert [234]. Andere beschreiben jedoch einen leichten Rückgang der Neuronenreuebildung sobald diese Konstellation der Hydroxylgruppen am B-Ring vorliegt [235].

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse dieser Arbeit kann folgende Leitstruktur formuliert werden:

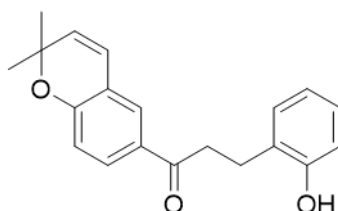


Abbildung 58: Leitstruktur als Kombination aus allen Ergebnissen der Struktur-Aktivitäts-Untersuchung.

Für zukünftige Zelleexperimente sollte die Substanz nach Abbildung 58 getestet werden. Zum einen zeigte sich eine sehr hohe differenzierungsinduzierende Aktivität bei sehr geringer Zytotoxizität auf die Zellen. Zum anderen konnten bereits bei 1  $\mu\text{M}$  Konzentration eine signifikant höhere Aktivität als bei 10  $\mu\text{M}$  Xanthohumol C festgestellt werden. Außerdem ist es bei dieser Struktur nicht möglich, die Iso-Form – also den Ringschluss des C-Rings – zu bilden,

---

da sowohl die  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung als auch die Hydroxygruppe in Position 2 fehlt. Das Fehlen der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung hat zudem den positiven Effekt, dass die Anlagerung an Proteine im Organismus nicht möglich ist. Beide Aspekte steigern die Bioverfügbarkeit der Substanz. Auch diese Substanz sollte in 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin eingeschlossen werden, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Nach den Ergebnissen der Cyclodextrin-Untersuchungen sollte die differenzierungsinduzierende Aktivität dadurch nicht geändert werden. Durch die Kombination der gewonnenen Ergebnisse aus beiden Untersuchungen ergibt sich eine Substanz mit signifikant erhöhter differenzierungsinduzierender Aktivität verglichen mit dem bisherigen Standard Xanthohumol C, die sich durch einen Einschluss in Cyclodextrin für Anwendungen *in vitro* eignet.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Allgemeiner Teil

#### 6.1.1 **Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, käuflich von Sigma-Aldrich, VWR oder Merck erworben. Die Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt verwendet. Xanthohumol wurde aus dem Extrakt XanthoFlav® der Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft m. b. H. durch Umkristallisation hergestellt. Für Extraktionen und Säulenchromatographie wurden Lösungsmittel von VWR in technischer Qualität verwendet. Für Analysen an der HPLC und am IT-TOF wurden spezielle Lösungsmittel mit höherer Reinheit (UHPLC-MS grade) von Honeywell verwendet. Die deuterierten Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurden von Deutero bezogen.

#### 6.1.2 **Geräte und Methoden**

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Normalphasen-DC kamen mit Kieselgel 60 F254 beschichtete Aluminiumfolien von Merck zum Einsatz. Die Untersuchungen wurden in mit Laufmittel gesättigter Atmosphäre bei geschlossener Kammer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die Wellenlängen  $\lambda = 254 \text{ nm}$  und  $\lambda = 370 \text{ nm}$ .

Gaschromatographie mit Massenspektrometer (GC-MS)

Für die Gaschromatographie wurde das Gerät HP6890 mit gekoppeltem Massenspektrometer MS 5973 von Hewlett-Packard verwendet. Die Temperatur des Injektors betrug 275 °C. Es wurden für die Messungen 1.0  $\mu\text{L}$  injiziert. Die Trennung erfolgte über eine mittelpolare Kapillarsäule Rxi-5ms von Restek (5 % Diphenyl–95 % Dimethylpolysiloxan, Länge 30 m, Innendurchmesser 0.25 mm, Schichtdicke 0.25  $\mu\text{m}$ ) mit dem Trägergas Helium bei einer Flussrate von 1 mL/min. Der Säulenofen wurde mit folgendem Temperaturprogramm betrieben: Es wurde von 80 °C auf 250 °C mit einer Aufheizrate von 14 °C/min, anschließend wurde auf 300 °C mit 1.5 °C/min erhitzt und diese Temperatur für 22 min gehalten. Die Proben wurden in Aceton gelöst in das System injiziert. Flavonoide mit Hydroxylgruppen wurden mit N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid derivatisiert.

### Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden am JNM-ECS-400 von JEOL in perdeutierten Lösungsmitteln aufgenommen. Die Kalibrierung der Signale erfolgte über den Peak der nicht-deutierten Lösungsmittelreste (Aceton- $d_6$ : 2.04 ppm, Wasser- $d_2$ : 4.67 ppm). Die Multiplizitäten der Signale wurden in den Abkürzungen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multipllett) angegeben. Die Kopplungskonstanten wurden in Hertz (Hz) angegeben.

### Infrarotspektroskopie (IR)

Die Messungen wurden am Nicolet 380 FT-IR der Firma Thermo Scientific mit einem Smart Diamond ATR durchgeführt. Die Lage der Banden wurde als Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die Intensitäten der Banden wurden eingeordnet in s = stark, m = mittelstark, w = weniger intensiv und br = breit.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden mit einem System der Firma Shimadzu mit zwei Pumpen LC-20AD, Probengeber SIL-20AC HT, Säulenofen CTO-20A und PDA-Detektor SPD-M20 durchgeführt. Für die Trennung der Flavonoide wurde eine Kinetex C18 Säule von Phenomenex (30 x 2.1 mm, 2.6  $\mu$ , 100 Å) mit 0.4 mL/min Fluss mit folgendem Gradienten verwendet:

Zeit	B-Konzentration
0,00 – 0,30 min	35 %
0,31 – 5,50 min	95 %
5,51 – 6,00 min	95 %
6,01 – 6,15 min	35 %

### Säulenchromatographie - PuriFlash

Die säulenchromatographischen Trennungen wurden an dem Flash-Chromatographiesystem PuriFlash 4250 der Firma Interchim durchgeführt. Die Reinigung der Reaktionsprodukte erfolgte auf Silca-HP 50 µm Säulen mit einem Gradienten, der innerhalb von 25 min von 100 % n-Hexan zu 100 % Ethylacetat verlief. Für die Aufreinigung der Substanzen für die biologischen Tests wurden die Produkte über eine Luna C18 Säule von Phenomenex (250 x 30 mm, 5 µ, 100 Å) mit 21 mL/min Fluss mit folgenden Gradienten gereinigt:

Zeit	B-Konzentration
0,00 – 2,50 min	35 %
2,51 – 45,00 min	95 %
45,51 – 50,00 min	95 %
50,01 – 51,25 min	35 %

### Gefriertrocknung

Die Substanzen für die Zelltests und die Cyclodextrinkomplexe wurden nach der Aufreinigung über einen Labor-Gefriertrockner Alpha von Martin Christ lyophilisiert.

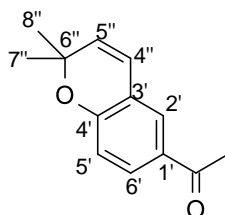
## 6.2 Stoffsynthese - Chromanringe

### 6.2.1 Synthese des Chroman-Rings

Unter Stickstoff wurden 1.0 mmol 4-Hydroxyacetophenon in 5 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Anschließend wurden 3.5 mmol Kaliumcarbonat, 1.9 mmol Kaliumiodid, 0.1 mmol Kupfer-(I)-chlorid und 1.3 mmol 3-Chloro-3-methyl-1-butin zugegeben und für zwei Stunden bei 65°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 15 mL Wasser gekippt und dreimal mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Entstehen des Produkts mittels Gaschromatographie untersucht und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Das Rohprodukt wurde unter Stickstoff in 15 mL Diethylanilin gelöst und im Ölbad für eine Stunde bei 190°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 25 mL Ethylacetat zugegeben und dreimal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als leicht gelbes Öl erhalten.

#### 1-(2,2-Dimethyl-2H-chromen-6-yl)etan-1-one



**Ansatzgröße:** 5 g

**Ausbeute:** 5.6 g (75 %)

**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.46 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.43 (s, 6H, H-7'' & H-8''), 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.8 (d, 1H, J = 9.62, 5''-H), 6.48 (d, 1H, J = 9.62, 4''-H), 6.79 (d, 1H, J = 8.24, 5'-H), 7.68 (d, 1H, J = 2.29, 2'-H), 7.77 (dd, 1H, J = 10.53, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 25.91 (CH<sub>3</sub>), 28.04 (C-7'' & C-8''), 77.76 (C-6''), 116.34 (C-5'), 121.14 (C-3'), 121.91 (C-4''), 127.32 (C-2'), 130.34 (C-6'), 131.07 (C-4'), 131.79 (C-5''), 157.56 (C-4'), 195.76 (C=O).

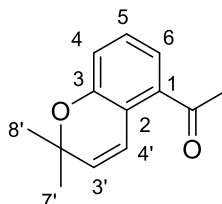
**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 8.902 min



$m/z$  (%) = 202 (88), 187 (100), 144 (76), 115 (82), 43 (58).

**IR (ATR):**  $\nu$  = 2975 (w), 1671 (s), 1638 (w), 1599 (m), 1568 (w), 1468 (m), 1465 (m), 1434 (w), 1384 (s), 1366 (s), 1232 (s), 1211 (w), 1186 (s), 1164 (m), 1119 (s), 1109 (s), 1072 (w), 958 (m), 877 (w), 824 (m), 769 (m), 718 (m), 639 (w), 583 (m), 565 (m).

### 1-(2,2-Dimethyl-2H-chromen-5-yl)etan-1-one



**Ansatzgröße:** 1.05 g

**Ausbeute:** 1.2 g (80 %)

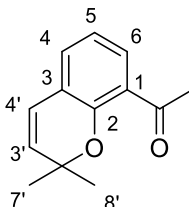
**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.31 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 7.264 min

$m/z$  (%) = 202 (10), 187 (30), 159 (15), 136 (100), 121 (100), 93 (65), 67 (90), 43 (90).

### 1-(2,2-Dimethyl-2H-chromen-8-yl)etan-1-one



**Ansatzgröße:** 1.7 g

**Ausbeute:** 0.5 g (21 %)

**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.63 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

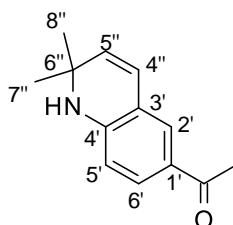
**MS (GC):**  $R_T = 8.347$  min

$m/z$  (%) = 202 (40), 187 (100), 159 (10), 144 (40), 115 (40), 86 (20), 43 (50).

### 6.2.2 Synthese des 1,2-Dihydroquinolins

Unter Stickstoff wurde 2.0 mmol 4-Aminoacetophenon in 10 mL Toluol gelöst und mit 0.15 mmol Kuper-(I)-chlorid, 0.15 mmol Kuper-(II)-chlorid 3 mmol 2-Methyl-3-butin-2-ol versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 24 Stunden bei 120°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als leicht gelbes Öl erhalten.

#### 1-(2,2-dimethyl-1,2-dihydroquinolin-6-yl)ethan-1-one



**Ansatzgröße:** 2 g

**Ausbeute:** 1.25 g (42 %)

**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ON

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.21 (n-Hexan/Ethylacetat 4/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 1.32 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.52 (d, 1H, J = 9.86, 5''-H), 5.99 (s, 1H, NH), 6.31 (d, 1H, J = 9.86, 4''-H), 6.44 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.48 (s, 1H, 2'-H), 7.59 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 25.86 (CH<sub>3</sub>), 31.93 (C-7'' & C-8''), 53.26 (C-6''), 112.11 (C-5'), 118.70 (C-3'), 123.73 (C-4''), 126.70 (C-4'), 128.18 (C-2'), 130.80 (C-6'), 131.59 (C-5''), 149.01 (C-1'), 195.19 (C=O).

**MS (GC):**  $R_T = 10.84$  min

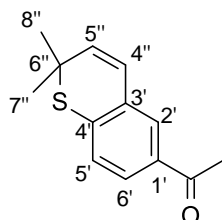
$m/z$  (%) = 201 (9), 186 (100), 143 (26), 115 (9), 43 (5).

**IR (ATR):**  $\nu = 3325$  (s), 2980 (w), 1652 (s), 1639 (m), 1575 (s), 1558 (s), 1504 (m), 1435 (w), 1355 (s), 1288 (m), 1264 (s), 1191 (s), 1147 (s), 1122 (m), 1069 (w), 1019 (w), 971 (w), 906 (w), 848 (w), 815 (w), 772 (s), 728 (m), 665 (m), 644 (s), 587 (s), 532 (s), 514 (s).

### 6.2.3 Synthese des 2H-Thiochromens

10.0 mmol Thiophenol und 10.0 mmol 3,3-Dimethylacrylsäure wurden in 0.3 mL Piperidin gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 18 Stunden bei 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf verdünnte Salzsäure gekippt und dreimal mit je 15 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitungsschritte weiter eingesetzt. Zum Schließen des Rings wurde die Substanz für 30 min bei 50°C in Polyphosphorsäure gerührt. Das Gemisch wurde auf Wasser gekippt und mit Ethylacetat extrahiert. Die so erhaltenen 6.8 mmol Zwischenprodukt wurden mit 3.4 mmol Natriumborhydrid in 20 mL trockenem Ethanol für 15 min refluxiert. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde der Rückstand in trockenem Benzol gelöst. Nach der Zugabe von 0.35 mmol p-Toluolsulfonsäure wurde das Reaktionsgemisch für 15 min refluxiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch aufgereinigt. Um das Produkt zu Acetylieren wurde das erhaltene Produkt (6.1 mmol) in 6 mL trockenem Benzol gelöst und mit 9.5 mmol Zinkchlorid versetzt und auf 80°C erhitzt. Anschließend wurden 7.4 mmol Acetanhydrid portionsweise zugegeben und für 30 min weitererhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 30 mL Wasser zugegeben und dreimal mit je 15 mL Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als leicht gelbes Öl erhalten.

#### 1-(2,2-dimethyl-2-H-thiochromen-6-yl)ethan-1-one



**Ansatzgröße:** 7.4 g

**Ausbeute:** 0.15 g (3 %)

**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>OS

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.63 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.89 (d, 1H, J = 10.07, 5''-H), 6.58 (d, 1H, J = 10.07, 4''-H), 7.30 (d, 1H, J = 8.24, 5'-H), 7.74 (d, 1H, J = 8.24, 6'-H), 7.79 (s, 1H, 2'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 25.96 (CH<sub>3</sub>), 29.8 (C-7'' & C-8''), 41.93 (C-6''), 126.11 (C-4''), 127.05 (C-5'), 127.72 (C-6'), 127.93 (C-2'), 131.08 (C-3'), 134.87 (C-4'), 134.92 (C-5''), 138.48 (C-1'), 196.36 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 10.337 min

m/z (%) = 218 (100), 203 (100), 187 (5), 175 (33), 160 (95), 141 (20), 115 (80), 89 (35), 43 (75).

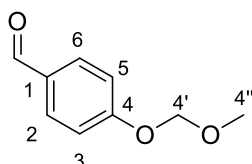
**IR (ATR):**  $\nu$  = 2963 (w), 2922 (w), 1664 (s), 1609 (m), 1585 (m), 1555 (w), 1462 (w), 1435 (w), 1381 (m), 1358 (m), 1301 (m), 1270 (s), 1215 (s), 1188 (m), 1140 (w), 1123 (m), 1079 (w), 1019 (w), 929 (w), 915 (w), 892 (w), 859 (w), 819 (w), 754 (s), 743 (s), 720 (m), 694 (m), 678 (m), 645 (m), 621 (w), 561 (w).

## 6.3 Synthese der B-Ringe

### 6.3.1 Schützen der Hydroxybenzaldehyde, allgemeine Vorschrift

1.0 mmol des entsprechenden Hydroxy-Benzaldehyds wurden in 40 mL Aceton gelöst und mit 3.5 mmol Kaliumcarbonat (wasserfrei) vermischt. Die Reaktionslösung wurde zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde langsam 1.25 mmol (pro zu schützender Hydroxygruppe) Methoxymethylbromid in 10 mL Aceton zugetropft. Die Lösung wurde für drei Stunden erhitzt. Das Gemisch wurde heiß filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als gelbliches Öl erhalten.

### 4-(Methoxymethoxy)benzaldehyde



**Ansatzgröße:** 3.0 g

**Ausbeute:** 3.7 g (90 %)

**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.65 (n-Hexan/Ethylacetat 2/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 3.43 (s, 3H, 4''-H), 5.33 (s, 2H, 4'-H), 7.20 (d, 2H, J = 8.79 Hz, 3&5-H), 7.90 (d, 2H, J = 8.79 Hz, 6-H), 9.90 (s, 1H, C=O).

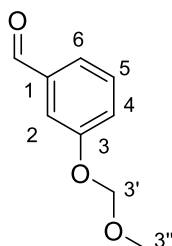
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 56.33 (C-4''), 94.87 (C-4'), 117.09 (C-3 & C-5), 131.87 (C-1), 132.31 (C-2 & C-6), 163.01 (C-4), 191.27 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 6.69 min

m/z (%) = 166 (60), 135 (18), 105 (9), 77 (16), 65 (12), 45 (100).

**IR (ATR):** ν = 2900 (w), 2830 (w), 1690 (s), 1586 (s), 1575 (m), 1508 (s), 1443 (w), 1425 (w), 1395 (w), 1317 (w), 1246 (m), 1228 (w), 1210 (w), 835 (m), 756 (m), 655 (m), 591 (w), 514 (m), 478 (w).

### 3-(Methoxymethoxy)benzaldehyde



**Ansatzgröße:** 1.75 g

**Ausbeute:** 0.5 g (22 %)

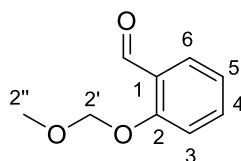
**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.56 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 6.480 min

m/z (%) = 166 (30), 135 (15), 105 (10), 77 (30), 63 (20), 45 (100).

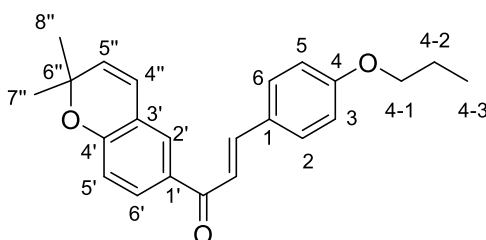
**IR (ATR):** ν = 2890 (w), 2820 (w), 1710 (s), 1575 (s), 1565 (m), 1518 (s), 1458 (w), 1435 (w), 1278 (m), 1256 (w), 1230 (w), 855 (m), 757 (m), 653 (m), 585 (w), 478 (w).

**2-(Methoxymethoxy)benzaldehyde****Ansatzgröße:** 1.25 g**Ausbeute:** 0.65 g (43 %)**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.58 (n-Hexan/Ethylacetat 2/1)**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 6.481 min

m/z (%) = 166 (20), 135 (15), 121 (20), 77 (20), 45 (100)

**IR (ATR):**  $\nu$  = 2895 (w), 2831 (w), 1650 (s), 1575 (s), 1512 (m), 1504 (s), 1345 (w), 1312 (w), 1241 (m), 1232 (w), 1215 (w), 835 (m), 655 (m), 597 (w), 511 (m), 471 (w).**6.3.2 Ether-Bildung der Hydroxylgruppe mit unpolaren Ketten**

Unter Stickstoff-Atmosphäre wurden 1.0 mmol des Flavonoids mit entschützter Hydroxylgruppe (Substanz 1), 1.2 mmol Triphenylphosphin und 1.2 mmol des entsprechenden langkettigen Alkohols in trockenem Tetrahydrofuran gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 45 Minuten wurde eine Lösung aus 1.6 mmol Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) in 3 mL trockenem Tetrahydrofuran zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als hellgelbes Öl erhalten.

**(E)-1-(2,2-dihmethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-propoxyphenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 380 mg

**Ausbeute:** 280 mg (73 %)

**Summenformel:** C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub> = 0.61 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>):** δ (ppm) = 1.03 (t, 3H, J = 7.33, 4-3-H), 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 1.80 (h, 2H, J = 7.33, 4-2-H), 4.02 (t, 2H, J = 7.33, 4-1-H), 5.82 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.52 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.83 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 6.99 (d, 2H, J = 8.79, 3-H & 5-H), 7.72 (s, 2H, α-H & β-H), 7.75 (d, 2H, J = 8.79, 2-H & 6-H), 7.88 (s, 1H, 2'-H), 7.96 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>):** δ (ppm) = 10.67 (C-4-3), 23.15 (C-4-2), 28.48 (C-7'' & C-8''), 70.22 (C-4-1), 78.23 (C-6''), 115.68 (C-3 & C-5), 116.87 (C-5'), 120.15 (C-α), 121.74 (C-3'), 122.42 (C-4''), 127.96 (C-2'), 128.65 (C-1), 130.99 (C-6'), 131.14 (C-2 & C-6), 132.19 (C-5''), 132.45 (C-1'), 143.86 (C-β), 157.93 (C-4), 162.07 (C-4'), 187.85 (C=O).

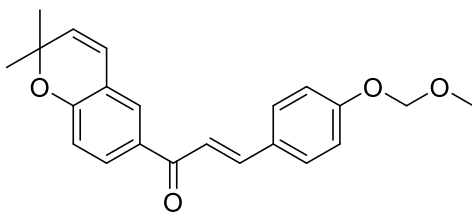
**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 28.51 min

m/z (%) = 348 (9), 334 (16), 333 (69), 291 (5), 233 (8), 147 (12), 144 (38), 41 (67), 27 (28), 4 (100).

**IR (ATR):** ν = 1653 (m), 1602 (m), 1587 (m), 1569 (m), 1510 (m), 1292 (m), 1278 (m), 1245 (s), 1140 (s), 1110 (m), 1042 (m), 1016 (m), 982 (m), 958 (m), 823 (s), 802 (s), 769 (m), 739 (m), 565 (m), 519 (m), 509 (m).

#### 6.4 Synthese der Flavonoide durch Aldolkondensation, allgemeine Vorschrift

1.0 mmol des A-Rings und 1.2 mmol des entsprechenden B-Rings wurden in 15 mL Methanol und 1.5 mL 50%ige KOH-Lösung gelöst und unter Rückfluss für drei Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 30 mL Wasser hinzugegeben und solange verdünnte Salzsäure zugegeben bis die Reaktionslösung sauer reagierte. Anschließend wurde dreimal mit je 15 mL Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als gelber Feststoff erhalten.

**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 500 mg

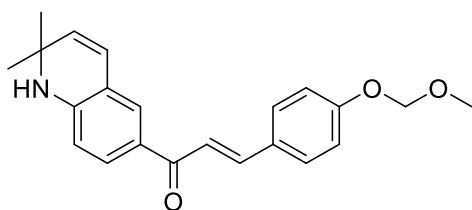
**Ausbeute:** 460 mg (53 %)

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.18 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 25.988 min

m/z (%) = 350 (60), 335 (100), 291 (50), 189 (30), 144 (35), 115 (20), 45 (100).

**(E)-1-(2,2-dimethyl-1,2-dihydroquinolin-6-yl)-3-(4-(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 300 mg

**Ausbeute:** 235 mg (45 %)

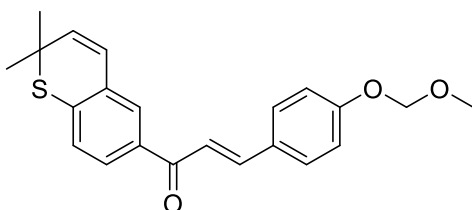
**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.58 (n-Hexan/Ethylacetat 1/1)

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 35.291 min

m/z (%) = 349 (10), 334 (100), 290 (40), 143 (15), 45 (30).



**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-thiochromen-6-yl)-3-(4-(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 300 mg

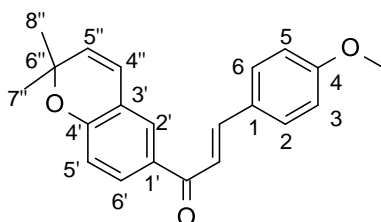
**Ausbeute:** 240 mg (48 %)

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>SO<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.46 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 32.731 min

m/z (%) = 366 (30), 351 (100), 307 (20), 160 (15), 45 (30).

**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-yl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 204 mg

**Ausbeute:** 120 mg (37 %)

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.36 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.44 (s, 6H, H-7'' & H-8''), 3.85 (s, 3H, OMe), 5.82 (d, 1H, J = 10.26, 5''-H), 6.51 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.83 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.00 (d, 2H, J = 8.79, H-3 & H-5), 7.72 (s, 2H, α-H, β-H), 7.76 (d, 2H, J = 8.30, H-2 & H-6), 7.88 (s, 1H, 2'-H), 7.96 (d, 1H; J = 8.30, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.48 (C-7'' & C-8''), 55.74 (OMe), 78.22 (C-6''), 115.17 (C-3 & C-5), 116.86 (C-5'), 120.26 (C-α), 121.72 (C-1), 122.41 (C-4''), 127.96 (C-2'), 128.78 (C-1'), 130.99 (C-6'), 131.12 (C-2 & C-6), 132.18 (C-5''), 132.41 (C-3'), 143.79 (C-β), 157.93 (C-4'), 162.53 (C-4), 187.85 (C=O).

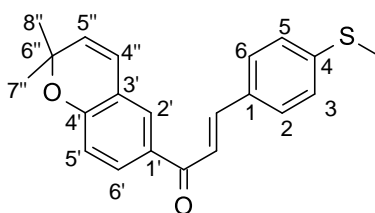
**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 23.46 min

m/z (%) = 320 (15), 305 (100), 161 (15), 144 (32), 115 (40), 87 (21).

**IR (ATR):** ν = 2973 (w), 2901 (w), 2836 (w), 1652 (m), 1598 (m), 1568 (m), 1509 (m), 1486 (m), 1462 (m), 1435 (m), 1421 (m), 1384 (m), 1366 (m), 1330 (m), 1292 (s), 1244 (s), 1204 (w), 1152 (s), 1117 (s), 1027 (s), 981 (w), 957 (m), 905 (w), 866 (s), 819 (s), 768 (s), 743 (m), 717 (w), 687 (w), 637 (w), 637 (w), 614 (w), 555 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 321,1475    vorhergesagt: 321,1485

### (E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-methylthio)phenyl)prop-2-en-1-one



**Ansatzgröße:** 210 mg

**Ausbeute:** 125 mg (37 %)

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>SO<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.50 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 2.54 (s, 3H, SMe), 5.82 (d, 1H, J = 10.26, 5''-H), 6.51 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.84 (d, 1H, J = 8.79, 5'-H), 7.32 (d, 2H, J = 8.79, 2-H & 6-H), 7.73 (m, 3H, 3-H & 5-H, α-H), 7.82 (m, 1H, β-H), 7.89 (s, 1H, 2'-H), 7.97 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 14.84 (SMe), 28.49 (C-7'' & C-8''), 78.27 (C-6''), 116.91 (C-5'), 121.67 (C-α), 121.76 (C-3'), 122.37 (C-4''), 126.63 (C-2 & C-6), 128.01 (C-2'), 129.82 (C-3 & C-5), 131.08 (C-6'), 132.23 (C-5''), 132.26 (C-4'), 132.63 (C-1), 142.98 (C-4), 143.41 (C-β), 158.06 (C-1'), 187.83 (C=O).

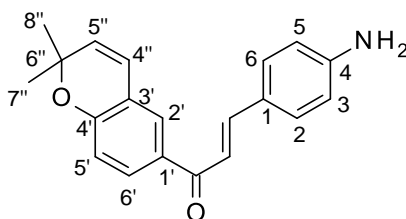
**MS (GC):**  $R_T = 28.56$  min

$m/z$  (%) = 336 (22), 321 (100), 144 (72), 115 (53), 89 (13).

**IR (ATR):**  $\nu = 2916$  (w), 2008 (w), 1650 (w), 1659 (m), 1603 (m), 1582 (m), 1548 (m), 1538 (m), 1513 (m), 1486 (m), 1434 (m), 1405 (m), 1360 (m), 1332 (m), 1322 (m), 1272 (s), 1247 (s), 1222 (m), 1210 (m), 1183 (s), 1155 (s), 1131 (s), 1107 (s), 1088 (s), 1044 (m), 983 (m), 961 (m), 920 (m), 906 (m), 866 (m), 831 (m), 810 (s), 769 (m), 752 (s), 740 (s), 706 (s), 685 (m), 664 (m), 644 (w), 596 (w), 540 (m), 523 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 337,1243    vorhergesagt: 337,1257

**(E)-3-(4-aminophenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**



**Ansatzgröße:** 130 mg

**Ausbeute:** 65 mg (52 %)

**Summenformel:**  $C_{20}H_{19}NO_2$

**$R_f$ -Wert:**  $R_f$ : 0.11 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**$^1H$ -NMR (Aceton- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.27 (s, 2H,  $NH_2$ ), 5.81 (d, 1H,  $J = 10.26$ , 5''-H), 6.51 (d, 1H,  $J = 9.77$ , 4''-H), 6.71 (d, 2H,  $J = 8.30$ , 3-H & 5-H), 6.82 (d, 1H,  $J = 8.30$ , 5'-H), 7.54 (m, 3H, 2 & 6,  $\alpha$ -H), 7.67 (m, 1H,  $\beta$ -H), 7.85 (s, 1H, 2'-H), 7.93 (d, 2H,  $J = 8.30$ , 6'-H).

**$^{13}C$ -NMR (Aceton- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 28.46 (C-7'' & C-8''), 78.09 (C-6''), 114.92 (C-3 & C-5), 116.76 (C-5'), 116.90 (C- $\alpha$ ), 121.66 (C-4'), 122.50 (C-4), 127.78 (C-2'), 130.76 (C-6'), 131.35 (C-2 & C-6), 132.09 (C-5''), 132.88 (C-3'), 145.13 (C- $\beta$ ), 152.20 (C-1), 157.62 (C-1'), 187.77 (C=O).

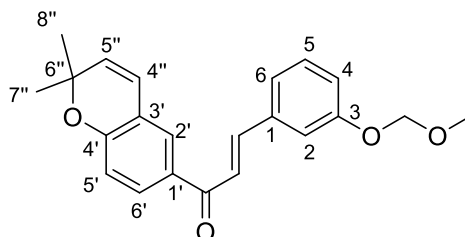
**MS (GC):**  $R_T = 29.83$  min

$m/z_{silylated}$  (%) = 380 (27), 365 (23), 232 (11), 218 (14), 217 (100).

**IR (ATR):**  $\nu = 3011$  (w), 2969 (m), 2931 (w), 1751 (s), 1672 (w), 1552 (m), 1513 (w), 1435 (m), 1365 (s), 1309 (w), 1228 (s), 1216 (s), 1152 (m), 1117 (w), 1032 (w), 905 (w), 814 (w), 742 (w), 688 (w), 539 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 306,1463    vorhergesagt: 306,1489

**(E)-1-(2,2dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(3-(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one**



**Ansatzgröße:** 220 mg

**Ausbeute:** 266 mg (69 %)

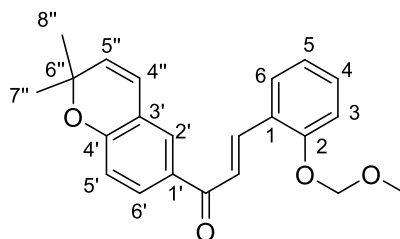
**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.15 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**MS (GC):**    R<sub>T</sub> = 24.358 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 350 (40), 335 (100), 291 (40), 274 (10), 233 (15), 144 (10), 115 (10), 45 (80)

**(E)-1-(2,2dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(2-(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one**



**Ansatzgröße:** 350 mg

**Ausbeute:** 394 mg (66 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.20 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

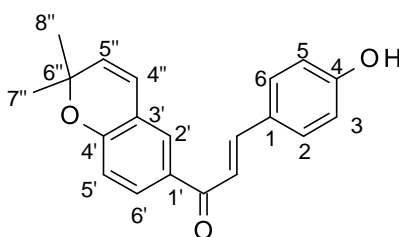
**MS (GC):**  $R_T = 23.01$  min

$m/z_{\text{silylated}}$  (%) = 350 (30), 335 (100), 289 (100), 187 (100), 144 (100), 115 (50), 45 (100).

### 6.5 Entschützen der Flavonoide, allgemeine Vorschrift

1.0 mmol des Flavonoids wurde in 15 mL Methanol gelöst und mit fünf Tropfen 3 M Salzsäure versetzt. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 40°C gerührt. Anschließend wurden 30 mL Wasser zugegeben und dreimal mit je 15 mL Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als gelber Feststoff erhalten.

#### (E)-1-(2,2dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one



**Ansatzgröße:** 200 mg

**Ausbeute:** 122 mg (61 %)

**Summenformel:**  $C_{20}H_{18}O_3$

**$R_f$ -Wert:**  $R_f$ : 0.31 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**$^1\text{H-NMR}$  (Aceton- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.81 (d, 1H,  $J = 9.77$ , 5''-H), 6.52 (d, 1H,  $J = 9.77$ , 4''-H), 6.83 (d, 1H,  $J = 8.30$ , 5'-H), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.30$ , 3-H & 5-H), 7.68 (m,  $\alpha$ -H,  $\beta$ -H, 2-H & 6-H), 7.87 (s, 1H, 2'-H), 7.95 (d, 1H,  $J = 8.30$ , 6'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (Aceton- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 28.47 (2xCH<sub>3</sub>), 78.19 (C-6''), 116.64 (C-3 & C-5), 116.84 (C-5'), 119.54 (C- $\alpha$ ), 121.70 (C-1), 122.41 (C-4''), 127.79 (C-1'), 127.92 (C-2'), 130.17 (C-6'), 130.94 (C-5''), 131.34 (C2 & C6), 132.16 (C-3'), 144.18 (C- $\beta$ ), 157.88 (C-4'), 160.57 (C-4), 187.93 (C=O).

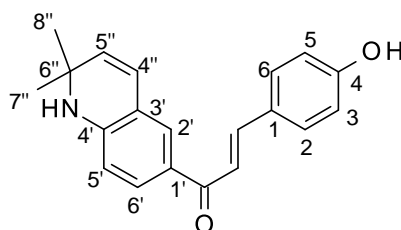
**MS (GC):**  $R_T = 25.78$  min

$m/z_{\text{silylated}}$  (%) = 378 (52), 353 (100), 174 (14), 144 (21), 115 (21), 73 (34), 45 (10).

**IR (ATR):**  $\nu$  = 2975 (w), 1721 (s), 1639 (w), 1600 (w), 1576 (s), 1515 (w), 1488 (w), 1437 (w), 1360 (s), 1273 (w), 1220 (s), 1159 (w), 1121 (w), 1092 (w), 959 (w), 908 (w), 824 (w), 771 (w), 529 (s).

**MS (TOF):** gemessen: 307,1251    vorhergesagt: 307,1329

**(E)-1-(2,2-dimethyl-1,2-dihydroquinolin-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one**



**Ansatzgröße:** 100 mg

**Ausbeute:** 36 mg (36 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.41 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 1.34 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.54 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.00 (s, 1H, NH), 6.36 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.49 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 6.89 (d, 2H, J = 8.79, 3-H & 5-H), 7.63 (m, 4H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ -H, 2-H & 6-H), 7.70 (s, 1H, 2'-H), 7.77 (d, 1H; J = 8.30, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 31.98 (C-7'' & C-8''), 53.47 (C-6''), 112.32 (C-5'), 116.55 (C-3 & C-5), 118.94 (C-1), 119.96 (C- $\alpha$ ), 123.81 (C-4''), 127.63 (C-4'), 128.15 (C-2'), 128.38 (C-1), 130.98 (C-2 & C-6), 131.14 (C-6'), 131.56 (C-5''), 142.54 (C-1'), 148.94 (C- $\beta$ ), 160.15 (C-4), 186.76 (C=O).

**MS (GC):**    R<sub>T</sub> = 33.25 min

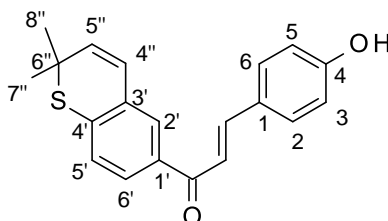
$m/z_{\text{silylated}}$  (%) = 377 (9), 362 (100), 173 (9), 143 (19), 115 (8), 73 (25).

**IR (ATR):**  $\nu$  = 3304 (w), 2962 (w), 2034 (w), 1633 (m), 1650 (m), 1595 (m), 1557 (m), 1538 (s), 1511 (s), 1505 (m), 1441 (m), 1344 (m), 1273 (m), 1253 (m), 1291 (s), 1166 (s), 1153 (s),

1137 (m), 1085 (m), 1037 (m), 978 (m), 817 (m), 775 (m), 745 (m), 719 (m), 689 (w), 621 (m), 594 (w), 548 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 306,1638    vorhergesagt: 306,1489

**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-thiochromen-6-yl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one**



**Ansatzgröße:** 150 mg

**Ausbeute:** 70 mg (46 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>SO<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.21 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.92 (d, 1H, J = 11.72, 5''-H), 6.62 (d, 1H, J = 10.26, 4''-H), 6.93 (d, 2H, J = 8.30, 3-H & 5-H), 7.25 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.7 (m, 4H, α-H, β-H, 2-H & 6-H), 7.91 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H), 7.98 (s, 1H, 2'-H).

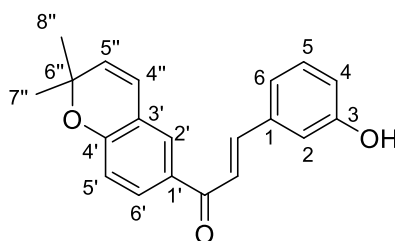
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 30.23 (C-7'' & C-8''), 42.46 (C-6''), 116.70 (C-3 & C-5), 119.43 (C-α), 126.70 (C-4''), 127.63 (C-1), 127.69 (C-5'), 128.43 (C-6''), 128.59 (C-2'), 131.49 (C-3'), 131.69 (C-2 & C-6), 135.35 (C-5''), 136.55 (C-4'), 138.67 (C-1'), 144.82 (C-β), 160.76 (C-4), 188.51 (C=O).

**MS (GC):**    R<sub>T</sub> = 21.11 min

m/Z<sub>silylated</sub> (%) = 394 (25), 379 (100), 160 (9), 115 (6), 73 (17).

**IR (ATR):** ν = 2981 (w); 2966 (w), 2943 (w), 1708 (s), 1667 (w), 1601 (w), 1583 (w), 1514 (w), 1435 (m), 1359 (s), 1271 (m), 1203 (s), 1157 (m), 1120 (m); 1092 (w), 1027 (w), 958 (w), 902 (w), 825 (w), 762 (w), 746 (w), 679 (w), 528 (s).

**MS (TOF):** gemessen: 323,1094    vorhergesagt: 323,11

**(E)-1-(2,2dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(3-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 266 mg

**Ausbeute:** 180 mg (70 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.15 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.83 (d, 1H, J = 9.86, 5''-H), 6.52 (d, 1H, J = 9.86, 4''-H), 6.84 (d, 1H, J = 8.30, H-5'), 6.92 (m, 1H, H-2), 7.26 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 7.66 (d, 1H, J = 15.57, H-α), 7.77 (d, 1H, J = 15.57, H-β), 7.89 (s, 1H, H-2'), 7.97 (d, 1H, J = 10.90, H-6').

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.50 (C-7'' & C-8''), 78.30 (C-6''), 115.76 (C-4), 116.95 (C-2), 118.26 (C-5'), 120.68 (C-4''), 121.69 (C-1'), 122.24 (C-2'), 122.37 (C-α), 122.71 (C-5''), 122.94 (C-6), 128.08 (C-6'), 128.28 (C-5''), 131.13 (C-5), 144.00 (C-β), 158.12 (C-3), 158.69 (C-4'), 187.95 (C=O).

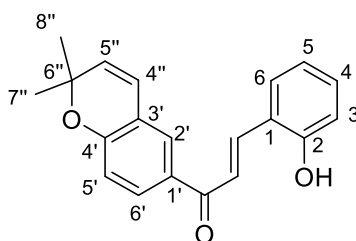
**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 22.64 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 378 (30), 363 (100), 203 (10), 174 (20), 144 (30), 115 (20), 73 (25).

**IR (ATR):** ν = 2357 (m), 1653 (m), 1607 (s), 1591 (s), 1488 (w), 1446 (w), 1360 (m), 1328 (m), 1278 (m), 1249 (m), 1211 (m), 1178 (s), 1153 (m), 1079 (w), 966 (m), 844 (w), 824 (m), 782(s), 589 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 307,1338    vorhergesagt: 307,1329



**(E)-1-(2,2dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(3-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 395 mg

**Ausbeute:** 360 mg (91 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.21 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.43 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.80 (d, 1H, J = 9.86, 5''-H), 6.50 (d, 1H, J = 9.86, 4''-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.30, 3-H), 6.90 (t, 1H, J = 7.27, 5-H), 6.96 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.25 (t, 1H, J = 7.27, 4-H), 7.77 (d, 1H, J = 7.79, 6-H), 7.84 (m, 2H, α-H, 2'-H), 7.92 (d, 1H, J = 8.82, 6'-H), 8.13 (d, 1H, J = 15.57, β-H).

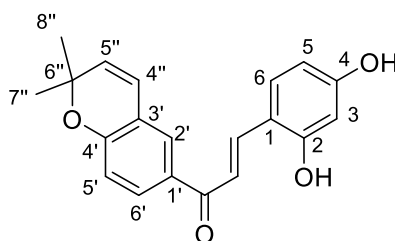
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.20 (C-7'' & C-8''), 85.30 (C-6''), 117.15 (C-3), 118.15 (C-5'), 121.26 (C-5), 121.48 (C-α), 121.95 (C-3'), 122.87 (C-1), 122.96 (C-4''), 126.15 (C-2'), 128.73 (C-6), 129.31 (C-4), 129.86 (C-6'), 130.23 (C-1'), 141.02 (C-β), 157.21 (C-2), 160.12 (C-4'), 189.71 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 21.338 min

m/z<sub>Silylated</sub> (%) = 378 (30), 363 (100), 273 (10), 187 (20), 144 (30), 115 (20), 73 (25), 45 (10).

**IR (ATR):** ν = 2357 (m), 1633 (m), 1601 (s), 1557 (s), 1488 (w), 1457 (w), 1364 (m), 1339 (m), 1301 (m), 1248 (m), 1212 (m), 1175 (s), 1122 (m), 957 (m), 828 (w), 589 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 307,1316    vorhergesagt: 307,1329

**(E)-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 580 mg

**Ausbeute:** 190 mg (34 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.40 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.27 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.98 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.18 (d, 2H, J = 8.30, 3-H & 5-H), 6.88 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 7.03 (d, 1H, J = 8.30, H-5'), 7.11 (s, 1H, H-2'), 7.42 (d, 1H, J = 15.57, H-α), 7.70 (d, 1H, J = 8.30, 6-H), 7.97 (d, 1H, J = 10.23, 6'-H), 8.27 (d, 1H, J = 15.57, H-β).

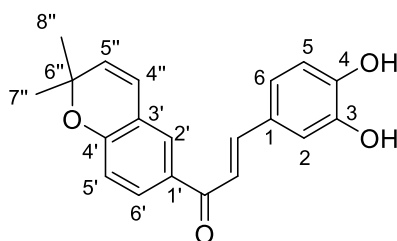
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.25 (C-7'' & C-8''), 85.20 (C-6''), 103.51 (C-3), 108.75 (C-5), 115.87 (C-1), 118.18 (C-5'), 121.89 (C-α), 122.48 (C-4''), 122.91 (C-3'), 126.98 (C-2'), 129.33 (C-1'), 129.77 (C-6'), 131.73 (C-6), 141.08 (C-β), 159.31 (C-4), 160.21 (C-2), 160.32 (C-4'), 189.78 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 25.77 min

m/z<sub>Silylated</sub> (%) = 468 (2), 452 (10), 451 (25), 281 (6), 207 (13), 144 (11), 73 (33), 28 (6), 4 (100).

**IR (ATR):** ν = 1637 (m), 1602 (s), 1573 (s), 1511 (m), 1489 (m), 1448 (m), 1369 (m), 1341 (m), 1278 (m), 1251 (s), 1212 (m), 1159 (s), 1122 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 323,1259    vorhergesagt: 323,1278

**(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 520 mg

**Ausbeute:** 320 mg (80 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.43 (n-Hexan/Ethylacetat 2/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.44 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.81 (d, 1H, J = 9.86, 5''-H), 6.51 (d, 1H, J = 9.86, 4''-H), 6.83 (d, 1H, J = 8.82, 5-H), 6.89 (d, 1H, J = 7.79, 5'-H), 7.17 (d, 1H, J = 7.79, 6'-H), 7.30 (s, 1H, 2'-H), 7.62 (m, 2H, 6-H, 2-H), 7.87 (m, 1H, α-H), 7.94 (m, 1H, β-H).

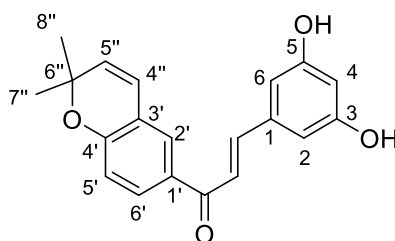
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.48 (C-7'' & C-8''), 78.20 (C-6''), 115.67 (C-2), 116.34 (C-5), 116.86 (C-5'), 119.66 (C-a), 121.71 (C-3'), 122.43 (C-4'), 122.97 (C-6), 127.93 (C-2'), 128.43 (C-6''), 130.96 (C-1'), 132.16 (C-5''), 132.51 (C-1), 144.53 (C-b), 146.30 (C-4), 146.30 (C-3), 157.87 (C-4'), 187.90 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 30.24 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 466 (40), 451 (100), 363 (30), 191 (10), 144 (15), 73 (45).

**IR (ATR):** ν = 1648 (m), 1633 (w), 1575 (s), 1531 (m), 1494 (w), 1442 (w), 1365 (m), 1308 (m), 1281 (m), 1119 (m), 1104 (s), 1033 (m), 968 (m), 824 (m), 763 (m), 695 (m), 619 (s), 593 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 323,1285    vorhergesagt: 323,1278

**(E)-3-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 200 mg

**Ausbeute:** 125 mg (77 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>:0.40 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.44 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.82 (d, 1H, J = 10.26, 5''-H), 6.45 (s, 1H, 4-H), 6.52 (d, 1H, J = 10.26, 4''-H), 6.75 (s, 2H, 2-H & 6-H), 6.84 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.56 (d, 1H, J = 14.16, α-H), 7.68 (d, 1H, J = 14.16, β-H), 7.88 (s, 1H, 2'-H), 7.95 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H), 8.43 (s, 2H, 2x OH).

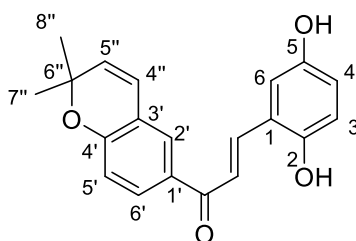
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.50 (C-7'' & C-8''), 78.28 (C-6''), 105.63 (C-4), 107.80 (C-2 & C-6), 116.95 (C-5'), 121.76 (C-α), 122.36 (C-3'), 122.60 (C-4''), 128.06 (C-5''), 131.08 (C-1'), 132.21 (C-6'), 138.11 (C-1), 144.27 (C-b), 158.10 (C-4'), 159.73 (C-3 & C-5), 188.00 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 28.89 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 466 (30), 451 (100), 218 (15), 144 (10), 73 (40).

**IR (ATR):** ν = 1637 (m), 1602 (s), 1573 (s), 1511 (m), 1489 (m), 1448 (m), 1369 (m), 1341 (m), 1278 (m), 1251 (s), 1212 (m), 1159 (s), 1122 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 323,126      vorhergesagt: 323,1278

**(E)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 320 mg

**Ausbeute:** 150 mg (57 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.51 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.44 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.82 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.52 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.82 (m, 3H, 3-H & 4-H & 5'-H), 7.22 (s, 1H, 6-H), 7.75 (d, 1H, J = 15.63, α-H), 7.86 (s, 1H, 2'-H), 7.93 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H), 8.09 (d, 1H, J = 15.63, β-H).

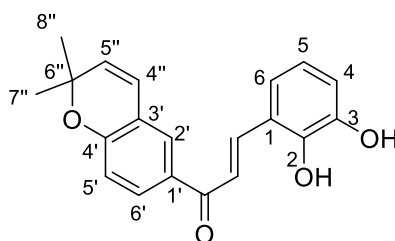
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.28 (C-7'' & C-8''), 78.01 (C-6''), 114.37 (C-6), 116.69 (C-3), 117.60 (C-4), 119.63 (C-1), 121.53 (C-a), 121.85 (C-5'), 122.21 (C-4''), 123.27 (C-3'), 127.74 (C-2'), 130.76 (C-1'), 131.98 (C-6'), 132.30 (C-5''), 139.34 (C-b), 150.90 (C-2), 151.15 (C-5), 157.70 (C-4'), 188.13 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 26.99 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 466 (60), 451 (100), 377 (30), 307 (25), 225 (15), 187 (15), 144 (25), 73 (30).

**IR (ATR):** ν = 1634 (m), 1601 (s), 1574 (s), 1557 (m), 1488 (m), 1455 (m), 1367 (m), 1338 (m), 1266 (m), 1251 (s), 1220 (m), 1169 (s), 1120 (m), 1037 (w), 978 (m), 958 (m), 823 (m), 748 (m), 695 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 323,1271    vorhergesagt: 323,1278

**(E)-3-(2,3-dihydroxyphenyl)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 700 mg

**Ausbeute:** 320 mg (60 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.56 (n-Hexan/Ethylacetat 2/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.43 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.80 (d, 1H, J = 10.26, 5''-H), 6.50 (d, 1H, J = 10.26, 4''-H), 6.71 (t, 1H, J = 7.92, 5-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 6.90 (d, 1H, J = 7.82, 4-H), 7.28 (d, 1H, J = 7.82, 6-H), 7.81 (m, 2H, α-H, 2'-H), 7.92 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H), 8.12 (d, 1H, J = 15.63, β-H).

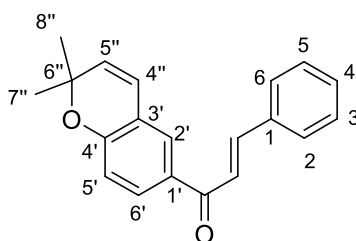
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.28 (C-7'' & C-8''), 78.03 (C-6''), 116.69 (C-5'), 117.16 (C-4), 120.12 (C-5), 120.15 (C-6), 121.55 (C-1), 122.19 (C-4''), 122.21 (C-α), 123.05 (C-3'), 127.75 (C-2'), 130.78 (C-6'), 132.00 (C-5''), 132.29 (C-1'), 139.23 (C-β), 145.75 (C-3), 146.37 (C-2), 157.73 (C-4'), 188.14 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 26.99 min

m/z<sub>Silylated</sub> (%) = 466 (40), 451 (100), 377 (40), 307 (25), 187 (15), 144 (25), 73 (40).

**IR (ATR):** ν = 2361 (w), 1634 (m), 1601 (s), 1575 (s), 1487 (m), 1466 (m), 1434 (m), 1328 (m), 1273 (m), 1268 (m), 1210 (s), 1159 (m), 1121 (s), 1038 (m), 958 (m), 769 (m), 615 (m), 596 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 323,1271    vorhergesagt: 323,1278

**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 520 mg

**Ausbeute:** 360 mg (67 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub> = 0.38 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.83 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.52 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.85 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.44 (m, 3H, 3-H & 4-H & 5-H), 7.76 (s, 1H, β-H), 7.80 (m, 2H, 2-H & 6-H), 7.84 (s, 1H, α-H), 7.90 (s, 1H, 2'-H), 7.98 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

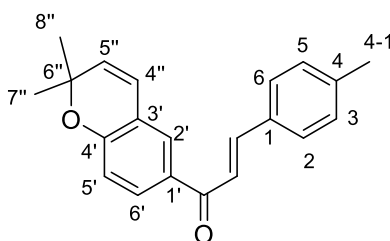
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 25.50 (C-7'' & C-8''), 78.31 (C-6''), 116.95 (C-5''), 121.79 (C-4'), 122.36 (C-4''), 122.77 (C-α), 128.09 (C-2'), 129.35 (C-2 & C-6), 129.75 (C-3 & C-5), 131.06 (C-4), 131.14 (C-6'), 132.17 (C-1'), 132.26 (C-5''), 136.22 (C-1), 143.87 (C-β), 158.14 (C-4'), 187.93 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 16.93 min

m/z (%) = 290 (11), 276 (23), 275 (100), 137 (14), 103 (10), 77 (11), 4 (5).

**IR (ATR):** ν = 1652 (m), 1606 (s), 1585 (m), 1573 (m), 1486 (m), 1330 (m), 1277 (m), 1247 (m), 1159 (s), 1134 (s), 1110 (m), 979 (m), 958 (m), 860 (w), 825 (m), 763 (s), 749 (m), 697 (s), 683 (s), 565 (m), 516 (m), 479 (w)

**MS (TOF):** gemessen: 291,1298    vorhergesagt: 291,138

**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(p-tolyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 790 mg

**Ausbeute:** 550 mg (69 %)

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub> = 0.50 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>):** δ (ppm) = 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 2.36 (s, 3H, 4-1-H), 5.83 (d, 1H, J = 10.26, 5''-H), 6.52 (d, 1H, J = 10.26, 4''-H), 6.84 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.27 (d, 2H, J = 8.30, 3-H & 5-H), 7.70 (d, 2H, J = 8.30, 2-H & 6-H), 7.74 (s, 1H, α-H), 7.79 (s, 1H, β-H), 7.89 (s, 1H, 2'-H), 7.97 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>):** δ (ppm) = 21.39 (C-4-1), 28.49 (C-7'' & C-8''), 78.27 (C-6''), 116.91 (C-5'), 121.69 (C-α), 121.76 (C-3'), 122.37 (C-4''), 128.06 (C-2'), 129.39 (C-2 & C-6), 130.41 (C-3 & C-5), 131.08 (C-6'), 132.22 (C-5''), 132.26 (C-1'), 133.47 (C-4), 141.43 (C-1), 143.94 (C-β), 158.05 (C-4'), 187.93 (C=O).

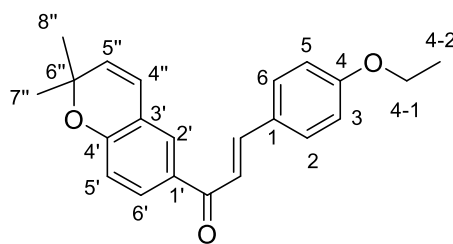
**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 19.04 min

m/z (%) = 304 (11), 290 (23), 289 (100), 137 (14), 115 (18), 91 (8), 4 (17).

**IR (ATR):** ν = 1652 (m), 1606 (m), 1584 (m), 1327 (m), 1276 (m), 1156 (s), 1135 (m), 987 (w), 812 (s), 768 (w), 689 (m), 525 (m), 492 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 305,1524    vorhergesagt: 305,1536



**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-ethoxyphenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 600 mg

**Ausbeute:** 220 mg (56 %)

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.40 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>):** δ (ppm) = 1.39 (t, 3H, J = 7.33, 4-2-H), 1.45 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 4.11 (q, 2H, J = 7.33, 4-1-H), 5.82 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.52 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.83 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 6.98 (d, 2H, J = 8.30, 3-H & 5-H), 7.71 (s, 2H, α-H & β-H), 7.75 (d, 2H, J = 8.30, 2-H & 6-H), 7.88 (s, 1H, 2'-H), 7.96 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

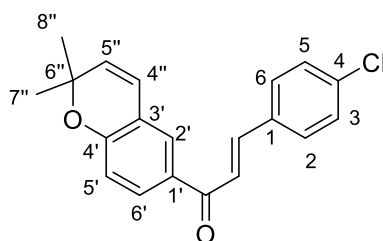
**<sup>13</sup>C-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>):** δ (ppm) = 14.97 (C-4-2), 28.48 (C-7'' & C-8''), 64.26 (C-4-1), 78.23 (C-6''), 115.65 (C-3 & C-5), 116.87 (C-5'), 120.17 (C-α), 121.73 (C-3'), 122.42 (C-4''), 127.96 (C-2'), 128.65 (C-1), 130.99 (C-5''), 131.14 (C-2 & C-6), 132.19 (C-6'), 132.45 (C-1'), 143.85 (C-β), 157.93 (C-4), 161.90 (C-4'), 187.85 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 25.91 min

m/z (%) = 334 (18), 320 (26), 319 (100), 145 (20), 115 (9), 91 (8).

**IR (ATR):** ν = 1649 (w), 1599 (m), 1568 (m), 1512 (m), 1479 (m), 1293 (w), 1278 (m), 1243 (s), 1224 (w), 1154 (s), 1131 (s), 1113 (m), 1044 (m), 985 (m), 964 (w), 919 (m), 907 (w), 824 (s), 804 (s), 770 (m), 744 (m), 718 (w), 688 (m), 570 (m), 514 (m), 500 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 335,1432    vorhergesagt: 335,1642

**(E)-3-(4-chlorphenyl)-1-(2,2-dihmethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 620 mg

**Ausbeute:** 375 mg (63 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>Cl

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.42 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.27 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.98 (d, 1H, J = 10.26, 5''-H), 6.82 (d, 1H, J = 10.26, 4''-H), 6.98 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.47 (d, 2H, J = 8.30, 3-H & 5-H), 7.71 (d, 2H, J = 8.30, 2-H & 6-H), 7.60 (s, 1H, α-H), 7.80 (s, 1H, β-H), 7.83 (s, 1H, 2'-H), 7.97 (d, 1H, J = 8.30, 6'-H).

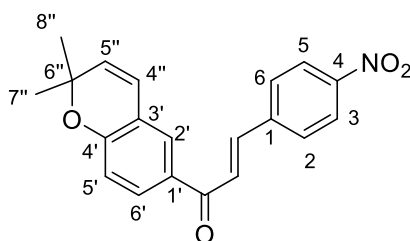
**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 28.20 (C-7'' & C-8''), 45.47 (C-6''), 115.70 (C-3 & C-5), 119.18 (C-α), 126.12 (C-4''), 126.63 (C-1), 127.85 (C-5'), 127.93 (C-6'), 128.55 (C-2'), 131.47 (C-3'), 132.61 (C-2 & C-6), 134.35 (C-5''), 137.35 (C-4'), 139.28 (C-1'), 145.80 (C-β), 161.96 (C-4), 189.37 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 21.51 min

m/z (%) = 324 (7), 311 (36), 309 (100), 165 (11), 145 (16), 144 (64), 115 (69), 89 (15), 75 (29), 51 (19), 4 (25).

**IR (ATR):** ν = 1655 (m), 1609 (m), 1586 (m), 1488 (m), 1327 (m), 1274 (m), 1156 (s), 1135 (m), 1090 (m), 983 (w), 817 (s), 771 (w), 736 (w), 706 (w), 520 (m).

**MS (TOF):** gemessen: 325,0934    vorhergesagt: 325,099

**(E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 600 mg

**Ausbeute:** 370 mg (61 %)

**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>

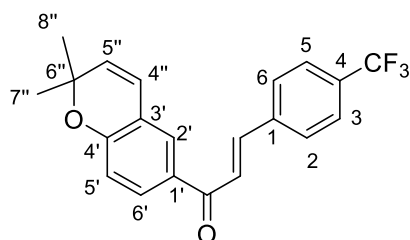
**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub> = 0.39 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 27.63 min

m/z (%) 335 (5), 321 (15), 320 (73), 290 (16), 274 (9), 144 (9), 115 (7), 4 (100).

**IR (ATR):**  $\nu$  = 1658 (m), 1594 (m), 1513 (s), 1487 (m), 1330 (s), 1311 (m), 1276 (m), 1248 (w), 1206 (m), 1178 (s), 1135 (m), 1107 (m), 1086 (w), 976 (w), 956 (w), 853 (w), 838 (m), 820 (m), 758 (m), 700 (m), 517 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 336,1203    vorhergesagt: 336,123

**(E)-1-(2,2-dihmethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)prop-2-en-1-one**

**Ansatzgröße:** 650 mg

**Ausbeute:** 250 mg (39 %)

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub> = 0.35 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 1.38 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 5.04 (m, 2H, 3-H & 5-H), 5.77 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.42 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.66 (d, 1H, J = 8.79, 5'-H), 7.44 (d, 2H, J = 8.30, 2-H & 6-H), 7.55 (m, 3H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ -H, 2'-H), 7.65 (d, 1H, J = 8.55, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 27.50 (C-7'' & C-8''), 41.85 (C-3), 49.28 (C-5), 77.42 (C-6''), 115.87 (C-5'), 120.69 (C-3'), 121.41 (C-4''), 124.68 (C-2), 124.72 (C-6), 127.06 (C- $\alpha$ ), 129.05 (C-2'), 129.86 (C-4), 130.12 (C-6'), 131.37 (C-5''), 144.44 (C- $\beta$ ), 157.31 (C-4'), 195.90 (C=O).

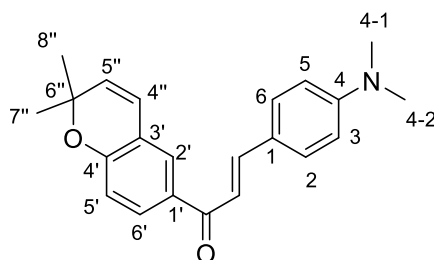
**MS (GC):**  $R_T$  = 16.05 min

m/z (%) 358 (8), 344 (24), 343 (100), 137 (14), 115 (8), 4 (5).

**IR (ATR):**  $\nu$  = 1665 (m), 1602 (w), 1329 (s), 1269 (m), 1159 (s), 1110 (s), 1068 (s), 1017 (w), 843 (w), 827 (m), 769 (w), 739 (w), 722 (w), 670 (w), 605 (w), 527 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 359,1218    vorhergesagt: 359,1253

### (E)-1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-en-1-one



**Ansatzgröße:** 600 mg

**Ausbeute:** 375 mg (61 %)

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub> = 0.15 (n-Hexan/Ethylacetat 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 1.42 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 3.04 (s, 6H, 4-1-H & 4-2-H), 5.81 (d, 1H, J = 9.77, 5''-H), 6.51 (d, 1H, J = 9.77, 4''-H), 6.76 (d, 2H, J = 8.79, 3-H & 5-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.30, 5'-H), 7.65 (m, 4H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ -H, 2-H, 6-H), 7.85 (s, 1H, 2'-H), 7.93 (d, 1H, J = 8.55, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 28.27 (C-7'' & C-8''), 39.94 (C-4-1 & C-4-2), 77.90 (C-6''), 112.50 (C-3 & C-5), 116.58 (C-5'), 116.89 (C- $\alpha$ ), 121.47 (C-1), 122.31 (C-4''), 123.52 (C-3'),

127.58 (C-2'), 130.57 (C-6'), 130.91 (C-2 & C-6), 131.91(C-5'') 132.71 (C-1'), 144.74 (C-β), 152.84 (C-4), 157.43 (C-4'), 187.51 (C=O).

**MS (GC):**  $R_T = 31.91$  min

m/z (%) 333 (68), 332 (7), 319 (23), 318 (100), 302 (7), 174 (18), 159 (37), 121 (15), 77 (7), 4 (37).

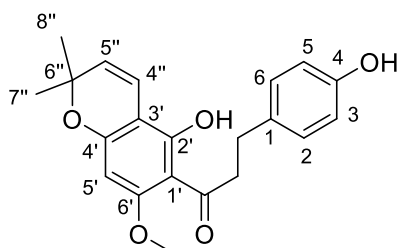
**IR (ATR):**  $\nu = 1599$  (m), 1568 (s), 1519 (s), 1485 (m), 1433 (m), 1361 (m), 1334 (m), 1271 (w), 1249 (m), 1213 (w), 1159 (s), 1116 (s), 1027 (m), 1001 (w), 981 (m), 945 (m), 905 (w), 866 (w), 809 (s), 768 (m), 744 (m), 718 (w), 680 (m), 614 (w), 594 (w), 518 (m), 473 (w), 436 (w).

**MS (TOF):** gemessen: 334,1775    vorhergesagt: 334,1802

## 6.6 Reduzieren der $\alpha,\beta$ -Doppebindung

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 0.1 mmol Stryker Katalysator in 7 mL trockenem Benzol vorgelegt. Dazu wurden 1.6 mmol des zu reduzierenden Flavonoids und 3.1 mmol Phenylsilan zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 20 mL Ethylacetat zugegeben und nacheinander mit je 15 mL Ammoniumchlorid, Natriumhydrogencarbonat und Natriumchlorid gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch säulenchromatographische Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat) über Kieselgel als 'gelber Feststoff erhalten.

### 1-(5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one



**Ansatzgröße:** 550 mg

**Ausbeute:** 300 mg (53 %)

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.56 (n-Hexan/Ethylacetat 3/2)

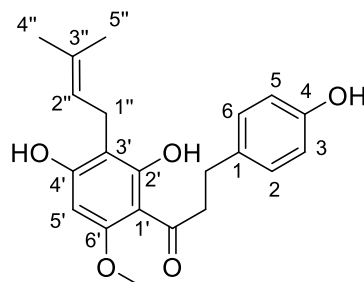
**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 1.41 (s, 6H, 7''-H & 8''-H), 2.85 (dd, 2H, J = 9.08, ehem.  $\beta$ -H), 3.25 (dd, 2H, J = 8.29, ehem.  $\alpha$ -H), 3.91 (s, 3H, OMe), 5.54 (d, 1H, J = 9.86, 5''-H), 5.93 (s, 1H, 5'-H), 6.59 (d, 1H, J = 9.86, 4''-H), 6.75 (d, 2H, J = 8.30, 3-H & 5-H), 7.08 (d, 2H, J = 8.30, 2-H & 6-H), 8.07 (s, 1H, 4-OH), 14.36 (s, 1H, 2'-OH).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 23.53 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 498 (15), 483 (100), 393 (40), 305 (40), 263 (60), 179 (85), 73 (75).

**MS (TOF):** gemessen: 355,1455    vorhergesagt: 355,154

**1-(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one**



**Ansatzgröße:** 350 mg

**Ausbeute:** 130 mg (37 %)

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** R<sub>f</sub>: 0.44 (n-Hexan/Ethylacetat 1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 1.62 (s, 3H, 4''-H), 1.74 (s, 3H, 5''-H), 2.85 (t, 2H, J = 15.57 Hz, β-H), 3.22 (t, 2H, J = 12.36, α-H), 3.25 (d, 2H, J = 4.58, 1''-H), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.21 (t, 1H, J = 13.28, 2''-H), 6.09 (s, 1H, 5'-H), 6.74 (d, 2H; J = 8.24, 3 & 5-H), 7.08 (d, 2H, J = 8.24, 2 & 6-H), 8.08 (s, 1H, 4-OH), 9.15 (s, 1H, 4'-OH), 14.28 (s, 1H, 2'-OH).

**<sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 17.32 (C-4''), 21.43 (C-1''), 25.33 (C-4''), 30.24 (C-b), 46.43 (C-a), 55.38 (OCH<sub>3</sub>), 90.78 (C-5'), 108.16 (C-3'), 115.45 (C-3 & C-5), 123.38 (C-2''), 129.63 (C-2 & C-6), 130.43 (C-3''), 155.84 (C-4), 161.62 (C-6'), 162.30 (C-4'), 165.17 (C-2'), 204.92 (C=O).

**MS (GC):** R<sub>T</sub> = 24.40 min

m/z<sub>silylated</sub> (%) = 572 (10), 557 (100), 379 (30), 352 (25), 303 (10), 179 (40), 73 (40).

**MS (TOF):** gemessen: 357,1676    vorhergesagt: 357,1697

## **7 Untersuchungen der Cyclodextrinkomplexe**

### **7.1 Herstellung der Cyclodextrinkomplexe**

1 mmol 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin wurde in 10 mL Wasser unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst. Zu dieser Lösung wurde 1 mmol Xanthohumol C in 1 mL Aceton gegeben und über Nacht weitergerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Der Komplex lag als gelber, watteartiger Feststoff vor. Um eine homogene Verbindung zu erhalten, musste der Feststoff mit dem Mörser noch zerrieben werden.

### **7.2 Herstellung des physikalischen Gemischs**

Jeweils 1 mmol Xanthohumol C und 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin wurden in ein Becherglas gegeben und für 5 min mit einem Spatel trocken vermengt, bis eine homogene Mischung entstanden war.



### 7.3 Quantitative Bestimmung des Xanthohumol C Gehalts im Komplex

Der Gehalt der Flavonoid-Einschluss-Komplexe in Cyclodextrin wurde mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie bestimmt. Hierfür wurden Kalibriergeraden der eingesetzten Reinsubstanzen in Konzentrationen von 0,001 – 0,01 mg/mL eingespritzt und gegen die erhaltenen Flächen in ein Diagramm aufgetragen. Die Einschlusskomplexe wurden eingewogen (ungefähr 10 mg Probenmenge) und mit 1 mL Lösungsmittel (Wasser-Acetonitril 1:1) gelöst. Die prozentuale Einschlussmenge wurde durch Division der erhaltenen Massenkonzentration des Flavonoids durch die eingesetzte Gesamtmasse des Komplexes errechnet.

Tabelle 4: Rohdaten der Kalibriergerade für die Gehaltsbestimmung mittels HPLC.

$\beta$ (XC) / mg/mL	Absorbanz
0,001	0,1472
0,002	0,235
0,003	0,3235
0,004	0,4118
0,005	0,503
0,006	0,5918
0,007	0,6783
0,008	0,7827
0,009	0,8819
0,01	0,9601

#### 7.4 Löslichkeitsstudien

In gläsernen Probengefäßen wurden 0.02 mg ( $5.68E-2 \mu\text{mol}$ ) Xanthohumol C vorgelegt. Anschließend wurden 1 mL Wasser oder Lösungen mit steigendem Cyclodextringehalt ( $0 \mu\text{mol} - 2.84 \mu\text{mol}$  ( $\cong 1:50$ -facher Überschuss) Cyclodextrin ) zugegeben und für 12 h auf einem Vertikalschüttler inkubiert. Die Proben wurden bei 12.000 rcf für 5 min zentrifugiert und der Überstand in die Hochdruckflüssigchromatographie injiziert. Es wurde ein Gradient von 35 % bis 95 % organischer Phase in 9.85 min mit einem Fluss von 0.3 mL/min durchlaufen. Die Konzentration von Xanthohumol C wurde durch die UV-Zelle bei 370 nm bestimmt.

Tabelle 5: Rohdaten der Löslichkeitsstudien aus der HPLC. Die Stoffmenge Cyclodextrin (n (XC)) stellt den Mittelwert der Dreifachbestimmung dar. Der Fehler ist die Standardabweichung der drei Messwerte.

n (CD) / $\mu\text{mol}$	n (XC) / $\mu\text{mol}$	Fehler
0	0,01105	4,80E-04
0,56818	0,03443	0,00171
1,13636	0,09259	9,13E-04
1,70455	0,13404	0,00626
2,27273	0,17552	0,00533
2,84091	0,23244	0,00845

### 7.5 Bestimmung der Bildungskonstante des Einschlusskomplexes

Xanthohumol C wurde in einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/L}$  in Wasser/Acetonitril (60/40) gelöst und mehrfach in die Hochdruckflüssigchromatographie (Shimadzu) injiziert. Es wurde ein isokratischer Fluss von 0.3 mL/min und einem Lösungsmittelverhältnis von 60 % Wasser und 40 % Acetonitril eingestellt. Bei jedem Lauf wurde eine definierte Menge Cyclodextrin (0 – 50 mmol/L) als Laufmittel zugegeben. Als Säule wurde eine 2.6u C18 verwendet.

Tabelle 6: Rohdaten aus der HPLC-Messung zur Bestimmung der Bildungskonstante.

RT / min	c (CD) / mmol/L	B-Anteil / %	k	1/k
22,142	0	0	14,895	0,067
16,909	0,005	10	11,139	0,090
14,869	0,01	20	9,674	0,103
13,251	0,015	30	8,513	0,117
11,909	0,02	40	7,549	0,132
10,792	0,025	50	6,747	0,148
9,885	0,03	60	6,096	0,164
9,1	0,035	70	5,533	0,181
8,345	0,04	80	4,991	0,200
7,75	0,045	90	4,564	0,219
7,24	0,05	100	4,197	0,238

## **7.6 Dynamische Differenzkalorimetrie**

Die Messungen wurden an einem Mettler DSC 12E durchgeführt. Verglichen wurden sowohl die Reinsubstanzen von Xanthohumol C und 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin, als auch das physikalische Gemisch und der Komplex. Dafür wurden jeweils 10 mg Probe in Aluminiumgefäße gefüllt und mit einer Heizrate von 10°C/min bis 250°C aufgeheizt. Gemessen wurde unter Stickstoffstrom, um eine inerte Umgebung zu schaffen.

## **7.7 Massenspektrometrische Untersuchung des Komplexes**

Die Massenspektren wurden auf einem Shimadzu Flugzeitmassenspektrometer mit Ionenfalle über den Infusion Modus. Dafür wurden die Proben in Wasser gelöst ( $c = 150 \mu\text{mol/L}$ ) und mit Natriumchlorid versetzt, um eine bessere Ionisierung zu gewährleisten. Verglichen wurde eine reine HP- $\beta$ -Cyclodextrinlösung mit der Flavonoid-Einschlusskomplexlösung. Zur Auswertung wurden nur die Messungen des positiven Modus verwendet. Als Temperatur der ESI-Quelle wurden 175 °C und eine Spannung von 3.5 kV angelegt.

## 8 Literatur

1. Hänsel R, Sticher O. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*: Springer Medizin Verlag; 2009
2. Stevens JF, Taylor AW, Nickerson GB, Ivancic M, Henning J, Haunold A, Deinzer ML. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry* 2000; 53: 759-775
3. James PT, Rigby N, Leach R, International Obesity Task F. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; 11: 3-8
4. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, National Heart L, Blood I. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438
5. Ervin RB. Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report* 2009, DOI: 1-7
6. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Dev* 2003; 17: 313-321
7. Lee DW, Yu BP. Modulation of free radicals and superoxide dismutases by age and dietary restriction. *Aging (Milano)* 1990; 2: 357-362
8. Cock TA, Houten SM, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: too much of a good thing causes harm. *EMBO Rep* 2004; 5: 142-147
9. Smith BA, Edwards MS, Ballachey BE, Cramer DA, Sutherland TM. Body weight and longevity in genetically obese and non-obese mice fed fat-modified diets. *Growth Dev Aging* 1991; 55: 81-89
10. Mendes V, Monteiro R, Pestana D, Teixeira D, Calhau C, Azevedo I. Xanthohumol influences preadipocyte differentiation: implication of antiproliferative and apoptotic effects. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 11631-11637

11. Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Baile CA. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis* 2007; 12: 1953-1963
12. Kiyofuji A, Yui K, Takahashi K, Osada K. Effects of xanthohumol-rich hop extract on the differentiation of preadipocytes. *J Oleo Sci* 2014; 63: 593-597
13. Yui K, Kiyofuji A, Osada K. Effects of xanthohumol-rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Oleo Sci* 2014; 63: 159-168
14. Quan X, Wang Y, Ma X, Liang Y, Tian W, Ma Q, Jiang H, Zhao Y. alpha-Mangostin induces apoptosis and suppresses differentiation of 3T3-L1 cells via inhibiting fatty acid synthase. *PLoS One* 2012; 7: e33376
15. Liu M, Hansen PE, Wang G, Qiu L, Dong J, Yin H, Qian Z, Yang M, Miao J. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* 2015; 20: 754-779
16. Nozawa H. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 754-761
17. Legette LL, Luna AY, Reed RL, Miranda CL, Bobe G, Proteau RR, Stevens JF. Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry* 2013; 91: 236-241
18. Costa R, Negrao R, Valente I, Castela A, Duarte D, Guardao L, Magalhaes PJ, Rodrigues JA, Guimaraes JT, Gomes P, Soares R. Xanthohumol modulates inflammation, oxidative stress, and angiogenesis in type 1 diabetic rat skin wound healing. *J Nat Prod* 2013; 76: 2047-2053
19. Costa R, Rodrigues I, Guardão L, Lima JQ, Sousa E, Soares R, Negrão R. Modulation of VEGF signaling in a mouse model of diabetes by xanthohumol and 8-prenylnaringenin: Unveiling the angiogenic paradox and metabolism interplay. *Molecular nutrition & food research* 2017; 61:
20. Araujo JR, Goncalves P, Martel F. Modulation of glucose uptake in a human choriocarcinoma cell line (BeWo) by dietary bioactive compounds and drugs of abuse. *J Biochem* 2008; 144: 177-186

21. Liu M, Yin H, Liu G, Dong J, Qian Z, Miao J. Xanthohumol, a prenylated chalcone from beer hops, acts as an alpha-glucosidase inhibitor in vitro. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 5548-5554
22. Kim JH, Ryu YB, Kang NS, Lee BW, Heo JS, Jeong IY, Park KH. Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 302-305
23. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* 2016; 118: 535-546
24. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Rosenson RS. Beginning to understand high-density lipoproteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43: 913-947
25. Casaschi A, Maiyoh GK, Rubio BK, Li RW, Adeli K, Theriault AG. The chalcone xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *J Nutr* 2004; 134: 1340-1346
26. Kamisaka Y, Goto R, Shibakami M, Yoshioka K, Sato Y. Surface plasmon resonance analysis of interactions between diacylglycerol acyltransferase and its interacting molecules. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75: 1135-1139
27. Hirata H, Takazumi K, Segawa S, Okada Y, Kobayashi N, Shigyo T, Chiba H. Xanthohumol, a prenylated chalcone from *Humulus lupulus* L., inhibits cholesteryl ester transfer protein. *Food Chem* 2012; 134: 1432-1437
28. Hirata H, Yimin, Segawa S, Ozaki M, Kobayashi N, Shigyo T, Chiba H. Xanthohumol prevents atherosclerosis by reducing arterial cholesterol content via CETP and apolipoprotein E in CETP-transgenic mice. *PLoS One* 2012; 7: e49415
29. Doddapattar P, Radovic B, Patankar JV, Obrowsky S, Jandl K, Nussold C, Kolb D, Vujic N, Doshi L, Chandak PG, Goeritzer M, Ahammer H, Hoefler G, Sattler W, Kratky D. Xanthohumol ameliorates atherosclerotic plaque formation, hypercholesterolemia, and hepatic steatosis in ApoE-deficient mice. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 1718-1728
30. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 1-15
31. Schempp H, Vogel S, Huckelhoven R, Heilmann J. Re-evaluation of superoxide scavenging capacity of xanthohumol. *Free Radic Res* 2010; 44: 1435-1444

32. Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3876-3884
33. Oberbauer E, Urmann C, Steffenhagen C, Bieler L, Brunner D, Furtner T, Humpel C, Baumer B, Bandtlow C, Couillard-Despres S, Rivera FJ, Riepl H, Aigner L. Chroman-like cyclic prenylflavonoids promote neuronal differentiation and neurite outgrowth and are neuroprotective. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1953-1962
34. Yilmazer M, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 223-231
35. Yilmazer M, Stevens JF, Buhler DR. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett* 2001; 491: 252-256
36. Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 2004; 65: 1317-1330
37. Nookandeh A, Frank N, Steiner F, Ellinger R, Schneider B, Gerhäuser C, Becker H. Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry* 2004; 65: 561-570
38. Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Grubjesic S, Schwab P, Metz P, Van Breemen RB. Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition* 2004; 32: 272-279
39. Yilmazer M, Stevens J, Buhler D. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS letters* 2001; 491: 252-256
40. Jirásko R, Holčápek M, Vrublová E, Ulrichová J, Šimánek V. Identification of new phase II metabolites of xanthohumol in rat in vivo biotransformation of hop extracts using high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217: 4100-4108
41. Ruefer CE, Gerhäuser C, Frank N, Becker H, Kulling SE. In vitro phase II metabolism of xanthohumol by human UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Molecular nutrition & food research* 2005; 49: 851-856



42. Guo J, Nikolic D, Chadwick LR, Pauli GF, Van Breemen RB. Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.). *Drug metabolism and Disposition* 2006; 34: 1152-1159
43. Bolca S, Possemiers S, Maervoet V, Huybrechts I, Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M, De Henauw S. Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: a dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal Caucasian women. *British Journal of Nutrition* 2007; 98: 950-959
44. Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Pauli GF, Van Breemen RB. Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *Journal of mass spectrometry* 2005; 40: 289-299
45. Possemiers S, Heyerick A, Robbens V, De Keukeleire D, Verstraete W. Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 6281-6288
46. Legette L, Ma L, Reed RL, Miranda CL, Christensen JM, Rodriguez-Proteau R, Stevens JF. Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration. *Molecular nutrition & food research* 2012; 56: 466-474
47. Legette L, Karnpracha C, Reed RL, Choi J, Bobe G, Christensen JM, Rodriguez-Proteau R, Purnell JQ, Stevens JF. Human pharmacokinetics of xanthohumol, an antihyperglycemic flavonoid from hops. *Molecular nutrition & food research* 2014; 58: 248-255
48. van Breemen RB, Yuan Y, Banuvar S, Shulman LP, Qiu X, Alvarenga RFR, Chen SN, Dietz BM, Bolton JL, Pauli GF. Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops. *Molecular nutrition & food research* 2014; 58: 1962-1969
49. Arczewska M, Kamiński DM, Górecka E, Pocięcha D, Rój E, Sławińska-Brych A, Gagoś M. The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2013; 1828: 213-222

50. Wesolowska O, Gąsiorowska J, Petrus J, Czarnik-Matusewicz B, Michalak K. Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2014; 1838: 173-184
51. Lesmana LA, Lesmana C, Pakasi LS, Krisnuhoni E. Prevalence of hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients and its association with disease severity. *Acta Med Indones* 2012; 44: 35-39
52. Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000; 279: G7-G11
53. Dorn C, Kraus B, Motyl M, Weiss TS, Gehrig M, Schölmerich J, Heilmann J, Hellerbrand C. Xanthohumol, a chalcon derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Molecular nutrition & food research* 2010; 54:
54. Dietz BM, Hagos GK, Eskra JN, Wijewickrama GT, Anderson JR, Nikolic D, Guo J, Wright B, Chen SN, Pauli GF. Differential regulation of detoxification enzymes in hepatic and mammary tissue by hops (*Humulus lupulus*) in vitro and in vivo. *Molecular nutrition & food research* 2013; 57: 1055-1066
55. Dorn C, Heilmann J, Hellerbrand C. Protective effect of xanthohumol on toxin-induced liver inflammation and fibrosis. *International journal of clinical and experimental pathology* 2012; 5: 29
56. Pinto C, Duque AL, Rodríguez-Galdón B, Cestero JJ, Macías P. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food and chemical toxicology* 2012; 50: 3405-3412
57. Pinto C, Cestero JJ, Rodríguez-Galdón B, Macías P. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.), protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. *Toxicology reports* 2014; 1: 726-733
58. Gardam MA. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emerging community pathogen? A review of the literature. *Can J Infect Dis* 2000; 11: 202-211
59. Lepape A, Monnet D. on behalf of participating members of the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Experience of European intensive care physicians with infections due to antibiotic-resistant bacteria, 2009. *Euro Surveill* 2009; 14: 45

60. Yamaguchi N, Satoh-Yamaguchi K, Ono M. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine* 2009; 16: 369-376
61. Mizobuchi S, Sato Y. A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agricultural and biological chemistry* 1984; 48: 2771-2775
62. Bhattacharya S, Virani S, Zavro M, Haas GJ. Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Economic Botany* 2003; 57: 118-125
63. Rozalski M, Micota B, Sadowska B, Stochmal A, Jedrejek D, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska B. Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: new pharmacological properties. *BioMed research international* 2013; 2013:
64. Serkani JE, Isfahani BN, Safaei HG, Kermanshahi RK, Asghari G. Evaluation of the effect of *Humulus lupulus* alcoholic extract on rifampin-sensitive and resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Research in pharmaceutical sciences* 2012; 7: 235
65. Vanden Berghe D, Vhetinck A, Van Hoof L. Plant products as potential antiviral agents. *Bulletin de l'Institut Pasteur (France)* 1986, DOI:
66. Zhang N, Liu Z, Han Q, Chen J, Lv Y. Xanthohumol enhances antiviral effect of interferon  $\alpha$ -2b against bovine viral diarrhea virus, a surrogate of hepatitis C virus. *Phytomedicine* 2010; 17: 310-316
67. Zhang N, Liu Z, Han Q, Chen J, Lou S, Qiu J, Zhang G. Inhibition of bovine viral diarrhea virus in vitro by xanthohumol: Comparisons with ribavirin and interferon- $\alpha$  and implications for the development of anti-hepatitis C virus agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 38: 332-340
68. Lou S, Zheng Y-M, Liu S-L, Qiu J, Han Q, Li N, Zhu Q, Zhang P, Yang C, Liu Z. Inhibition of hepatitis C virus replication in vitro by xanthohumol, a natural product present in hops. *Planta medica* 2014; 80: 171-176
69. Wang Q, Ding Z-H, Liu J-K, Zheng Y-T. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antiviral research* 2004; 64: 189-194
70. Buckwold VE, Wilson RJ, Nalca A, Beer BB, Voss TG, Turpin JA, Buckheit III RW, Wei J, Wenzel-Mathers M, Walton EM. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antiviral research* 2004; 61: 57-62

71. Aghamiri V, Mirghafourvand M, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Nazemiyeh H. The effect of Hop (*Humulus lupulus* L.) on early menopausal symptoms and hot flashes: A randomized placebo-controlled trial. *Complementary therapies in clinical practice* 2016; 23: 130-135
72. Fritz M, Speroff L. Postmenopausal hormone therapy. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* 2011, DOI: 749-857
73. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis—the second decade. *Endocrinology* 1998; 139: 2659-2661
74. Investigators WGftWshI. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 2002; 288: 321-333
75. Krause E, Yuan Y, Hajirahimkhan A, Dong H, Dietz BM, Nikolic D, Pauli GF, Bolton JL, Breemen RB. Biological and chemical standardization of a hop (*Humulus lupulus*) botanical dietary supplement. *Biomedical Chromatography* 2014; 28: 729-734
76. Milligan S, Kalita J, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84: 2249-2249
77. Schaefer O, Hümpel M, Fritzeimer K-H, Bohlmann R, Schleuning W-D. 8-Prenyl naringenin is a potent ER $\alpha$  selective phytoestrogen present in hops and beer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2003; 84: 359-360
78. Simons R, Gruppen H, Bovee TF, Verbruggen MA, Vincken J-P. Prenylated isoflavonoids from plants as selective estrogen receptor modulators (phytoSERMs). *Food & function* 2012; 3: 810-827
79. Overk CR, Yao P, Chadwick LR, Nikolic D, Sun Y, Cuendet MA, Deng Y, Hedayat A, Pauli GF, Farnsworth NR. Comparison of the in vitro estrogenic activities of compounds from hops (*Humulus lupulus*) and red clover (*Trifolium pratense*). *Journal of agricultural and food chemistry* 2005; 53: 6246-6253
80. Börjesson A, Lagerquist M, Windahl S, Ohlsson C. The role of estrogen receptor  $\alpha$  in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cellular and molecular life sciences* 2013; 70: 4023-4037

81. Hoffmann DB, Griesel MH, Brockhusen B, Tezval M, Komrakova M, Menger B, Wassmann M, Stuermer KM, Sehmisch S. Effects of 8-prenylnaringenin and whole-body vibration therapy on a rat model of osteopenia. *Journal of nutrition and metabolism* 2016; 2016:
82. Zhang Y, Li X-L, Yao X-S, Wong M-S. Osteogenic activities of genistein derivatives were influenced by the presence of prenyl group at ring A. *Archives of pharmacal research* 2008; 31: 1534-1539
83. Ming LG, Chen KM, Xian CJ. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *Journal of cellular physiology* 2013; 228: 513-521
84. Ming L-G, Lv X, Ma X-N, Ge B-F, Zhen P, Song P, Zhou J, Ma H-P, Xian CJ, Chen K-M. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro. *Endocrinology* 2013; 154: 1202-1214
85. Ming L, Ge B, Wang M, Chen K. Comparison between 8-prenylnarigenin and narigenin concerning their activities on promotion of rat bone marrow stromal cells' osteogenic differentiation in vitro. *Cell proliferation* 2012; 45: 508-515
86. Luo D, Kang L, Ma Y, Chen H, Kuang H, Huang Q, He M, Peng W. Effects and mechanisms of 8-prenylnaringenin on osteoblast MC3T3-E1 and osteoclast-like cells RAW264. 7. *Food science & nutrition* 2014; 2: 341-350
87. Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggi A, Schleuning W-D. Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2005; 97: 299-305
88. Keiler AM, Zierau O, Kretschmar G. Hop extracts and hop substances in treatment of menopausal complaints. *Planta medica* 2013; 79: 576-579
89. Bowe J, Li XF, Kinsey-Jones J, Heyerick A, Brain S, Milligan S, O'Byrne K. The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flashes. *Journal of endocrinology* 2006; 191: 399-405
90. Erkkola R, Vervarcke S, Vansteelandt S, Rompotti P, De Keukeleire D, Heyerick A. A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a

- standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Phytomedicine* 2010; 17: 389-396
91. Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, Bracke M, De Keukeleire D. A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Maturitas* 2006; 54: 164-175
  92. Rosic S, Kendic S, Rosic M. Phytoestrogens impact on menopausal symptomatology. *Materia socio-medica* 2013; 25: 98
  93. Morali G, Polatti F, Metelitsa EN, Mascarucci P, Magnani P, Marrè GB. Open, non-controlled clinical studies to assess the efficacy and safety of a medical device in form of gel topically and intravaginally used in postmenopausal women with genital atrophy. *Arzneimittelforschung* 2006; 56: 230-238
  94. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1941-1954
  95. Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett* 2007; 246: 201-209
  96. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; 25: 2097-2116
  97. Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 959-969
  98. Delmulle L, Bellahcene A, Dhooge W, Comhaire F, Roelens F, Huvaere K, Heyerick A, Castronovo V, De Keukeleire D. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine* 2006; 13: 732-734
  99. Festa M, Capasso A, D'Acunto CW, Masullo M, Rossi AG, Pizza C, Piacente S. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. *J Nat Prod* 2011; 74: 2505-2513

100. Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 271-285
101. Klosek M, Mertas A, Krol W, Jaworska D, Szymaszal J, Szliszka E. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells after Treatment with Xanthohumol-A Natural Compound Present in *Humulus lupulus* L. *Int J Mol Sci* 2016; 17:
102. Lust S, Vanhoecke B, Janssens A, Philippe J, Bracke M, Offner F. Xanthohumol kills B-chronic lymphocytic leukemia cells by an apoptotic mechanism. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 844-850
103. Lee SH, Kim HJ, Lee JS, Lee IS, Kang BY. Inhibition of topoisomerase I activity and efflux drug transporters' expression by xanthohumol. from hops. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1435-1439
104. Yong WK, Ho YF, Malek SN. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacogn Mag* 2015; 11: S275-283
105. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ahn KS, Anand P, Krishnan S, Guha S, Aggarwal BB. Modification of the cysteine residues in I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF- $\kappa$ B-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. *Blood* 2009; 113: 2003-2013
106. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* 2010; 294: 139-146
107. Negrao R, Costa R, Duarte D, Taveira Gomes T, Mendanha M, Moura L, Vasques L, Azevedo I, Soares R. Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. *J Cell Biochem* 2010; 111: 1270-1279
108. Tronina T, Bartmanska A, Filip-Psurska B, Wietrzyk J, Poplonski J, Huszcza E. Fungal metabolites of xanthohumol with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines in vitro. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 2001-2006
109. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5262-5270

110. Serwe A, Rudolph K, Anke T, Erkel G. Inhibition of TGF-beta signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol. *Invest New Drugs* 2012; 30: 898-915
111. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* 2010; 13: 567-576
112. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 961-967
113. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 2008; 8: 325-332
114. Sasazawa Y, Kanagaki S, Tashiro E, Nogawa T, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Imoto M. Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. *ACS Chem Biol* 2012; 7: 892-900
115. Jongthawin J, Techasen A, Loilome W, Yongvanit P, Namwat N. Anti-inflammatory agents suppress the prostaglandin E2 production and migration ability of cholangiocarcinoma cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 Suppl: 47-51
116. Viola K, Kopf S, Rarova L, Jarukamjorn K, Kretschy N, Teichmann M, Vonach C, Atanasov AG, Giessrigl B, Huttary N, Raab I, Krieger S, Strnad M, de Martin R, Saiko P, Szekeres T, Knasmuller S, Dirsch VM, Jager W, Grusch M, Dolznig H, Mikulits W, Krupitza G. Xanthohumol attenuates tumour cell-mediated breaching of the lymphendothelial barrier and prevents intravasation and metastasis. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1301-1312
117. Behre KH. The history of beer additives in Europe - a review. *Veget Hist Archaeobot* 1999; 8: 35-48
118. Zanolli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 383-396
119. Zanolli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia G, Avallone R, Baraldi M. Evidence that the beta-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 87-92



120. Zanolì P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Baraldi M. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2005; 102: 102-106
121. Bravo L, Cabo J, Fraile A, Jimenez J, Villar A. [Pharmacodynamic study of the lupulus' (*Humulus lupulus* L.) tranquilizing action]. *Boll Chim Farm* 1974; 113: 310-315
122. Wohlfart R, Hansel R, Schmidt H. [The sedative-hypnotic action of hops. 4. Pharmacology of the hop substance 2-methyl-3-buten-2-ol]. *Planta Med* 1983; 48: 120-123
123. Hansel R, Wohlfart R, Coper H. [Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops, II]. *Z Naturforsch C* 1980; 35: 1096-1097
124. Morin CM, Koetter U, Bastien C, Ware JC, Wooten V. Valerian-hops combination and diphenhydramine for treating insomnia: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Sleep* 2005; 28: 1465-1471
125. Meissner O, Haberlein H. Influence of xanthohumol on the binding behavior of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. *Planta Med* 2006; 72: 656-658
126. Franco L, Bravo R, Galan C, Rodriguez AB, Barriga C, Cubero J. Effect of non-alcoholic beer on Subjective Sleep Quality in a university stressed population. *Acta Physiol Hung* 2014; 101: 353-361
127. Ceremuga TE, Johnson LA, Adams-Henderson JM, McCall S, Johnson D. Investigation of the anxiolytic effects of xanthohumol, a component of *Humulus lupulus* (Hops), in the male Sprague-Dawley rat. *AANA J* 2013; 81: 193-198
128. Abourashed EA, Koetter U, Brattstrom A. In vitro binding experiments with a Valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine* 2004; 11: 633-638
129. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 2011; 10: 819-828
130. Jung HA, Yokozawa T, Kim BW, Jung JH, Choi JS. Selective inhibition of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* against BACE1 and cholinesterases. *Am J Chin Med* 2010; 38: 415-429

131. Zamzow DR, Elias V, Legette LL, Choi J, Stevens JF, Magnusson KR. Xanthohumol improved cognitive flexibility in young mice. *Behav Brain Res* 2014; 275: 1-10
132. Yen TL, Hsu CK, Lu WJ, Hsieh CY, Hsiao G, Chou DS, Wu GJ, Sheu JR. Neuroprotective effects of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), in ischemic stroke of rats. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 1937-1944
133. Lim JS, Yoo M, Kwon HJ, Kim H, Kwon YK. Wogonin induces differentiation and neurite outgrowth of neural precursor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 402: 42-47
134. Liu RT, Zou LB, Fu JY, Lu QJ. Promotion of rat brain-derived progenitor cell neurogenesis by liquiritigenin treatment: underlying mechanisms. *Neuroscience letters* 2010; 481: 139-143
135. Nakajima K-i, Niisato N, Marunaka Y. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-cotransporter. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2011; 28: 147-156
136. Urmann C, Oberbauer E, Couillard-Despres S, Aigner L, Riepl H. Neurodifferentiating potential of 8-prenylnaringenin and related compounds in neural precursor cells and correlation with estrogen-like activity. *Planta Med* 2015; 81: 305-311
137. Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, Rodriguez R. A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Analytical Biochemistry* 2000; 282: 158-161
138. Karl C. Die Rolle des Doublecortin-Gens in neuronalen Vorläuferzellen während Migration und Neurogenese. 2005:
139. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386: 493-495
140. Wang DY, Hu YZ, Kong SS, Yu YP, Zhu DY, Lou YJ. Promoting effects of isobavachin on neurogenesis of mouse embryonic stem cells were associated with protein prenylation. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 425-432
141. Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J* 2003; 17: 952-954

142. Uwabe K, Iwakawa T, Matsumoto M, Talkahashi K, Nagata K. HU0622: a small molecule promoting GAP-43 activation and neurotrophic effects. *Neuropharmacology* 2006; 51: 727-736
143. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 645-666
144. Aigner Z, Berkesi O, Farkas G, Szabo-Revesz P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012; 57: 62-67
145. Bertracche V, Lorenzi N, Nava D, Pini E, Sinico C. Host-Guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2006, DOI: 10.1007/s10847-006-9047-8: 279-287
146. Gu F, Wang Y, Meng G, Han H, Wu C. Investigation of a fenofibrate-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin system prepared by a co-grinding method. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 67: 143-146
147. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* 1996; 85: 1017-1025
148. Trapani G, Latrofa A, Franco M, Lopodota A, Sanna E, Liso G. Inclusion complexation of propofol with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. Physicochemical, nuclear magnetic resonance spectroscopic studies, and anesthetic properties in rat. [trapani@ippo.uniba.it](mailto:trapani@ippo.uniba.it). *J Pharm Sci* 1998; 87: 514-518
149. Zhang W, Gong X, Cai Y, Zhang C, Yu X, Fan J, Diao G. Investigation of water-soluble inclusion complex of hypericin with beta-cyclodextrin polymer. *Carbohydr Polym* 2013; 95: 366-370
150. Ziemons E, Dive G, Debrus B, Barillaro V, Frederich M, Lejeune R, Angenot L, Delattre L, Thunus L, Hubert P. Study of the physicochemical properties in aqueous medium and molecular modeling of tagitinin C/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; 43: 910-919
151. Higuchi T, Connors KA. Phase-Solubility Techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 1965; 4: 117-211
152. Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry* 2004; 39: 1033-1046

153. Ravelet C, Geze A, Villet A, Grosset C, Ravel A, Wouessidjewe D, Peyrin E. Chromatographic determination of the association constants between nimesulide and native and modified beta-cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 29: 425-430
154. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev* 1998; 98: 2045-2076
155. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *Journal of pharmaceutical Science* 1996; 86: 147-162
156. Seiller K, Szathmary S, Huss H, Coster De R, Junge W. Safety profile and intravenous tolerance of HP-b-CD after increasing single dose. Duchene, D (Ed) 1990, DOI: 511-518
157. Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 329: 1-11
158. Loftsson T, Konradsdottir F, Masson M. Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. *Pharmazie* 2006; 61: 83-89
159. Gazpio C, Sanchez M, Garcia-Zubiri IX, Velaz I, Martinez-Oharriz C, Martin C, Zornoza A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; 37: 487-492
160. Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999; 832: 97-107
161. Crini G. Studies on adsorption of dyes on beta-cyclodextrin polymer. *Bioresour Technol* 2003; 90: 193-198
162. George S, Vasudevan D. Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP-beta-Cyclodextrin-Mecizine HCl Inclusion Complexes. *Journal of young pharmacists : JYP* 2012; 4: 220-227
163. Prokai L, Ramanatham R, Nawrocki J, Eyler J. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry of Cyclodextrin Complexes of Amino Acids and Peptides *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 1996; 25: 117-120

164. Szente L, Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 36: 17-28
165. Garg A, Gupta B, Prakash R, Singh S. Preparation and characterization of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and (1)H-NMR. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2010; 58: 1313-1319
166. Hsu CM, Yu SC, Tsai FJ, Tsai Y. Enhancement of rhubarb extract solubility and bioactivity by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Carbohydr Polym* 2013; 98: 1422-1429
167. Melani F, Pasquini B, Caprini C, Gotti R, Orlandini S, Furlanetto S. Combination of capillary electrophoresis, molecular modeling and NMR to study the enantioselective complexation of sulpiride with double cyclodextrin systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015; 114: 265-271
168. Ali SM, Upadhyay SK. Complexation study of midazolam hydrochloride with  $\beta$ -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2008; 46: 676-679
169. Schneider HJ, Hacket F, Rudiger V, Ikeda H. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem Rev* 1998; 98: 1755-1786
170. Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate polymers* 2014; 101: 121-135
171. Liu B, Li W, Nguyen TA, Zhao J. Empirical, thermodynamic and quantum-chemical investigations of inclusion complexation between flavanones and (2-hydroxypropyl)-cyclodextrins. *Food chemistry* 2012; 134: 926-932
172. Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabro ML, Stancanelli R, Ficarra P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; 35: 379-387
173. Pralhad T, Rajendrakumar K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2004; 34: 333-339
174. George S, Vasudevan D. Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP-beta-Cyclodextrin-Meclizine HCl Inclusion Complexes. *Journal of young pharmacists* 2012; 4: 220-227

175. Marques HC, Hadgraft J, Kellaway I. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *International Journal of Pharmaceutics* 1990; 63: 259-266
176. Guimaraes AG, Oliveira MA, dos Santos Alves R, dos Passos Menezes P, Serafini MR, de Souza Araújo AA, Bezerra DP, Júnior LJQ. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-biological interactions* 2015; 227: 69-76
177. Rojas-Aguirre Y, Hernandez-Luis F, Mendoza-Martinez C, Sotomayor CP, Aguilar LF, Villena F, Castillo I, Hernandez DJ, Suwalsky M. Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818: 738-746
178. Kim H-M, Kim H-W, Jung S-H. Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2008; 29: 590-594
179. Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Advanced drug delivery reviews* 2013; 65: 1215-1233
180. Tiwari G, Tiwari R, Rai AK. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2010; 2: 72
181. Hirayama F, Uekama K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced drug delivery reviews* 1999; 36: 125-141
182. Grune T. Gehirn und Neurodegeneration. In, *Alterungsprozesse und Neurodegeneration*: Springer; 2014: 19-25
183. Röhl K. Moderne Aspekte in der Akuttherapie der traumatischen Querschnittlähmung. *Trauma und Berufskrankheit* 2002; 4: S25-S31
184. Schulz J, Deuschl G. Einfluss des Lebensstils auf neurodegenerative Erkrankungen. *Der Nervenarzt* 2015; 86: 954-959
185. Ming G-I, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 223-250

186. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2001; 21: 1628-1634
187. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 2003; 18: 2803-2812
188. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience* 1997; 17: 5820-5829
189. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences* 2004; 27: 447-452
190. Suárez-Pereira I, Canals S, Carrión AM. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. *Hippocampus* 2015; 25: 51-61
191. McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2016; 41: 3
192. Arruda-Carvalho M, Akers KG, Guskjolen A, Sakaguchi M, Josselyn SA, Frankland PW. Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. *Journal of Neuroscience* 2014; 34: 15793-15803
193. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* 1999; 2: 266
194. Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *The Neuroscientist* 2007; 13: 492-505
195. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013; 153: 1219-1227
196. Ernst A, Frisén J. Adult neurogenesis in humans-common and unique traits in mammals. *PLoS biology* 2015; 13: e1002045
197. Mazurek B, Olze H, Haupt H, Klapp B, Adli M, Gross J, Szczepek A. Molekularbiologische Aspekte der Neuroplastizität. *HNO* 2010; 58: 973-982

198. Göritz C, Frisé J. Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell stem cell* 2012; 10: 657-659
199. Sirko S, Behrendt G, Johansson PA, Tripathi P, Costa MR, Bek S, Heinrich C, Tiedt S, Colak D, Dichgans MJCsc. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. 2013; 12: 426-439
200. Karow M, Sánchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, Heinrich C, Gascón S, Khan MA, Lie DC, Dellavalle AJCsc. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. 2012; 11: 471-476
201. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 2003; 23: 9357-9366
202. Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 2005; 47: 803-815
203. Wang L-P, Kempermann G, Kettenmann H. A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2005; 29: 181-189
204. Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *Journal of Comparative Neurology* 1999; 413: 146-154
205. Couillard-Despres S, Winner B, Karl C, Lindemann G, Schmid P, Aigner R, Laemke J, Bogdahn U, Winkler J, Bischofberger J. Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *European Journal of Neuroscience* 2006; 24: 1535-1545
206. Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming G-I, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 2006; 439: 589
207. Bischofberger J, Schmidt-Hieber C. Adulte Neurogenese im Hippokampus. *e-Neuroforum* 2006; 12: 212-221
208. Mori A, Fujita A, Kajiro H, Nishihara Y, Hiyama T. Conjugate reduction of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones with hydrosilane mediated by copper (I) salt. *Tetrahedron* 1999; 55: 4573-4582



- 
209. Lee D-w, Yun J. Direct synthesis of Stryker's reagent from a Cu (II) salt. *Tetrahedron letters* 2005; 46: 2037-2039
210. Urmann C. Gewinnung von Prenylflavonoiden aus *Humulus lupulus* L. und ihr Effekt auf Differenzierung und Protektion neuronaler Zellkulturen. Technische Universität München; 2012:
211. Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N, Suksamrarn A. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 2006; 54: 301-305
212. Wätjen W, Weber N, Lou Y-j, Wang Z-q, Chovolou Y, Kampkötter A, Kahl R, Proksch P. Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells. *Food and chemical toxicology* 2007; 45: 119-124
213. Wollinsky B, Ludwig L, Hamacher A, Yu X, Kassack MU, Li S-M. Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2012; 22: 3866-3869
214. Suto MJ, Domagala JM, Roland GE, Mailloux GB, Cohen MA. Fluoroquinolones: relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity and antimicrobial activity. *Journal of medicinal chemistry* 1992; 35: 4745-4750
215. Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical reviews* 2017; 117: 7762-7810
216. Miranda CL, Johnson LA, Montgolfier O, Elias VD, Ullrich LS, Hay JJ, Paraiso IL, Choi J, Reed RL, Revel JS. Non-estrogenic Xanthohumol Derivatives Mitigate Insulin Resistance and Cognitive Impairment in High-Fat Diet-induced Obese Mice. *Scientific reports* 2018; 8: 613
217. Borges-Argaez R, Balnury L, Flowers A, Giménez-Turba A, Ruiz G, Waterman PG, Pena-Rodriguez LM. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. *Phytomedicine* 2007; 14: 530-533
218. Khadem S, Marles RJ. Chromone and flavonoid alkaloids: Occurrence and bioactivity. *Molecules* 2011; 17: 191-206
219. Liu T, Xu Z, He Q, Chen Y, Yang B, Hu Y. Nitrogen-containing flavonoids as CDK1/Cyclin B inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2007; 17: 278-281

220. Dugas AJ, Castañeda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products* 2000; 63: 327-331
221. Mira L, Tereza Fernandez M, Santos M, Rocha R, Helena Florêncio M, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research* 2002; 36: 1199-1208
222. Fornasier R, Parmagnani M, Tonellato U. Induced Circular Dichroism and UV Spectra of Inclusion Complexes of N-alkyl-dihyronicotinamides with Cyclomaltoheptose and Heptakis (2,6-di-O-methyl)cyclomaltoheptose. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 1991; 11: 225-231
223. Connors KA. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical reviews* 1997; 97: 1325-1358
224. López-Nicolás JM, Núñez-Delicado E, Pérez-López AJ, Barrachina AC, Cuadra-Crespo P. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for  $\beta$ -cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006; 1135: 158-165
225. Paolino D, Sinha P, Fresta M, Ferrari M. Drug delivery systems. *Encyclopedia of medical devices and instrumentation* 2006, DOI:
226. Moraes CM, Abrami P, de Paula E, Braga AF, Fraceto LF. Study of the interaction between S (-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *International journal of pharmaceutics* 2007; 331: 99-106
227. Jiang H, Sidhu R, Fujiwara H, De Meulder M, de Vries R, Gong Y, Kao M, Porter FD, Yanjanin NM, Carillo-Carasco N. Development and validation of sensitive LC-MS/MS assays for quantification of HP- $\beta$ -CD in human plasma and CSF. *Journal of lipid research* 2014; 55: 1537-1548
228. Tian Z, Meng K, Shi Y, Zhang N, Liu X, Jin H, Zhang Y, Zhang L, Zhou D, Xiao S. Facile preparation of a symmetric hexavalent oleanolic acid/per-O-methylated  $\alpha$ -cyclodextrin conjugate with two conformations in solution and unambiguous NMR analysis. *Tetrahedron* 2017; 73: 2512-2517
229. Jullian C, Miranda S, Zapata-Torres G, Mendizabal F, Olea-Azar C. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 3217-3224

- 
230. Spencer JP. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proceedings of the Nutrition Society* 2010; 69: 244-260
  231. Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & nutrition* 2008; 3: 115
  232. Youdim KA, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 30: 583-594
  233. Wallock-Richards DJ, Marles-Wright J, Clarke DJ, Maitra A, Dodds M, Hanley B, Campopiano DJ. Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. *Chemical communications* 2015; 51: 10483-10485
  234. Maher P. A comparison of the neurotrophic activities of the flavonoid fisetin and some of its derivatives. *Free Radical Research* 2006; 40: 1105-1111
  235. Ito H, Sun X-L, Watanabe M, Okamoto M, Hatano T. Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2008; 72: 885-888

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Flavan, das Grundgerüst der Flavonoide. ....	5
Abbildung 2: Struktur von Xanthohumol, 8-Prenylnaringenin und Kuraridin. ....	8
Abbildung 3: Metaboliten von Xanthohumol nach <i>Yilmazer et al.</i> [34]. ....	9
Abbildung 4: Metabolische Umwandlung von Xanthohumol (Xn) zu Iso-Xanthohumol (IX), Desmethyl-Xanthohumol (DMX), 8-Prenylnaringenin (8-PN) und 6-Prenylnaringenin (6-PN). Schema in Anlehnung an <i>Legette et al.</i> [46]. ....	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der drei Phasen der Krebsentstehung: Initiation, Promotion, Progression. ....	14
Abbildung 6: Derivate von Xanthohumol mit anti-proliferativer Wirkung. ....	16
Abbildung 7: Struktur der ENDFs (Enhancement of neuronal differentiation factors). ....	18
Abbildung 8: Vergleich der Struktur der differenzierungsaktiven Verbindungen Xanthohumol C, Iso- Xanthohumol C, 6-Prenylnaringenin C und 8-Prenylnaringenin C mit ihren offenkettigen Derivaten. ....	19
Abbildung 9: A- und B-Ring Beschriftung der Flavonoidstruktur am Beispiel von Xanthohumol C .....	21
Abbildung 10: Darstellung des Entropie- und Enthalpiegewinns durch den Einschluss am Beispiel von Falvonoiden in Cyclodextrine. ....	23
Abbildung 11: Beispielhaftes Phasendiagramm der Komplextypen A und B nach <i>Higuchi und Connors</i> <i>[151]</i> . ....	25
Abbildung 12: Löslichkeitsdiagramm von Xanthohumol C (XC) gegen verschieden konzentrierte Cyclodextrinlösungen (CD). Die Messungen wurden als Triplikat durchgeführt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. ....	28
Abbildung 13: Reduzierung der Retentionszeit von Xanthohumol C durch Erhöhung der Cyclodextrinkonzentration (0 – 50 mmol/L) in der Hochdruckflüssigchromatographie mit isokratischem Fluss bei 30°C. ....	29
Abbildung 14: Auftragung der inversen Kapazitätsfaktoren $k'$ gegen die eingesetzten Cyclodextrinkonzentrationen. ....	30
Abbildung 15: Vergleich der maximalen Löslichkeit von Xanthohumol C in Wasser und 50 mM HP- $\beta$ -Cyclodextrinlösung. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung und die Standardabweichung der Messung. ....	31

---

Abbildung 16: Dynamische Differenzkalorimetrie Thermogramm mit Xanthohumol C, 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin, physikalischem Gemisch und Einschlusskomplex .....	32
Abbildung 17: Position der freien Hydroxygruppen in Cyclodextrin. Bei HP- $\beta$ -Cyclodextrin ist $n = 7$ ... 33	33
Abbildung 18. Massenspektrum von 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin gemessen über den Infusion Modus in Wasser. ....	34
Abbildung 19. Massenspektrum von Xanthohumol C Einschlusskomplex gemessen über den Infusion Modus in Wasser. ....	35
Abbildung 20: Struktur von Xanthohumol C mit Beschriftung der für die NMR-Auswertung relevanten Protonen. ....	37
Abbildung 21: $^1\text{H}$ Spektrum von reinem Xanthohumol C in $\text{D}_2\text{O}$ mit 1 % NaOD.....	37
Abbildung 22: $^1\text{H}$ Spektrum des Xanthohumol C Einschlusskomplexes in $\text{D}_2\text{O}$ mit 1 % NaOD. ....	38
Abbildung 23: Ausschnitt des $^1\text{H}$ Spektrum des Xanthohumol C Einschlusskomplexes in $\text{D}_2\text{O}$ mit 1 % NaOD.....	38
Abbildung 24: Überlagertes $^1\text{H}$ Spektrum von Xanthohumol C (blau) und Einschlusskomplex Xanthohumol C in HP- $\beta$ -CD (rot). Der Ausschnitt zeigt nur die relevanten Peaks zwischen 5.1 und 7.5 ppm. ....	39
Abbildung 25: Mögliche Struktur des Xanthohumol C Einschlusskomplexes in HP- $\beta$ -CD.....	40
Abbildung 26: Differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol C und Xanthohumol C HP- $\beta$ -CD Komplex in 50 $\mu\text{M}$ in Dreifachbestimmung. Aufgetragen wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen. ....	43
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Neurogenese. Aus den neuralen Stammzellen bilden sich neuronale Vorläuferzellen. Deren Proliferationsrate ist im Vergleich zu den Stammzellen deutlich erhöht. Nach einigen Tagen entstehen Neuronen, die sich vollständig in vorhandene Zellstruktur integrieren. Abbildung nach [207]. ....	49
Abbildung 28: Schema zu den Veränderungen der Struktur-Aktivitäts-Untersuchung. Die rot-markierten Teile wurden variiert, während die grüne Struktur unverändert bleibt. Der Rest R steht beim A-Ring für die Elemente Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, während der Rest R beim B-Ring für die unterschiedlichen Substituenten (OMe, OEt, OPr, SMe, Cl, $\text{NH}_2$ , $\text{NO}_2$ , $\text{N}(\text{Me})_2$ , $\text{CH}_3$ , $\text{CF}_3$ ) steht. ....	50
Abbildung 29: Total-Hydrierung von Xanthohumol C mit Palladium und Wasserstoff. ....	52

---

Abbildung 30: Selektive Hydrierung der $\alpha,\beta$ -Doppelbindung mittels Katalysator nach Stryker und Diphenylsilan. ....	52
Abbildung 31: Schema der basischen Aldolkondensation eines A-Rings mit einem B-Ring zur Produksubstanz. ....	53
Abbildung 32: Syntheseweg zur Herstellung des A-Ring Derivats 1-(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)ethan-1-one aus 4-Hydroxyacetophenon. ....	54
Abbildung 33: Syntheseweg zur Herstellung des A-Ring Derivats 1-(2,2-dimethyl-1,2-dihydro-quinolin-6-yl)ethan-1-one aus 4-Aminoacetophenon. ....	54
Abbildung 34: Syntheseweg zur Herstellung des A-Ring Derivats 1-(2,2-dimethyl-2H-thiochromen-6-yl)ethan-1-one aus Thiophenol. ....	55
Abbildung 35: Differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol C-Derivaten, getestet in 10 $\mu\text{M}$ . ....	66
Abbildung 36: Normierte Renilla-Aktivität von Xanthohumol C-Derivaten. ....	67
Abbildung 37: Differenzierungsauslösende Aktivität von Xanthohumol-Derivaten, getestet in 10 $\mu\text{M}$ . ....	68
Abbildung 38: Normierte Renilla-Aktivität von Xanthohumol-Derivaten gemessen in 10 $\mu\text{M}$ Konzentration. ....	69
Abbildung 39: Differenzierungsinduzierende Aktivität von Xanthohumol C und Substanz 1 im Vergleich. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ . ....	70
Abbildung 40: Schema der Nummerierung des A-Rings am Beispiel des E-Chalkons. ....	71
Abbildung 41: Gleichgewicht zwischen Chalkon und Flavanon am Beispiel von Xanthohumol C. ....	71
Abbildung 42: Differenzierungsinduzierende Aktivität der A-Ring Modifikationen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ . ....	72
Abbildung 43: Normierte Renilla-Aktivität der A-Ring Derivate gemessen in 10 $\mu\text{M}$ Konzentration. ....	73
Abbildung 44: Differenzierungsinduzierende Aktivität der A-Ring Modifikationen mit verschiedenen Heteroatomen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ . ....	74
Abbildung 45: Normierte Renilla-Aktivität der A-Ring Derivate gemessen in 1 $\mu\text{M}$ und 10 $\mu\text{M}$ Konzentrationen. ....	75

---

Abbildung 46: Differenzierungsinduzierende Aktivität der B-Ring Modifikationen mit unterschiedlichen Kettenlängen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ .....	77
Abbildung 47: Normierte Renilla-Aktivität der B-Ring Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge gemessen in 1 $\mu\text{M}$ und 10 $\mu\text{M}$ Konzentrationen.....	78
Abbildung 48: Differenzierungsinduzierende Aktivität der B-Ring Modifikationen mit Stickstoff im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ . ....	79
Abbildung 49: Normierte Renilla-Aktivität der B-Ring Modifikation mit Stickstoff gemessen in 1 $\mu\text{M}$ und 10 $\mu\text{M}$ Konzentration. ....	80
Abbildung 50: Differenzierungsinduzierende Aktivität der B-Ring Modifikationen mit Heteroatomen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ . ....	81
Abbildung 51: Normierte Renilla-Aktivität der B-Ring Modifikation mit Heteroatome gemessen in 1 $\mu\text{M}$ und 10 $\mu\text{M}$ Konzentration. ....	82
Abbildung 52: Differenzierungsinduzierende Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen der Hydroxylgruppe im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ .....	83
Abbildung 53: Differenzierungsinduzierende Aktivität von Substanz 24 (1 $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu Xanthohumol C (10 $\mu\text{M}$ ). ....	84
Abbildung 54: Normierte Renilla-Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen der Hydroxylgruppe gemessen in 1 $\mu\text{M}$ und 10 $\mu\text{M}$ Konzentration. ....	85
Abbildung 55: Synthetisierte und getestete Derivate des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen von zwei Hydroxylgruppen. ....	86
Abbildung 56: Differenzierungsinduzierende Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen von zwei Hydroxylgruppen im Vergleich zu Xanthohumol C. Getestet wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{M}$ . ....	87
Abbildung 57: Normierte Renilla-Aktivität des B-Rings mit unterschiedlichen Positionen von zwei Hydroxylgruppen gemessen in 1 $\mu\text{M}$ und 10 $\mu\text{M}$ Konzentration. ....	88
Abbildung 58: Leitstruktur als Kombination aus allen Ergebnissen der Struktur-Aktivitäts-Untersuchung. ....	94

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Molekülpeaks aus den massenspektrometrischen Messungen von leeren Cyclodextrin und Xanthohumol-Einschlusskomplex. Die angegebenen Massen liegen als doppelt geladene Natriumaddukte von Cyclodextrin bzw. Einschlusskomplex vor. ....	36
Tabelle 2: Chemische Verschiebung der Protonen von Xanthohumol C in Reinform und im Einschlusskomplex mit HP- $\beta$ -CD.....	39
Tabelle 3: Vergleich der molaren Massen und der chemischen Verschiebung im $^1\text{H}$ -NMR der Protonen der $\alpha,\beta$ -Doppelbindung der synthetisierten Substanzen. ....	57
Tabelle 4: Rohdaten der Kalibriergerade für die Gehaltsbestimmung mittels HPLC. ....	132
Tabelle 5: Rohdaten der Löslichkeitsstudien aus der HPLC. Die Stoffmenge Cyclodextrin (n (XC)) stellt den Mittelwert der Dreifachbestimmung dar. Der Fehler ist die Standardabweichung der drei Messwerte. ....	133
Tabelle 6: Rohdaten aus der HPLC-Messung zur Bestimmung der Bildungskonstante.....	134



## 11 Lebenslauf

Name	Michael Kirchinger
Anschrift	Georg-Zeller-Straße 5, 94333 Geiselhöring
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
12.04.1988	geboren in Mallersdorf
September 1994 – Juli 1998	Grundschule Geiselhöring
September 1998 – Juni 2008	Burkhart Gymnasium Mallersdorf-Pfaffenberg, Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote 2,7)
Oktober 2008 – September 2011	Universität Regensburg, Bachelorstudiengang Chemie (Gesamtnote 2,7) Bachelorarbeit: Lumineszente ATP-Sonden (1,3)
Oktober 2011 – September 2013	Universität Regensburg, Masterstudiengang Chemie mit Hauptfach Bioanalytischer Chemie und Nebenfächern anorganische Chemie und Biochemie (Gesamtnote 1,8) Masterarbeit: Colloidal Photonic Crystals for Sensor Application (1,5)
November 2013 – Dezember 2018	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lehrstuhl für Organische und Analytische Chemie der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf am TUM Campus für Biotechnologie und Nachhaltigkeit. Promotion an der Technischen Universität München
Februar 2019 – dato	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Technologie- und Förderzentrum Straubing, Sachgebiet K

## Veröffentlichungen:

## Poster:

- B-Ring Modification of Flavonoids and their Effect on Neuronal Differentiation Inducing Activity
- Characterization of a Neurodifferentiation Inducing Flavonoid/Cyclodextrin Inclusion Complex

## Paper:

- Formulation in Cyclodextrin Enhances Water Solubility of the Neuroregenerative Chalcone Xanthohumol C from *Humulus Lupulus L.* (Planta Medica, in Revision)
- Lara Bieler, Michael Vogl, Michael Kirchinger, Corinna Urmann, Herbert Riepl, Christine E Bandtlow, Lars Klimaschewski, Ludwig Aigner, Sebastien Couillard-Despres, The prenylflavonoid ENDF1 overrules central nervous system growth inhibitors and facilitates regeneration of DRG neurons , *Frontiers in Cellular Neuroscience*