

Untersuchungen zu den wundheilungsfördernden  
Eigenschaften von *Calendula*-Extrakten sowie zu den  
entzündungshemmenden Eigenschaften von Matricin



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Christoph Nicolaus

aus Dresden

2016



Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. Stefan Weber
Referent:	Prof. Dr. Irmgard Merfort
Korreferent:	Prof. Dr. Andreas Bechthold
Drittprüfer:	Prof. Dr. Rolf Schubert
Datum der Promotion:	12.12.2016



Publikationen zur Arbeit

Christoph Nicolaus, Susanne Junghanns, Anja Hartmann, Renato Murillo, Markus Ganzera, Irmgard Merfort:

***In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts.**

in Revision

Christoph Nicolaus\*, Adrian Sievers-Engler\*, Renato Murillo, Michele D'Ambrosio, Michael Lämmerhofer, Irmgard Merfort:

**Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono- and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non-aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS.**

J. Pharm. Biomed. Anal.; 2016; 118: 195–205

\* Diese Autoren haben zu gleichen Anteilen zu dieser Arbeit beigetragen.

Posterbeiträge

Christoph Nicolaus, Susanne Junghanns, Anja Hartmann, Markus Ganzera,  
Irmgard Merfort:

***In vitro* studies to explain the wound healing properties of *Calendula officinalis* phytomedicines.**

Tag der Forschung 2016, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Albert-Ludwigs-  
Universität Freiburg

Christoph Nicolaus\*, Adrian Sievers-Engler\*, Renato Murillo, Michael  
Lämmerhofer, Irmgard Merfort:

**UHPLC-QTOF-MS as a valuable tool for the identification of novel faradiol fatty acid diesters of *Calendula officinalis* L. flowers.**

63. Internationaler Kongress und Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzen-  
und Naturstoff-Forschung (GA), 23. – 27. August 2015 in Budapest, Ungarn

\* Diese Autoren haben zu gleichen Anteilen zu dieser Arbeit beigetragen.

Christoph Nicolaus, Adrian Sievers-Engler, Renato Murillo, Michael Lämmerhofer,  
Irmgard Merfort:

**Novel faradiol fatty acid diesters of *Calendula officinalis* L. flowers.**

Tag der Forschung 2015, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Albert-Ludwigs-  
Universität Freiburg

Christoph Nicolaus, Susanne Junghanns, Renato Murillo, Irmgard Merfort:  
**Triterpene alcohols from *Calendula officinalis* L. flowers and *in vitro* studies on their wound healing activity.**

62. Internationaler Kongress und Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung (GA), 31. August – 4. September 2015 in Guimarães, Portugal

Adrian Sievers-Engler, Christoph Nicolaus, Irmgard Merfort, Michael Lämmerhofer:

**Determination of faradiol fatty acid diesters via UHPLC-QTOF-MS.**

ISC 2014, 30th International Symposium on Chromatography, 14. – 18. September in Salzburg, Österreich

Kurzvortrag

Christoph Nicolaus:

***Calendula officinalis* L. flowers in wound healing - Research for the active compounds.**

Doktorandenseminar, 30. März 2015.

**FÜR MEINE ELTERN UND GROBMÜTTER**

**PER ASPERA AD ASTRA. (Seneca)**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1	Untersuchungen zu den wundheilungsfördernden Eigenschaften von <i>Calendula</i> -Extrakten	1
1.2	Untersuchungen zu den entzündungshemmenden Eigenschaften von Matricin	3
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Die Arzneipflanze <i>Calendula officinalis</i> L.	4
2.1.1	<i>C. officinalis</i> L. - Vorkommen, Systematik, botanische Beschreibung	4
2.1.2	Inhaltsstoffe von <i>C. officinalis</i>	5
2.1.3	Anwendungen von <i>Calendula</i> -Zubereitungen	8
2.1.4	Wundheilungsfördernde Eigenschaften von <i>Calendula</i> -Zubereitungen	8
2.2	Der Prozess der Wundheilung	12
2.3	Einfluss der Carotinoide und Retinoide auf die Wundheilung	15
2.3.1	Biosynthese, Metabolismus, Transport und Speicherung der Carotinoide und Retinoide	15
2.3.2	Retinoide in der Wundheilung	20
2.3.3	Synthese und Abbau des Kollagens sowie Möglichkeiten zu deren Beeinflussung	21
2.3.4	Wirkung von Carotinoiden und Retinoiden auf die Kollagensynthese und -abbau	26
2.4	Matricin als potentieller Wirkstoff von Kamillenzubereitungen	28
2.4.1	<i>Matricaria recutita</i> L. – Vorkommen, Inhaltsstoffe, Wirkungen und Anwendungen	28
2.4.2	Antiinflammatorische Wirkung von Matricin und seinen Abbauprodukten	30

2.5	Zielsetzung	32
2.5.1	Wundheilungsfördernde Eigenschaften von <i>Calendula</i> -Extrakten	32
2.5.2	Entzündungshemmende Eigenschaften von Matricin	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Phytochemische Untersuchungen	34
3.1.1	Charakterisierung der <i>Calendula</i> -Extrakte	34
3.1.2	Faradiol 3,16-diester (1 – 4)	36
3.1.3	Dammarendiol II 3-myristat (5a) und -palmitat (5b)	44
3.1.4	Arnitriol A 3-myristat (6a) und -palmitat (6b)	51
3.1.5	Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-myristat (7a) und -palmitat (7b)	57
3.1.6	Maniladiol 3-myristat (8a) und -palmitat (8b)	64
3.1.7	Calenduladiol 3-myristat (9a) und -palmitat (9b)	71
3.1.8	Faradiol (10)	77
3.1.9	Faradiol 3-myristat (11a), -palmitat (11b), Arnidol 3-myristat (12a), -palmitat (12b)	82
3.1.10	$\beta$ -Amyrin (13), $\alpha$ -Amyrin (14), $\psi$ -Taraxasterol (15), Taraxasterol (16)	85
3.1.11	(U)HPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Analyse zur Trennung und Identifizierung der Triterpendiolmonoester und -diester	88
3.1.11.1	Trennung und Charakterisierung der Triterpenmonoester mittels UHPLC-APCI-QTOF-MS	88
3.1.11.2	Trennung und Charakterisierung der Faradiol 3,16-diester mittels HPLC-APCI-QTOF-MS	93
3.1.12	$\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat (17) und Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat) (18)	97
3.1.12.1	Identifizierung weiterer Sesquiterpenglycoside	106
3.2	Biologische Untersuchungen	107
3.2.1	<i>In vitro</i> Untersuchung verschiedener <i>Calendula</i> -Extrakte auf den Wundheilungsprozess	107
3.2.1.1	Einfluss der <i>Calendula</i> -Extrakte auf die Inflammationsphase	107

---

3.2.1.2	Einfluss der <i>Calendula</i> -Extrakten sowie einzelner Fraktionen und Einzelsubstanzen auf die Reepithelialisierung	113
3.2.1.3	Einfluss der <i>Calendula</i> -Extrakte auf den Kollagengehalt	115
3.2.1.4	Einfluss von <i>Calendula</i> -Extrakten auf die Zellviabilität	123
3.2.2	Untersuchungen zum Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Hemmung von Matricin	126
3.2.2.1	Untersuchungen zur NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität im EMSA	126
3.2.2.2	Untersuchungen von Matricin auf die mRNA-Expression von ICAM-1 in humanen immortalisierten Keratinocyten	131
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>132</b>
4.1	Untersuchungen zu den wundheilungsfördernden Eigenschaften von <i>Calendula</i> -Extrakten	132
4.1.1	Phytochemische Untersuchungen des <i>n</i> -Hexan-Extrakts	132
4.1.2	Beeinflussung von NF- $\kappa$ B in humanen immortalisierten Keratinocyten und humanen primären Fibroblasten durch die <i>Calendula</i> -Extrakte	138
4.1.3	Beeinflussung von IL-8 durch die <i>Calendula</i> -Extrakten HE und EE	139
4.1.4	Untersuchung des Einflusses von <i>Calendula</i> -Extrakten sowie Triterpenen auf die Reepithelialisierung	140
4.1.5	Beeinflussung des Kollagengehaltes durch <i>Calendula</i> -Extrakte, Carotinoide und Retinoide	141
4.1.6	Schlussfolgerung	146
4.2	Untersuchungen zu den entzündungshemmenden Eigenschaften von Matricin	147
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>150</b>
5.1	Material	150
5.1.1	Chemikalien und Reagenzien	150
5.1.2	Kits, Primer und Sonden	153
5.1.3	Verbrauchsmaterialien	153

---

5.1.4	Geräte	154
5.2	Phytochemische Untersuchungen	155
5.2.1	Spektroskopische Methoden	155
5.2.1.1	Massenspektrometrie (MS)	155
5.2.1.2	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	155
5.2.2	Chromatographische Methoden	156
5.2.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	156
5.2.2.2	Offene Säulenchromatographie (SC)	160
5.2.2.3	Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC)	160
5.2.2.4	GC-MS	160
5.3	Aufarbeitung des Blütenstands von <i>C. officinalis</i> L.	161
5.3.1	Herkunft der untersuchten Blüten von <i>C. officinalis</i> L.	161
5.3.2	Extraktion des Blütenstands	161
5.3.3	Fraktionierung des <i>n</i> -Hexan-Extrakts	162
5.3.4	Fraktionierung des Ethanol-Extrakts	168
5.4	Biologische Untersuchungsmethoden	168
5.4.1	Zellkultur	168
5.4.1.1	Verwendete Zelltypen und Zelllinien	169
5.4.1.2	Isolierung der Zellen	169
5.4.1.3	Kultivierung der verwendeten Zellen	170
5.4.1.4	Bestimmung der Zellzahl	171
5.4.1.5	Ausplattieren und Stimulation der Zellen	172
5.4.1.6	Kryokonservierung der Zellen	173
5.4.1.7	Auftauen der Zellen	173
5.4.1.8	Gewinnung der Gesamtextrakte	174
5.4.1.9	Gewinnung der Kernextrakte	175
5.4.1.10	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay	176
5.4.2	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	176
5.4.2.1	Radioaktive Markierung	177
5.4.2.2	Bindungsreaktion und Gelelektrophorese	177
5.4.2.3	Competition-Assay	178

---

5.4.3	Genexpressionsanalysen	179
5.4.3.1	Vorbereitung der Zellen und mRNA-Isolation	179
5.4.3.2	RNA-Gehaltsbestimmung	180
5.4.3.3	Transkription der mRNA in cDNA	180
5.4.3.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	181
5.4.3.5	qRT-PCR mit dem LightCycler 480	182
5.4.3.6	Quantifizierung	183
5.4.4	IL-8-ELISA	184
5.4.5	<i>in vitro</i> Kollagenbestimmung	185
5.4.6	<i>in vitro</i> Kollagenase-Inhibitions-Assay	187
5.4.7	Scratch Assay	188
5.4.8	MTT-Assay	189
5.4.9	Statistik	190
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>191</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>210</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>214</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>218</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>221</b>



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Untersuchungen zu den wundheilungsfördernden Eigenschaften von *Calendula*-Extrakten

Sowohl lipophile als auch hydrophile Extrakte aus Blüten von *Calendula officinalis* L. werden von der EMA zur Behandlung von leichten Entzündungen der Haut und Schleimhaut sowie von kleinen Wunden empfohlen. Trotz diverser *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sind der Wirkmechanismus und die für die Wundheilung verantwortlichen Wirkstoffe weiterhin ungeklärt.

Für die biologischen Untersuchungen wurden aus den Blüten 3 *Calendula*-Extrakte hergestellt: *n*-Hexan-Extrakt (HE), Ethanol-Extrakt (EE) und wässriger Extrakt (WE). Bei der phytochemischen Untersuchung von HE wurden mittels MPLC und offener SC Triterpene und deren Gemische sowie ein Gemisch von Sesquiterpenglycosiden isoliert und mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR- (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY, HSQC, HMBC), GC-MS-, HR-MS-, HPLC-DAD-ELS- und (U)HPLC-APCI-QTOF-MS-Analysen in der Struktur aufgeklärt. Es handelt sich hierbei um folgende Triterpenmono- und diester: Faradiol 3,16-diester (**1 – 4**), Dammarendiol II 3-myr/pal (**5a+b**), Arnitriol A 3-myr/pal (**6a+b**), Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-myr/pal (**7a+b**), Maniladiol 3-myr/pal (**8a+b**), Calenduladiol 3-myr/pal (**9a+b**), Faradiol- / Arndiol 3-myr/pal (**11a+b / 12a+b**) sowie Faradiol (**10**), ein Gemisch aus  $\beta$ -Amyrin (**13**),  $\alpha$ -Amyrin (**14**),  $\psi$ -Taraxasterol (**15**), Taraxasterol (**16**). Weiterhin wurden im Gemisch die Sesquiterpenglycoside  $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat (**17**) und Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat) (**18**) identifiziert. Die Verbindungen (**1 – 4**) sind neue Naturstoffe; die Verbindungen (**5a+b**), (**6a+b**) und (**7a+b**) sind erstmal aus *Calendula*-Blüten isoliert worden. Mit Hilfe einer vom Kooperationspartner bereitgestellten speziellen RP-C18-UHPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Methode gelang es, die Gemische der einzelnen Triterpenmonoester zu trennen und die intakten [M+H]<sup>+</sup>-Ionen nachzuweisen. Für die Trennung der

Faradiol 3,16-diester wurde in Kooperation eine RP-C30-HPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Methode entwickelt und über die Verwendung von synthetisierten Vergleichssubstanzen Faradiol 3,16-dimyristat (1), Faradiol 3-myristat,16-palmitat (2), Faradiol 3-palmitat,16-myristat (3) und Faradiol 3,16-dipalmitat (4) in der Struktur aufgeklärt.

In der Inflammationsphase der Wundheilung ist eine kurzfristige Entzündung essentiell für den Übergang in die Gewebeneubildungsphase. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt hierbei eine Schlüsselrolle bei der Regulierung zahlreicher inflammatorischer Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Sowohl HE als auch EE, nicht aber WE führten zu einer Steigerung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen immortalisierten Keratinocyten, nicht aber in humanen primären Fibroblasten. Außerdem führten HE und EE in humanen immortalisierten Keratinocyten auf mRNA- und Proteinebene zu einer Erhöhung von IL-8, einem proinflammatorischen Chemokin, dessen Transkription auch von NF- $\kappa$ B reguliert wird.

Die Gewebeneubildungsphase ist durch die Reepithelialisierung und die Bildung neuer Extrazellulärmatrix, insbesondere neuen Kollagens gekennzeichnet. Im Scratch Assay wiesen die 3 *Calendula*-Extrakte keine erhöhte Proliferation und Migration von humanen immortalisierten Keratinocyten auf. Verschiedene Triterpenalkohole und -ester aus *Calendula*-Blüten zeigten im Scratch Assay lediglich Tendenzen, die nicht ausreichend waren, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzustellen.

Eine gesteigerte Bildung von Kollagen kann durch eine gesteigerte Synthese in den Fibroblasten und / oder einen gehemmten Abbau durch Matrixmetalloproteinasen erreicht werden. *In vitro* zeigten EE eine moderate und WE eine schwache Inhibierung einer bakteriellen Kollagenase, die große Ähnlichkeit zu humanen MMPs aufweist. Zusätzlich führte EE im Sircol Collagen Assay zu einer Steigerung des löslichen Kollagens im Überstand von humanen primären Fibroblasten. HE,

Carotinoid-haltige Fraktionen sowie Carotinoid- und Retinoideinzelsubstanzen hatten in diesem Test keinen Effekt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sprechen dafür, dass Extrakte aus *Calendula*-Blüten sowohl die Inflammationsphase als auch die Bildung neuen Kollagens beeinflussen. Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Inhaltsstoffe für diese nachgewiesenen Effekte verantwortlich sind. Insbesondere Carotinoide und deren Abbauprodukte könnten an der wundheilenden Wirkung der *Calendula*-Blüten beteiligt sein.

## 1.2 Untersuchungen zu den entzündungshemmenden Eigenschaften von Matricin

Matricin, ein Sesquiterpenlacton vom Guaianolidtyp ohne  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketogruppe, wird seit langem als ein potentieller Wirkstoff bei der antiinflammatorischen Wirkung von Zubereitungen aus *Matricaria recutita* L. diskutiert. Neuere Ergebnisse belegen, dass Matricin die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade beeinflusst, ohne NF- $\kappa$ B direkt zu inhibieren.

Eine *in silico* Analyse identifizierte den IL-1-Rezeptor, der auch zu einer Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade führt, als mögliches molekulares Target von Matricin. Mit Hilfe des EMSAs und der Verwendung von humanen immortalisierten Keratinocyten sollte das vorhergesagte Target experimentell bestätigt werden.

Matricin war nicht in der Lage, die durch IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität zu reduzieren. Ebenfalls verhinderte Matricin nicht die durch TNF- $\alpha$  induzierte Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Allerdings führte Matricin zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der durch TNF- $\alpha$  induzierten mRNA-Expression von ICAM-1, die u.a. auch von NF- $\kappa$ B reguliert wird.

Die Untersuchungen dieser Dissertation konnten zeigen, dass der IL-1-Rezeptor nicht ein molekulares Target von Matricin darstellt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Arzneipflanze *Calendula officinalis* L.

#### 2.1.1 *C. officinalis* L. - Vorkommen, Systematik, botanische Beschreibung

Der Name der Gattung *Calendula* leitet sich vermutlich von dem lateinischen Wort „calendae“ ab, dem ersten Tag eines Monats, weil sich die Blüten in Abhängigkeit vom Sonnenstand öffnen und schließen und somit die kalendarische Sonnenbewegung widerspiegeln. Der deutsche Name „Ringelblume“ steht in Verbindung mit den ringförmig gebogenen Früchten. Vertreter der Gattung *Calendula* kommen ursprünglich vermutlich aus der Atlasregion, von wo aus sie sich in alle Himmelsrichtungen ausbreiteten. Insbesondere durch ihre Nutzung als Kultur- und Zuchtpflanze ist die Ringelblume heute in allen Teilen der Erde, von Europa und Mittelamerika bis Indien zu finden. *Calendula officinalis* L. zählt zur Familie der Asteraceae und zum Tribus Calenduleae. Die Ringelblume ist eine ein- bis zweijährige Pflanze und erreicht eine Wuchshöhe von etwa 50 cm. Der Stängel ist ca. ab der Mitte verzweigt und trägt am Ende jedes Zweigstängels ein 2 bis 5 cm großes Blütenköpfchen. Die breit-lanzettlichen Blätter sind etwa 10 bis 15 cm lang und 3 bis 4 cm breit sowie ganzrandig bzw. gezähnt, weich behaart und wechselständig. Die Blütenköpfchen (Abb. 1) bestehen aus einem schüsselförmigen Hüllkelch, der aus ca. 5 cm langen schmal-lanzettlichen Hüllblättern gebildet wird sowie den randständigen, weiblichen, fertilen orangenen oder gelben Zungenblüten und den zentralständigen, weiblichen, zwittrigen Röhrenblüten. Die ausschließlich von den Zungenblüten gebildeten Früchte besitzen eine auffällige Krümmung und können unterschiedlich gestaltet sein. Dementsprechend werden sie in Kahn-, Haken- oder Ringelfrüchte unterteilt. Die Ringelblume blüht zwischen Mai und Oktober (Isaac, 1992; Lichius et al., 2016).



**Abb. 1:** *Calendula officinalis* L. Links: orange blühende Varietät, rechts: gelb blühende Varietät. Fotos: Dr. Frank Merfort.

### 2.1.2 Inhaltsstoffe von *C. officinalis*

Die Blüten der Ringelblume enthalten Triterpenalkohole und deren Monoester (4 – 5 %), Carotinoide (bis zu 4,7 %), Triterpensaponine vom Oleanen-Typ (2 - 10 %), ca. 15 % Polysaccharide (Rhamnoarabinogalactane und Arabinogalactane), 0,3 - 0,8 % Flavonoide (hauptsächlich Derivate des Quercetins und Isorhamnetins) als Hauptinhaltsstoffe (Lichius et al., 2016). Des Weiteren sind Phytosterole, ein ätherisches Öl mit Mono- und Sesquiterpenen als Hauptkomponenten sowie Sesquiterpenglycoside als weitere Inhaltsstoffe von *Calendula*-Blüten beschrieben (Hänsel, Rudolf, Sticher, 2010). Von den pentazyklischen Triterpenalkoholen sind Monole, Diole und Triole des  $\Delta^{12}$ -Oleanen-, Ursen-, Lupen-,  $\psi$ -Taraxasten- und Taraxasten-Typs (siehe Abb. 2) nachgewiesen worden, wobei die Monole auch als Acetate und Diole und Triole hauptsächlich als 3-Lauroyl-, 3-Myristoyl- und 3-Palmitoyl-Monoester vorliegen. So sind von den Triterpenmonolen z.B. Taraxasterol und  $\psi$ -Taraxasterol (Kasprzyk and Pyrek, 1968), von den Diolen Faradiol und Arnidiol (Neukirch et al., 2004) und von den Triolen Heliantriol F und Heliantriol C (Wiłkomirski, 1985) isoliert worden. Faradiol in Form seiner 3-Monoester ist dabei der mengenmäßig dominierende Triterpenalkohol in *Calendula*-Blüten.

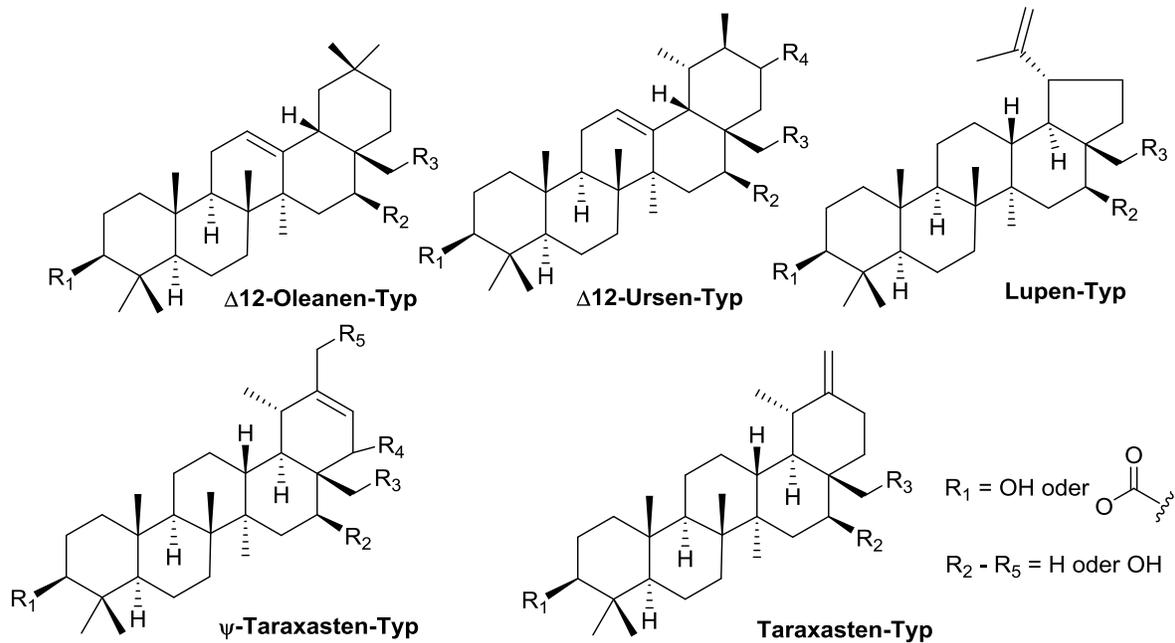
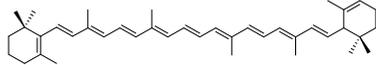
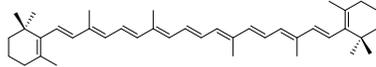
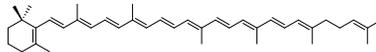
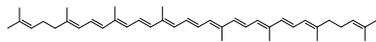
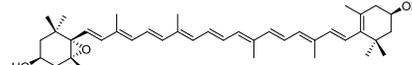
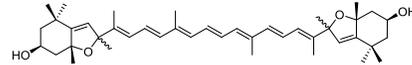
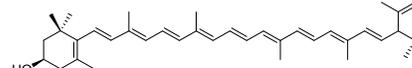
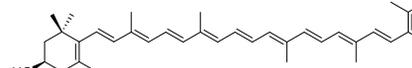
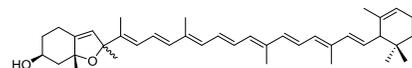
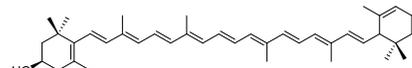
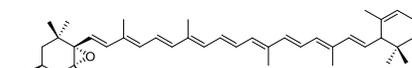
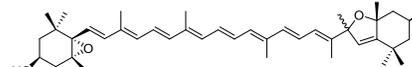
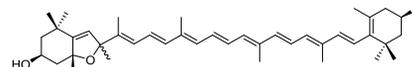
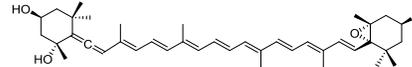
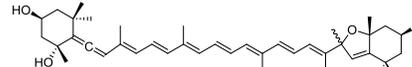
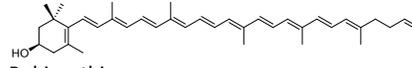
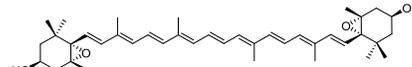
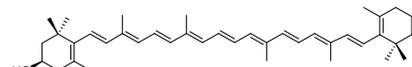
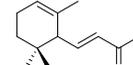
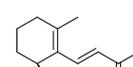
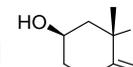


Abb. 2: Strukturen der bereits nachgewiesenen pentazyklischen Triterpenalkohole in *Calendula*-Blüten.

In den Blüten von *C. officinalis* sind sowohl Carotine, die keine Sauerstofffunktion tragen, als auch die Sauerstoff-haltigen Xanthophylle enthalten. Die gelb blühenden Varietäten enthalten hauptsächlich Xanthophylle, während die orange blühenden zusätzlich einen großen Anteil an Carotinen enthalten (Kishimoto et al., 2005). Außerdem konnten in den Blüten Verbindungen, welche Abbauprodukte von Carotinoiden darstellen, nachgewiesen werden. Hierzu zählen das Loliolid, die Ionone und Iononglycoside, die bereits aus *C. officinalis* isoliert wurden (Gracza, 1987; Marukami et al., 2001; Willuhn and Westhaus, 1987). Abb. 3 stellt eine Übersicht über die bereits aus *C. officinalis* isolierten Carotinoide und deren Abbauprodukten dar. Von Lycopin und Rubixanthin wurden neben all-*trans*-Formen auch 5-*cis*- und / oder 9-*cis*-Isomere isoliert (Kishimoto et al., 2005).

**Carotine****α-Carotin****β-Carotin****γ-Carotin****Lycopin****Xanthophylle****Antheraxanthin****Auroxanthin****α-Cryptoxanthin****β-Cryptoxanthin****Flavoxanthin (Chrysanthemaxanthin)****Lutein****Lutein-5,6-Epoxid****Luteoxanthin****Mutatoxanthin****Neoxanthin****Neochrom****Rubixanthin****Violaxanthin****Zeaxanthin****Abbauprodukte****α-Ionon****β-Ionon****Loliolid****Officinoid A****Officinoid B**

**Abb. 3: Strukturen von Carotinoiden und deren Abbauprodukte aus *Calendula*-Blüten** (nach (Bakó et al., 2002; Goodwin, 1954; Gracza, 1987; Kishimoto et al., 2007, 2005; Marukami et al., 2001; Milborrow et al., 1980; Pintea et al., 2003; Tóth and Szabolcs, 1981; Willuhn and Westhaus, 1987)).

### 2.1.3 Anwendungen von *Calendula*-Zubereitungen

Volksmedizinisch wurde die Ringelblume zur Behandlung von Kopfgrind und innerlich bei Verdauungsstörungen und Vergiftungen durch Speisen erstmals in den Schriften von Hildegard von Bingen im 12. Jh. erwähnt. Im folgenden Jh. wurden *Calendula*-Zubereitungen außerdem bei Leberleiden, Magenentzündungen, Gelbsucht, Uterusbeschwerden und bei Tumoren sowie als Diaphoretikum angewandt. Im 19. Jh. wurde *C. officinalis* in die französische Pharmakopöe aufgenommen. Allerdings fehlen aus heutiger Sicht für die meisten volksmedizinischen Anwendungen der Ringelblumen wissenschaftliche Belege (Isaac, 1992; Lichius et al., 2016). In den offiziellen Monografien werden Zubereitungen aus *Calendula*-Blüten zur traditionellen, symptomatischen Behandlung von kleinen Entzündungen der Haut und im Mund- und Rachenraum sowie von kleinen Wunden empfohlen (HMPC, 2008a). Die HMPC schreibt in ihrem Prüfbericht, dass die genannten Anwendungen von *Calendula*-Blüten durch pharmakologische Daten gestützt sind, dass allerdings kontrollierte klinische Studien, die *Calendula*-Blüten nach dem Ph.Eur. enthalten, (HMPC, 2008b), fehlen. Außerdem wurden in früheren Monografien noch Wunden mit einer schlechten Heilungstendenz sowie Ulcus cruris als weitere Indikationen genannt. Für die genannten Anwendungen werden neben der klassischen Teedroge zur Zubereitung eines Infus (1 - 2 g Droge pro 150 ml Wasser), wässrig-alkoholische Auszüge, eine Tinktur (DEV 1:5) sowie lipophile Auszüge mit fetten Ölen, z.B. Olivenöl empfohlen (HMPC, 2008a).

### 2.1.4 Wundheilungsfördernde Eigenschaften von *Calendula*-Zubereitungen

Neben *in vivo* und wenigen *in vitro* Untersuchungen gibt es einige klinische Studien zur wundheilungsfördernden und antiinflammatorischen Wirkung von *Calendula*-Blüten. Allerdings weisen die meisten dieser klinischen Studien hinsichtlich der heute geforderten wissenschaftlichen Standards (Anzahl der Probanden, Studiengestaltung und -durchführung, Statistik) einige Mängel auf (Basch et al.,

2006; Leach, 2008). In einem Übersichtsartikel von Leach genügten nur 6 aller zu dem Zeitpunkt vorhandenen klinischen Studien den heute gültigen wissenschaftlichen Standards, wobei die Studie von (Pommier et al., 2004) als die beste Studie hervor gehoben wurde (Leach, 2008). Zudem schlussfolgerte Leach, dass es gute Hinweise auf die wundheilungsfördernde Wirkung von Zubereitungen aus *Calendula*-Blüten gibt, aber dass weitere Untersuchungen und strengere klinische Studien für einen Beweis notwendig sind. In der bereits erwähnten randomisierten, Klinischen Phase III Studie von (Pommier et al., 2004) wurden 254 Brustkrebspatientinnen entweder mit einer aus einem lipophilen *Calendula*-Extrakt hergestellten Salbe oder Triethanolamin zur Prävention einer akuten Dermatitis während einer postoperativen Strahlentherapie behandelt. Dabei führte die Behandlung mit der *Calendula*-Salbe zu einer signifikant verringerten Ausbildung einer akuten Dermatitis Grad 2 oder höher im Vergleich zu Triethanolamin (41 % versus 63 %). In einer aktuelleren verblindeten, randomisierten Studie, die insgesamt 420 Brustkrebspatientinnen umfasste, konnte hingegen kein Unterschied zwischen der Behandlung mit einer *Calendula*-Creme und einer wässrigen Creme ohne Zusatzstoffe im Hinblick auf die Verhinderung einer akuten Dermatitis bei postoperativer Strahlentherapie festgestellt werden (Sharp et al., 2013). Kritisch zu sehen ist hier allerdings, dass keine Informationen über die Art des *Calendula*-Extrakts vorliegen, weshalb ein Vergleich zur Studie von Pommier et al. schwierig ist. In einer sehr aktuellen Studie wurden Patienten mit diabetischem Fußsyndrom mit einem hydroglycolischen Extrakt aus *Calendula*-Blüten behandelt. Von den insgesamt 84 Probanden beendeten lediglich nur 41 die Studie, von denen anteilig 78 % nach einer Behandlungsdauer von 30 Tagen einen vollständigen Wundschluss zeigten (Buzzi et al., 2016). Da eine Kontrolle in dieser Studie fehlt, kann kein Rückschluss gezogen werden, dass der verwendete *Calendula*-Extrakt die Wundheilung beschleunigte und anderen konventionellen Therapien überlegen war. Jedoch konnte anhand einer kleinen Gruppe von 38 Probanden gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem *Calendula*-Extrakt keine Nebenwirkungen aufwies.

Obwohl klinische Studien der Goldstandard zum Nachweis der Wirksamkeit von Phytotherapeutika darstellen, sind sie für viele Firmen aufgrund der fehlenden Patentierbarkeit pflanzlicher Zubereitungen und der hohen Kosten sehr unrentabel. Aus diesem Grund liefern *in vivo* und zellbasierte Untersuchungen erste Anhaltspunkte zur potentiellen Wirksamkeit von Phytopharmaka. So konnte der antiinflammatorische und antiödematöse Effekt eines lipophilen Extrakts und der darin enthaltenen Triterpenalkohole/-ester im durch Crotonöl induzierten Mausohrödem-Test nachgewiesen werden. Dabei war die Aktivität der freien Triterpendiole und -triole, insbesondere des Faradiols im Vergleich zu den 3-Monoestern am größten (Della Loggia et al., 1994; Neukirch et al., 2005; Zitterl-Eglseer et al., 1997). Die wundheilende Wirkung betreffend wurden einige *in vivo* Studien an Ratten durchgeführt. Im Zusammenhang mit dem Einfluss von *Calendula* auf die Reepithelialisierung wird häufig die Studie von (Kloucek-Popova et al., 1982) zitiert, die allerdings aus heutiger Sicht nicht mehr wissenschaftlichen Standards entspricht. In dieser Studie zeigte die Kombination bestehend aus einem wässrigen, einem wässrig-alkoholischen *Calendula*-Extrakt und Allantoin die besten wundheilungsfördernden Eigenschaften. Eine Angabe über die Herstellung der Extrakte fehlte. In der Studie von (Rao et al., 1991) führte die Behandlung von Ratten mit einer *Calendula*-Tinktur, die mit 60 %-igem Ethanol hergestellt wurde, im Vergleich zur Kontrolle zu einer beschleunigten Reepithelialisierung. In einer weiteren Studie wurde durch die topische Applikation eines ethanolischen Extrakts aus *Calendula*-Blüten ein schnellerer Wundschluss ab dem 8. Tag erreicht als bei der Kontrollgruppe (Preethi and Kuttan, 2009). In einer weiteren sehr aktuellen Studie wurde *Calendula*-Öl als eine lamellare Gelphasenemulsion (LPG) formuliert und führte im *in vivo* Wundmodell bei Ratten zu einer vollständigen Reepithelialisierung ab dem 14. Tag im Vergleich zur Behandlung mit dem Gel und der Kontrollgruppe. Zudem konnte für die die *Calendula*-Formulierung zu Beginn der Behandlung eine gesteigerte Anlockung von Leukocyten in das Wundbett, ab dem 14. und 21. Tag eine reduzierte Migration der Leukocyten sowie eine gesteigerte Bildung von neuen Blutgefäßen und Kollagen im Wundgewebe

beobachtet werden im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Okuma et al., 2015). Erhöhte Kollagen- und Hydroxyprolinkonzentrationen wurden in Wunden von Ratten nach äußerlicher Anwendung eines Gels, das einen ethanolischen Extrakt (70 %) enthielt, nachgewiesen (Naeini et al., 2012). Untermauert wurden diese Beobachtungen durch den Nachweis erhöhter Konzentrationen von Hydroxyprolin sowie nicht kollagenösen Proteinen in Wunden nach einer Transektion der Achillesferse bei Ratten, nachdem eine Salbe, die einen glycolischen Extrakt aus *Calendula*-Blüten enthielt, appliziert wurde (Aro et al., 2015). Außerdem konnte im Chorioallantoismembran-Modell (CAM) sowohl für einen wässrigen Extrakt (Patrick et al., 1996) als auch für einen Dichlormethan- und ethanolischen *Calendula*-Extrakt (Parente et al., 2012) eine gesteigerte Neovaskularisierung nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu *in vivo* Studien liefern zellbasierte Tests erste Hinweise auf das wundheilungsfördernde Potential von Pflanzenextrakten und Einzelsubstanzen. Auch wenn der Scratch Assay neben seiner Vorteile einige Limitierungen besitzt (Werner, 2016) konnte für einen *n*-Hexan- und Ethanol-Extrakt eine erhöhte Anzahl von NIH-3T3-Fibroblasten, die in den artifiziellen Wundspalt eingewandert waren, nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die in den Extrakten enthaltenen Triterpene zu diesem Effekt beitragen (Fronza et al., 2009). Ebenfalls mit Hilfe des Scratch Assays und der Verwendung von humanen dermalen Fibroblasten konnte ein erhöhter Wundschluss für einen ethanolischen Extrakt (41 %) sowie ein möglicher Einfluss auf die Phosphatidylinositol-3-Kinase gezeigt werden (Dinda et al., 2015). Außerdem konnte in einem weiteren Versuch für einen CO<sub>2</sub>-Extrakt in einer speziellen Formulierung als solide Lipidnanopartikel ein beschleunigter Schluss der artifiziellen Wunde im Scratch Assay, für den Bindehautepithelzellen verwendet wurden, im Vergleich zum nicht formulierten Extrakt nachgewiesen werden (Arana et al., 2015). Als Hauptkomponenten lipophiler *Calendula*-Extrakte wurden in der *in vitro* Studie von (Schneider et al., 1991) die Carotinoide näher betrachtet. Allerdings konnte für die getesteten Carotinoidfraktionen weder ein Effekt auf die Migration und Proliferation von

Fibroblasten, noch ein signifikanter Einfluss auf die Kontraktion von Kollagengelen beobachtet werden.

## 2.2 Der Prozess der Wundheilung

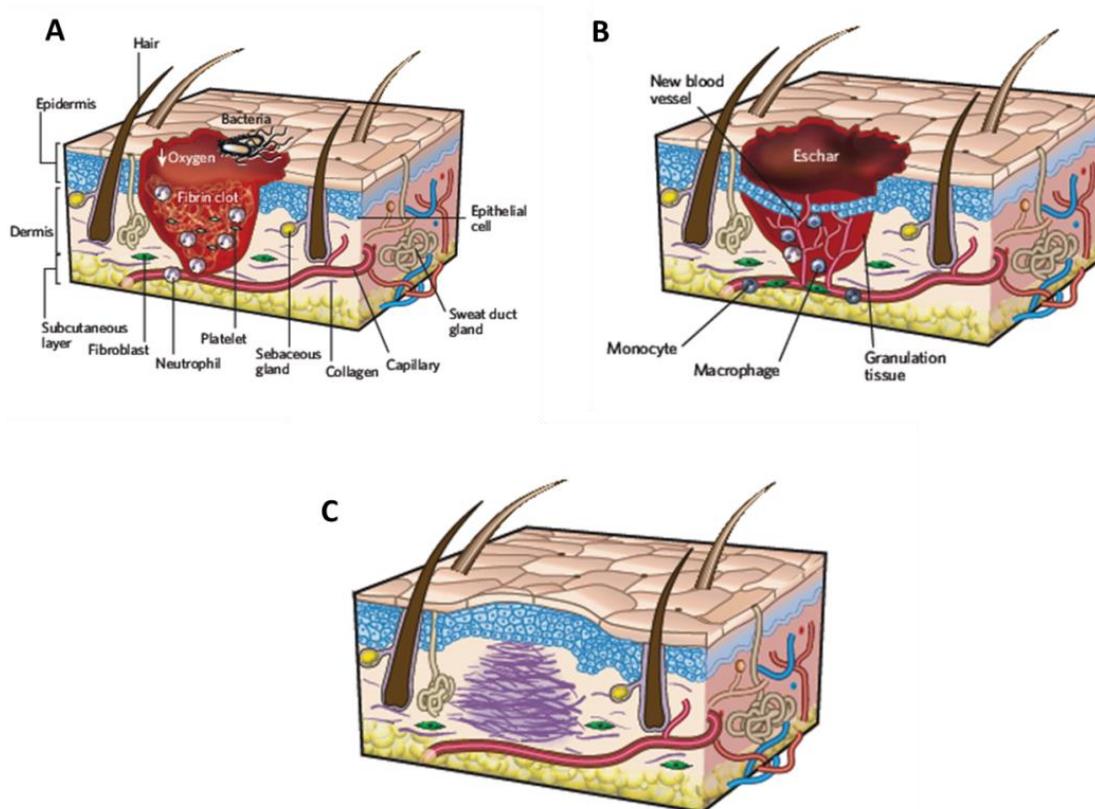
Die Haut stellt mit einer Fläche von etwa 2 m<sup>2</sup> das größte Organ des Menschen dar. Als Abgrenzung gegenüber der Umgebung dient sie dem Organismus als Schutz vor thermischen und mechanischen Einflüssen, Mikroorganismen, UV-Strahlung sowie Austrocknung. Des Weiteren stellt sie wegen zahlreicher Thermo-, Druck- und Tastrezeptoren ein wichtiges Sinnesorgan dar. Die Haut ist an der Regulierung der Körpertemperatur sowie bei der Resorption und Ausscheidung verschiedener Stoffe und Gase maßgeblich beteiligt. Die Haut lässt sich in die Epidermis, Dermis und Subkutis unterteilen. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinocyten, die in der einschichtigen Basalschicht (Stratum basale) durch ständige Zellteilung gebildet werden. Nach Außen schließt sich das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum an. Von innen nach außen werden in einem Zeitraum von ca. 30 Tagen die Keratinocyten durch zunehmende Differenzierung und Verhornung zu kernlosen und zytoplasmfreien Korneocyten umgewandelt, die am Ende abgeschilfert werden. Durch die ständige Neubildung der Keratinocyten im Stratum basale erneuert sich die Epidermis von selbst. Neben Keratinocyten sind Melanocyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen weitere wichtige, in der Epidermis vorkommende Zelltypen. Die Dermis ist durch die Extrazellulärmatrix (EZM), deren Hauptbestandteil Kollagen ist sowie das Vorhandensein von Blutgefäßen, Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikeln gekennzeichnet. Fibroblasten, die insbesondere für die Synthese und Sekretion der Bestandteile der EZM zuständig sind, kommen in der Dermis vereinzelt und nicht als Zellverbund vor (Burns et al., 2010; Moll et al., 2010).

Die kutane Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der in drei, sich überlappende Phasen unterteilt werden kann (siehe Abb. 4): I: Inflammation, II: Gewebeneubildung, III: Gewebeumbau (Gurtner et al., 2008). Unmittelbar nach der

Verwundung kommt es zur Thrombocytenaggregation und zur Auslösung der Gerinnungskaskade sowie der damit verbundenen Hämostase und dem provisorischen Wundverschluss. Der gebildete Fibrinpfropf stellt gleichzeitig die Matrix für die Migration sämtlicher am Wundheilungsprozess beteiligten Zellen dar. Ausgelöst durch die Bildung von Chemokinen wandern neutrophile Granulocyten in das Wundbett ein und sind maßgeblich an der Phagozytose von eingedrungenen Mikroorganismen sowie der Beseitigung von nekrotischem Gewebe beteiligt. Außerdem setzen sie proinflammatorische Mediatoren, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  frei. 2 bis 3 Tage nach der Verletzung kommt es zur Einwanderung von Monocyten, welche zu Makrophagen differenzieren. Die Makrophagen sind neben ihrer Beteiligung an der Beseitigung von Mikroorganismen hauptsächlich durch die Sekretion zahlreicher Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren für den Übergang in die Gewebeneubildungsphase verantwortlich (Gurtner et al., 2008; Kondo and Ishida, 2010; Reinke and Sorg, 2012).

Die Gewebeneubildungsphase setzt 2 bis 10 Tagen nach der Verwundung ein und ist durch die Reepithelialisierung, Bildung des Granulationsgewebes und der Angiogenese gekennzeichnet. Die Migration und Proliferation von Keratinocyten in das Wundbett stellen die Reepithelialisierung und den damit verbundenen Verschluss der Wunde dar. Außerdem migrieren Fibroblasten im Bereich der Dermis in das Wundbett und produzieren neben Kollagen auch Elastin, Fibrillin, Proteoglycane und Glycoproteine als Hauptbestandteile der EZM. Zudem differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche dann für die Kontraktion der Wunde sorgen. Gleichzeitig wird über verschiedene Wachstumsfaktoren, wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und die Wirkung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) für die Versorgung des neuen Gewebes mit Nährstoffen gesteuert (Greaves et al., 2013; Gurtner et al., 2008; Reinke and Sorg, 2012; Velnar et al., 2009).

Die Gewebeumbauphase dauert zwischen mehreren Monaten bis zu einem Jahr und ist durch Apoptose der in der Gewebeneubildungsphase beteiligten Zellen sowie der hauptsächlich durch MMPs vermittelten Umorientierung des Kollagens vom Typ III zum stärkeren, in parallelen Bündeln angeordneten Kollagen des Typs I gekennzeichnet (Gurtner et al., 2008; Reinke and Sorg, 2012).



**Abb. 4: Phasen der Wundheilung.** A: Inflammationsphase, B: Gewebeneubildungsphase, C: Gewebeumbauphase. Abbildungen mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. abgedruckt: Nature, Gurtner et al. 2008, © 2008, <http://www.nature.com/nature/index.html>.

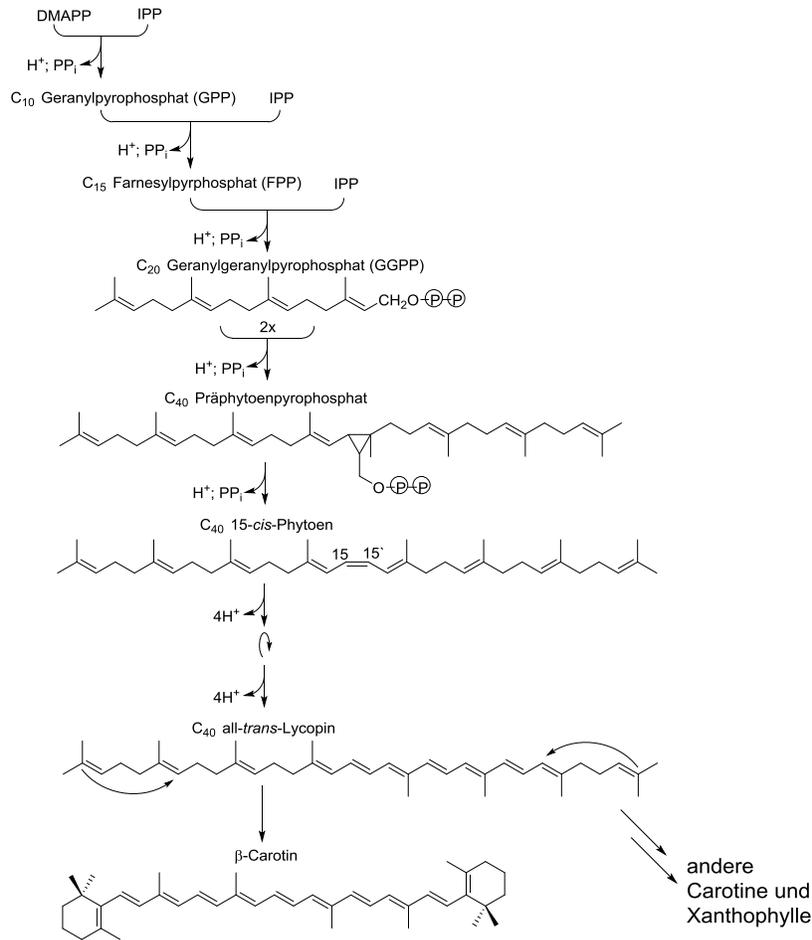
## 2.3 Einfluss der Carotinoide und Retinoide auf die Wundheilung

Da Carotinoide zu den Hauptinhaltsstoffen von *Calendula*-Blüten zählen, soll die existierende Literatur zu diesen Naturstoffe bzw. den davon abgeleiteten Retinoiden im Hinblick auf die Wundheilung gesondert in diesem Kapitel behandelt werden.

### 2.3.1 Biosynthese, Metabolismus, Transport und Speicherung der Carotinoide und Retinoide

Carotinoide sind Terpene mit 40 C-Atomen und werden von höheren Pflanzen und Algen gebildet. Biogenetisch leiten sie sich von zwei C<sub>5</sub>-Einheiten, Isoprenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat (IPP und DMAPP) ab (siehe Abb. 5). Mit einer β-Iononeinheit stellen sie die biogenetische Vorstufe von Vitamin A dar und werden deshalb auch als Provitamin A bezeichnet. Vitamin A ist für den Menschen ein essentielles, fettlösliches Vitamin, das über seine aktiven Metaboliten Retinal und Retinsäure neben dem Sehvorgang auch an der Zellproliferation und – differenzierung beteiligt ist. Vitamin A (= Retinol) war die Leitsubstanz für die Herstellung verschiedener Derivate. Die natürlichen C<sub>20</sub>-Derivate Retinol und all-*trans*-Retinsäure (Tretinoin) sowie synthetisch hergestellte Derivate werden als Retinoide bezeichnet. Letztere, wie Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure), Acitretin und Tazaroten, werden therapeutisch u.a. bei Akne vulgaris und Psoriasis angewandt (Aktories et al., 2009).

Da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist, Vitamin A zu synthetisieren muss es in Form von Carotinoiden (z.B. β-Carotin) in Obst und Gemüse, wie Karotten, Paprika, Tomaten und Orangen, oder als Retinylester (RE) aus tierischen Lebensmittel, z.B. Leber oder Fisch, aufgenommen werden.

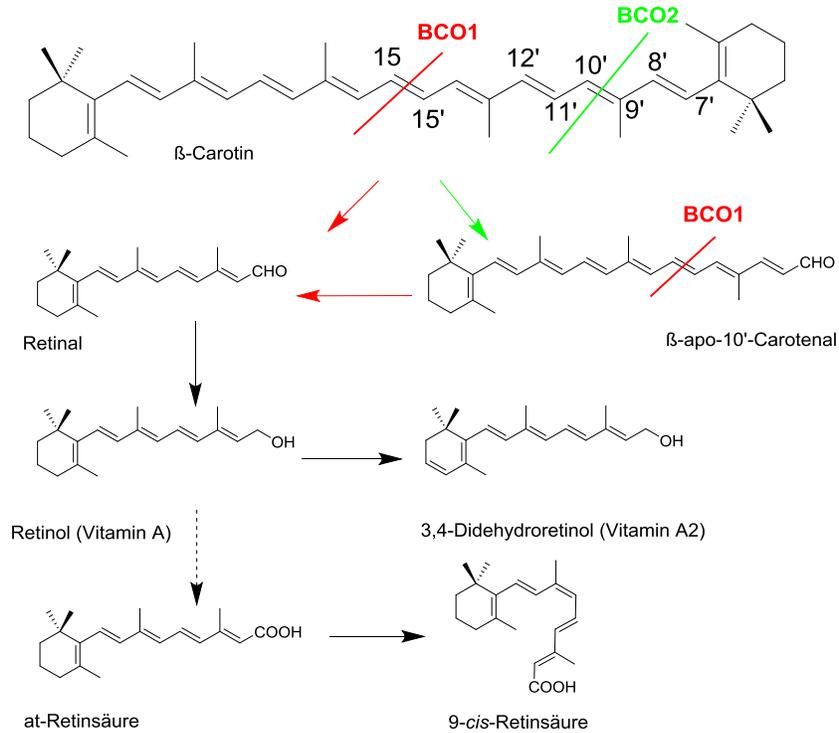


**Abb. 5: Biosynthese der Carotinoide** (nach (Dingermann, T., Hiller, K., Schneider, G., Zündorf, 2004)).

β-Carotin ist das wichtigste, mit der Nahrung aufgenommene Provitamin A für den Menschen. Es kann teilweise direkt im Darm resorbiert und über das Blut an Albumin gekoppelt (Alb-C) in die jeweiligen Zielgewebe, wie beispielsweise in die Haut, transportiert und gespeichert werden. Ein gewisser Anteil des β-Carotins wird im Epithel des Intestinallumens oxidativ in zwei Moleküle Retinal (RAL) gespalten. Diese zentrale, oxidative Spaltung des β-Carotins wird durch das Enzym BCO1 (β,β-Carotin 15,15'-monoxygenase 1) katalysiert (siehe Abb. 7) (dela Sena et al., 2013; Lindqvist and Andersson, 2004). Retinal wird direkt zum Retinol (ROL) reduziert und in Retinylester umgewandelt. Neben BCO1 ist auch in den Epithelzellen des Intestinallumens das Enzym BCO2 (β,β-Carotin 9',10'-monoxygenase 2) nachgewiesen worden. Dieses Enzym spaltet vorzugsweise β-Carotin asymmetrisch an der Doppelbindung zwischen C9' und C10' zu β-Ionon und

$\beta$ -apo-10'-Carotenal, das dann weiter oxidativ durch die BCO1 zu Retinal gespalten werden kann (siehe Abb. 6) (dela Sena et al., 2013; Lindqvist, 2005). Beide Monooxygenasen zeichnen sich durch eine Substratspezifität aus. Das Hauptsubstrat von BCO1 mit der höchsten Affinität ist  $\beta$ -Carotin. BCO1 hat zudem eine geringere Affinität zu Lycopin. Als strukturelle Voraussetzung für die Affinität zu BCO1 gilt eine unsubstituierte  $\beta$ -Iononeinheit in Carotinoiden, wie  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und den kürzerkettigen Apocarotenalen. Zu Xanthophyllen, z.B. Lutein und Zeaxanthin, besteht keine Affinität (dela Sena et al., 2013). Hingegen besitzt BCO2 neben Lycopin auch eine Affinität zu Xanthophyllen, die in beiden Ringen eine Hydroxylgruppe, wie es bei Lutein und Zeaxanthin der Fall ist (Hu et al., 2006; Mein et al., 2012).

Beide Monooxygenasen sind in verschiedenen Organen und Geweben lokalisiert. Hauptlokalisation beider Enzyme sind aufgrund des Metabolismus von Carotinen und Xanthophyllen aus der Nahrung das Darmepithelium und die Leber. Daneben konnten beide Enzyme in Zellen des Auges, der Niere, der Prostata und des Herzens nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass verschiedene Organe autonom in der Lage sind, den Vitamin A-Haushalt zu regulieren.

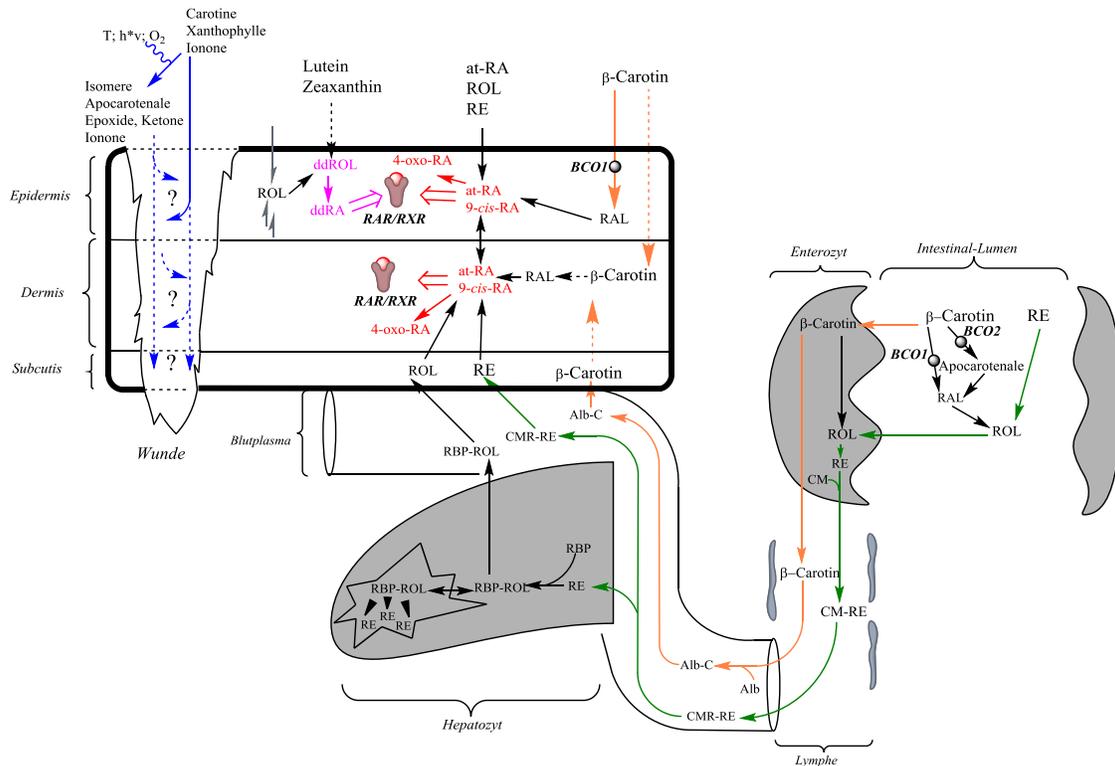


**Abb. 6:** Schematische Darstellung der enzymatischen Spaltung des  $\beta$ -Carotins und Strukturen der natürlichen Retinoide. BCO1:  $\beta$ , $\beta$ -Carotin 15,15'-monoxygenase 1; BCO2:  $\beta$ , $\beta$ -Carotin 9',10'-monoxygenase 2.

An Chylomikronen gekoppelt werden die Retinylester (CMR-RE) entweder in die Leber, wo sie in den Sternzellen gespeichert werden, oder direkt in das Gewebe transportiert. Mit der Nahrung aufgenommene Retinylester werden zunächst im Darmepithel zu Retinol gespalten, das dann wieder in Form von Retinylestern an Chylomikronen gebunden und transportiert werden kann (Roos et al., 1998; Vahlquist and Duvic, 2007). In der Haut gelangen Retinol, Retinylester bzw. Carotinoide nach Transport über die Blutbahn in die Subcutis, Dermis und Epidermis. Interessanterweise akkumulieren Carotinoide stärker in der Epidermis, während sich Retinol besonders in der Subcutis anreichert. So führt ein längerfristiger, übermäßiger Verzehr von Carotinoid-haltigen Produkten zu einer Gelbfärbung der Haut, der sogenannten Carotenoderma (Vahlquist and Duvic, 2007). In der Dermis werden hingegen sowohl Retinol als auch Carotinoide nur zu einem geringen Maße angereichert. In der Epidermis konnte BCO1 nachgewiesen werden (Lindqvist, 2005), was den Schluss zulässt, dass in der Epidermis gespeicherte Carotinoide mit einem unsubstituierten  $\beta$ -Ionon-Ring als Quelle für

Vitamin A dienen können. *In vitro* konnte für Melanocyten und Keratinocyten eine intrazelluläre Aufnahme von  $\beta$ -Carotin, sowie Umwandlung in Retinol nachgewiesen werden. (Andersson et al., 2001). Auch wenn bisher in der Dermis sowie in Fibroblasten keine Monooxygenasen detektiert wurden, konnte auch für Fibroblasten *in vitro* eine intrazelluläre Umwandlung von  $\beta$ -Carotin zu Retinol gezeigt werden (Wei et al., 1998). BCO2 ist dagegen bisher nicht in der Haut nachgewiesen worden (Lindqvist, 2005). Interessant in diesem Zusammenhang ist aber, dass das Xanthophyll Lutein, wahrscheinlich über seine Metaboliten den Retinsäurerezeptor in der Haut aktivieren kann. Welches Enzym an dem Metabolismus von Lutein beteiligt ist, wurde noch nicht nachgewiesen (Sayo et al., 2013).

In der Epidermis und der Dermis stellen *at*-Retinsäure und *9-cis*-Retinsäure die aktiven Metaboliten von Vitamin A dar, die über den RAR/RXR Heterodimerkomplex (Retinoic Acid Receptor / Retinoid X Receptor) die Effekte in der Haut vermitteln. Über verschiedene CYP-Enzyme wird Retinsäure zu verschiedenen Oxidationsprodukten, u.a. dem Hauptmetaboliten 4-oxo-Retinsäure umgewandelt. Eine Besonderheit des Retinoidmetabolismus in der Epidermis stellt die Bildung von Vitamin A<sub>2</sub> (3,4-Didehydroretinol; ddROL) aus Retinol in Keratinocyten dar. 3,4-Didehydroretinol kann dann zur Didehydroretinsäure (ddRA) oxidiert werden, die ebenfalls eine Affinität, wie *at*-Retinsäure, zu RAR aufweist. Die physiologische Funktion von Vitamin A<sub>2</sub> in der Epidermis ist allerdings noch nicht bekannt (Törmä and Vahlquist, 1985; Vahlquist and Duvic, 2007). In Abb. 7 sind die Prozesse des Metabolismus, Transports und der Speicherung der Carotinoide im menschlichen Körper und in der Haut zusammengestellt.



**Abb. 7: Metabolismus, Transport und Speicherung der Carotinoide im menschlichen Körper und in der Haut** (nach (Roos et al., 1998; Vahlquist and Duvic, 2007)). Abkürzungen: at-RA – Retinsäure; ROL – Retinol; RAL – Retinal; RE – Retinylester; ddROL – 3,4-Didehydroretinol; ddRA – 3,4-Didehydroretinsäure; BCO1 –  $\beta,\beta$ -Carotin 15,15'-monoxygenase 1; BCO2 –  $\beta,\beta$ -Carotin 9',10'-monoxygenase 2; RAR – Retinoic Acid Receptor; RXR – Retinoid X Receptor; CM – Chylomikron; CMR – Chylomikron Rest; RBP – Retinol bindendes Protein; Alb – Albumin; durchgezogene Linie – gesicherter Weg; gestrichelte Linie – denkbarer, nicht bewiesener Weg

### 2.3.2 Retinoide in der Wundheilung

Der Übersichtsartikel von Adbelmalek und Spencer über Retinoide in der Wundheilung, der ausschließlich *in vivo* Untersuchungen bei humanen und tierischen Wunden beinhaltet, beschreibt sowohl wundheilungsfördernde als auch die Wundheilung beeinträchtigende Effekte von Retinoiden. Die topische Applikation von Retinoiden für 2 bis 4 Wochen vor einer kosmetischen Behandlung, wie Peeling bzw. einer leichten Verwundung führt zu einer deutlich schnelleren Wundheilung. Von der topischen Applikation nach einer Verwundung scheinen kompliziertere, chronische Wunden, wie diabetische Ulzera, oder Wundheilungsstörungen aufgrund von Steroiden mehr als „normale“ Wunden sowie oberflächliche Schürfwunden mehr als chirurgische Nahtwunden zu profitieren.

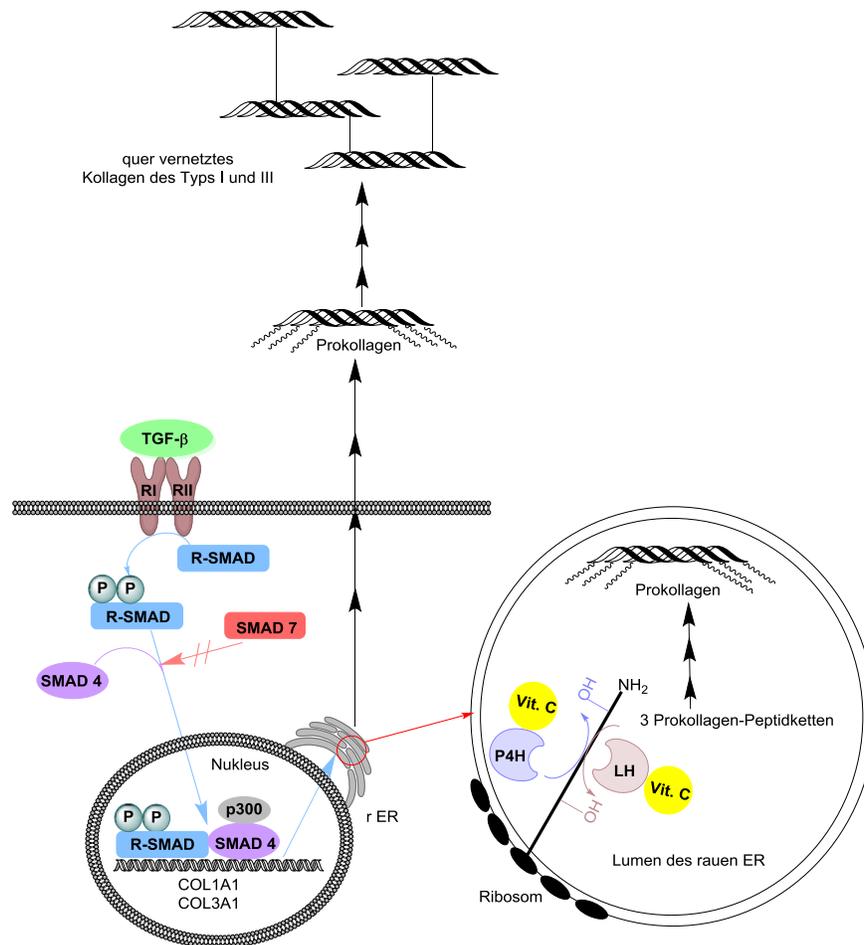
Neben einem schnelleren Wundschluss wurde eine gesteigerte Kollagensynthese und Bildung des Granulationsgewebes beobachtet. Der Einsatz systemischer Retinoide wird trotz fehlender Beweise für eine abnormale Wundheilung mit Narbenbildung bei kleineren kosmetischen Eingriffen und Operationen in der Haut kritisch gesehen und nicht empfohlen (Abdelmalek and Spencer, 2006).

### 2.3.3 **Synthese und Abbau des Kollagens sowie Möglichkeiten zu deren Beeinflussung**

Da Retinoide nach verschiedenen Berichten die Kollagenbildung beeinflussen (Lit. in (Abdelmalek and Spencer, 2006)), soll im nächsten Abschnitt allgemein die Bildung und der Abbau des Kollagens näher beschrieben werden.

Kollagen als ein Hauptbestandteil des Bindegewebes, bzw. der Extrazellulärmatrix (EZM) besteht aus 3 linksgängigen Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten), die eine rechtsgängige Superhelix ausbilden. Die tripelhelicale Konformation wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Strängen stabilisiert. In den einzelnen Kollagen-Helices kommen repetitive Glycin-X-Y-Sequenzen vor, wobei es sich bei X und Y häufig um Prolin bzw. Hydroxyprolin handelt. Ferner tritt in Y-Position bisweilen Hydroxylysin auf. Während Hydroxyprolin entscheidend für die Stabilisierung der Tripelhelix ist, dient Hydroxylysin als Voraussetzung für die Ausbildung von kovalenten Quervernetzungen zwischen den Tripelhelices. Es werden mehrere Kollagentypen unterschieden. In der Haut finden sich vor allem die Fibrillen-bildenden Kollagene des Typs I und III wieder. Daneben gibt es aber auch noch zahlreiche andere Kollagentypen, die sich in der Länge der tripelhelicalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen innerhalb der Tripelhelix und durch zusätzliche globuläre Domänen voneinander unterscheiden. Dadurch weisen sie unterschiedliche Eigenschaften auf und sind im menschlichen Körper entsprechend unterschiedlich lokalisiert (Burns et al., 2010; Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, Graeve, 2014).

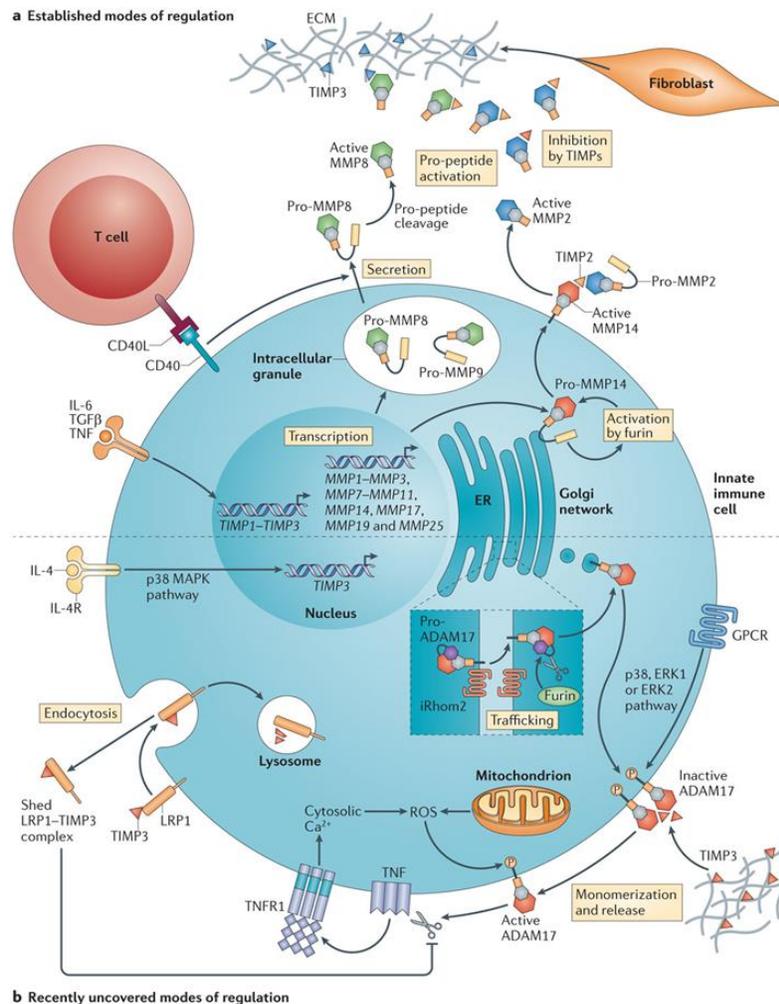
Die Bildung neuen Kollagens läuft vorwiegend in den Fibroblasten ab, kann aber auch in epidermalen Keratinocyten stattfinden. Hauptstimulus der Kollagensynthese ist das Cytokin TGF- $\beta$ , das an den TGF- $\beta$ -Rezeptor I (RII) bindet, wodurch nachfolgend der TGF- $\beta$ -Rezeptor I (RI) aktiviert wird, was dann zu einer Aktivierung der rezeptorassoziierten SMADs (R-SMADs), SMAD 2 bzw. 3 durch Phosphorylierung führt. Die aktivierten SMADs 2 / 3 komplexieren dann mit SMAD 4 (Co-SMAD). Dieser Komplex wandert in den Zellkern, wo er dann die Expression der Gene für Kollagen Typ I und III (COL1A1, COL3A1) sowie der Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) induziert. Die Bildung des aktivierten R-SMAD–SMAD 4-Komplexes kann durch SMAD 7 verhindert werden (Leask and Abraham, 2004; Schiller et al., 2004). Die einzelnen Kollagenketten werden an den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (r ER) gebildet und dann in das Endoplasmatische Retikulum aufgenommen. Hier erfolgt dann die Hydroxylierung der Prolyl- und Lysylreste in der Kollagenpeptidkette, ein Vorgang, der für die Ausbildung der Kollagenstruktur unerlässlich ist. Diese Hydroxylierungen werden von der Prolyl-4-hydroxylase (P4H) und der Lysylhydroxylase (LH) katalysiert. Für die beiden Fe<sup>2+</sup>-haltigen Enzyme stellt Ascorbinsäure (Vitamin C) den entscheidenden Cofaktor für die Regenerierung dar. Ein Mangel an Vitamin C führt zu einer Oxidierung zu Fe<sup>3+</sup> in den Hydroxylasen und damit zu deren Funktionsverlust. Die Folge ist eine verminderte Kollagensynthese, was mit dem Krankheitsbild von Skorbut einhergeht. Nachdem drei Prokollagenpeptidketten zur Tripelhelix gefaltet wurden, werden diese extrazellulär über mehrere Schritte nach Abspaltung der Propeptide über die Hydroxylysylreste zum fibrillären Kollagen Typ I und III quervernetzt (Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, Graeve, 2014). Der Ablauf der Kollagensynthese ist in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Kollagensynthese** (nach (Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, Graeve, 2014; Leask and Abraham, 2004; Schiller et al., 2004)).

Für einen geregelten Ablauf der Granulationsphase und der Angiogenese in der Wundheilung spielt auch der Abbau des Kollagens eine wichtige Rolle, damit nach der Degradierung der EZM weitere Fibrocyten, die zu Fibroblasten differenzieren sowie Endothelzellen in das Granulationsgewebe migrieren können (Greaves et al., 2013). Der Kollagenabbau wird von MMPs, die zu den  $Zn^{2+}$ -haltigen Endopeptidasen zählen, katalysiert. Diese werden in die Kollagenasen (MMP-1; -8 und -13), die das fibrilläre Kollagen Typ I - III, nicht aber IV zwischen Gly-Ile/Leu spalten können sowie die Gelatinasen (MMP-2 und -9), welche die dann instabile Tripelhelix weiter abbauen können, unterteilt (Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, Graeve, 2014). Die Genexpression der MMPs wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Aktivatorprotein-1 (AP-1) und NF- $\kappa$ B, reguliert. Zunächst werden die MMPs in

einer inaktiven Form (Pro-MMPs) exprimiert und dann im Gewebe in die aktive Form durch Abspaltung der Propeptiddomäne überführt (siehe Abb. 9). Die MMPs können endogen von kleinen biologischen Molekülen, den TIMPs (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase) gehemmt werden (Gill and Parks, 2008).



**Abb. 9: Regulierung der Aktivierung und Inhibition der MMPs.** Abbildung mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. abgedruckt: Nature Reviews Immunology, Khokha et al. 2013, © 2013, <http://www.nature.com/nature/index.html>.

Eine gestörte Kollagensynthese kann zu verschiedenen Erkrankungen führen. So kann die Regulation der an der Kollagensynthese beteiligten Gene gestört sein oder es kann zu Mutationen von Kollagenen oder Enzymen kommen. Bei verschiedenen Fibrosen, wie z.B. Lungen-, Nieren- und Leberfibrosen, führt eine starke Zunahme

der Kollagensynthese durch verminderten Abbau zu pathologischen Veränderungen der Organe. In der Haut kann ebenfalls, wie bei hypertrophen Narben und Keloiden, eine gesteigerte Kollagensynthese vorliegen. Bei chronischen Wunden sowie durch UV-Licht induzierter und altersbedingter Hautalterung mit einhergehender Faltenbildung hingegen liegt entweder eine verringerte Kollagensynthese oder eine gesteigerte Aktivität der MMPs vor. Demzufolge können verschiedene Parameter des Kollagenaufbaus und / oder -abbaus hoch- bzw. herunterreguliert sein (Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, Graeve, 2014).

Eine Möglichkeit, die Kollagensynthese zu beeinflussen, ist TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) und dessen Signalkaskade über die SMADs. TGF- $\beta$  wird in vielen *in vitro* Versuchen daher auch als Positivkontrolle für eine Steigerung des Kollagens auf Protein- und mRNA-Ebene verwendet. So konnte für Asiatsäure, einem Sapogenin, in humanen Keloidfibroblasten gezeigt werden, dass die durch TGF- $\beta$  induzierte Kollagensynthese gehemmt wurde. Es wurde eine Hemmung der Phosphorylierung von SMAD 2 / 3 und erhöhte SMAD 7-Level nachgewiesen. Weiterhin scheint die Aktivierung von PPAR- $\gamma$  durch Asiatsäure bei der Hemmung der Kollagensynthese eine Rolle zu spielen, weil durch Verwendung eines PPAR- $\gamma$ -Antagonisten die Hemmung wieder aufgehoben wurde (Bian et al., 2013). In einer anderen Studie mit humanen dermalen Fibroblasten erhöhte Asiaticosid, ein Triterpensaponin vom Oleanan-Typ, die Kollagensynthese durch Aktivierung von SMAD 2 und 3, ohne dass geklärt werden konnte, welche Kinase, außer der TGF- $\beta$ -Rezeptor I-Kinase, dabei beteiligt war (Lee et al., 2006). Erstaunlicherweise wiesen Tang et al. Jahre später mit Fibroblasten keloiden Ursprungs nach, dass Asiaticosid durch Erhöhung des inhibitorischen SMAD 7 und Hemmung der TGF- $\beta$ RI und II-Rezeptoren die Kollagenproduktion hemmt (Tang et al., 2011). Dagegen wurde in normalen Fibroblasten die Kollagensynthese durch Asiaticosid nicht erhöht. Weitere Untersuchungen müssen klären, woher die Diskrepanz in den Untersuchungsergebnissen bei normalen Fibroblasten zwischen Tang et al. und Lee et al. herrührt. Tsuji-Naito et al. konnten zeigen, dass  $\alpha$ -Liponsäure in humanen dermalen Fibroblasten die Kollagensynthese induzierte, indem die Prolyl-4-Hydroxylase auf

dem TGF- $\beta$ -SMAD-Signalweg heraufreguliert wurde (Tsuji-Naito et al., 2010). Kartogenin, ein Molekül mit 3 aromatischen Ringen, führte zu einer Erhöhung der Kollagensynthese durch Aktivierung und nukleären Transport von SMAD 5 in humanen dermalen Fibroblasten (Wang et al., 2014). Weiterhin konnte in humanen dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden, dass das Ginsenosid Rb1, ein Triterpensaponin vom Dammaran-Typ, die Synthese von Kollagen I induzierte. Hierbei soll dieses Saponin PPAR- $\delta$  (Peroxisome Proliferator-activated receptor-delta) aktivieren, wodurch miR-25 gehemmt und die Kollagen I-Synthese erhöht wird (Kwok et al., 2012). Es wird diskutiert, dass PPAR- $\delta$  neben SMAD 3 an den COL3A1-Promotor bindet und so die Transkription des Kollagens induziert.

Eine weitere wichtige Möglichkeit der Beeinflussung ist die posttranslationale Hydroxylierung der Prolyl- und Lysylreste, wie es für Ascorbinsäure und verschiedene stabilere Derivate beschrieben ist. Aus diesem Grund werden letztere als Positivkontrollen für zellbasierte Versuche herangezogen. Außerdem werden für Ascorbinsäure und deren Derivate auch eine Erhöhung der Kollagen-mRNA und somit eine direkte Beeinflussung der Genexpression diskutiert (Tsutsumi et al., 2012).

Weiterhin kann über die Expression und Aktivität der MMPs und / oder der TIMPs Einfluss auf den Abbau des Kollagens und damit eine Steigerung oder Verringerung der synthetisierten Kollagenmenge genommen werden. Insbesondere Retinoide greifen in die Genexpression und Aktivität der MMPs ein.

#### 2.3.4 **Wirkung von Carotinoiden und Retinoiden auf die Kollagensynthese und -abbau**

Für Retinoide, in erster Linie für *at*-Retinsäure (Tretinoin), wurden in verschiedenen *in vivo* Tests und Zellassays sowohl den Kollagengehalt steigernde als auch senkende Effekte beschrieben. So konnte für *at*-Retinsäure in renalen Fibroblasten eine erhöhte Kollagensynthese nachgewiesen werden, was in

Verbindung mit einer reduzierten Aktivität der MMPs und erhöhter Expression von PAL-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) stand (Rankin et al., 2013).

In einem *in vivo* Modell (Organkultur) mit humaner, natürlich gealterter Haut (80+) führte eine 7-tägige Behandlung mit 1 % Retinol zu einer Steigerung von Prokollagen Typ I und III sowie einer Senkung der erhöhten Proteinlevel von MMP-1 und -9 (Varani et al., 2000). In einem anderen *in vivo* Modell mit Haut von Diabetikern wurde für *at*-Retinsäure eine verringerte Expression von MMP-2 und MMP-9, eine gesteigerte Expression von TIMP-1 sowie eine Zunahme des löslichen Kollagens und Prokollagens Typ I beobachtet. (Lateef et al., 2004). In Wundmodellen mit Haut von Ratten, bei denen entweder durch die Applikation eines Glucocorticoids ein atrophischer Zustand simuliert, durch Streptozotocin Diabetes induziert oder Haut von älteren Ratten (14 - 16 Monate) verwendet wurden, konnte durch die Behandlung mit einem Picolinsäureester der *9-cis*-Retinsäure in allen drei Fällen die Expression von MMP-2 und MMP-9 im Wundfluid gesenkt und eine Erhöhung des löslichen Kollagens Typ I nachgewiesen werden (Warner et al., 2008).

In Fibroblastenkulturen konnte eine Abnahme der Expression der Kollagenase und eine Zunahme der Kollagensynthese für das Hybriderivat Retinylretinoat nachgewiesen werden, wobei der Effekt größer als nach Behandlung von Retinol war (Kim et al., 2008). Erhöhte mRNA-Level für Kollagen I, III und VI konnten für einen Tretinoin-Tocopherylester in humanen dermalen Fibroblasten gezeigt werden (Mori et al., 1994).

Zudem gibt es experimentelle Hinweise, dass Retinoide die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren in bovinen Endothellzellen erhöhen (Yoshizawa et al., 1998). Inwieweit hierdurch die Kollagensynthese stimuliert wird, war nicht Gegenstand der Untersuchung. Der Einfluss der Retinoide scheint aber auch zelltypspezifisch zu sein, da für humane fetale Gaumenfortsatzmesenchymzellen (hFPMC) für *at*-Retinsäure eine Herunterregulierung von TGF- $\beta$ R<sub>II</sub> und der phosphorylierten SMADs 2 und 3 sowie eine Hochregulierung von SMAD 7 gezeigt werden konnte,

was insgesamt in einer Abnahme der Bildung der EZM resultierte (Li et al., 2014). Zudem führte *at*-Retinsäure in einer hepatischen Sternzellkultur zu einer Inhibierung der Kollagensynthese durch Bindung des Retinsäurerezeptor (RAR $\beta$ ) und des Retinoid X Rezeptors  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) an das RARE (retinoic acid response element) des Promotors COL1A2-Gens (Wang et al., 2004).

Der Einfluss der Carotinoide auf die Kollagensynthese und den Kollagenabbau ist in der Literatur kaum beschrieben. Allerdings konnte für  $\beta$ -Carotin eine Senkung der mRNA von MMP-1 und -10 in UVA exponierten HaCaT-Zellen nachgewiesen werden, was in Verbindung mit dem Singulett-O<sub>2</sub> abfangenden Effekt des intakten  $\beta$ -Carotins stand.  $\beta$ -Carotin induzierte zwar eine schwache Retinoid-Aktivität, die Genregulation der  $\beta$ -Carotin spaltenden Enzyme wurde aber nicht beeinflusst. Entsprechend konnte weder Retinol noch Retinylester mittels HPLC nachgewiesen werden. Es bleibt somit die Frage offen, wodurch  $\beta$ -Carotin eine Aktivierung des Retinsäure-abhängigen Luciferase-Reporter-Gen-Assays induzierte (Wertz et al., 2004).

## 2.4 Matricin als potentieller Wirkstoff von Kamillenzubereitungen

### 2.4.1 *Matricaria recutita* L. – Vorkommen, Inhaltsstoffe, Wirkungen und Anwendungen

Die echte Kamille (siehe Abb. 10), *Matricaria recutita* L. (auch *Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT) gehört zur Familie der Asteraceae. Die Blüten enthalten 0,3 - 1,5 % ätherisches Öl, dessen Hauptbestandteile Sesquiterpene vom Bisabolan-Typ, (-)- $\alpha$ -Bisbolol, Bisabololoxide, Bisabolonoxide sowie En-in-Spiroether (siehe Abb. 11) und Spathulenol sind, des weiteren 2 - 3 % glycosidierte Flavonoide vom Apigenin- und Luteolin-Typ, 3 - 10 % Polysaccharide, Phenolcarbonsäuren sowie Cumarine (Hänsel, Rudolf, Sticher, 2010; Neubeck, 2014). Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist das nicht flüchtige Sesquiterpenlacton Matricin (0,03 bis 0,2 %), das bei der ätherischen Öldestillation zum Chamazulen umgewandelt wird.



Abb. 10: *Matricaria recutita* L. Fotos: privat.

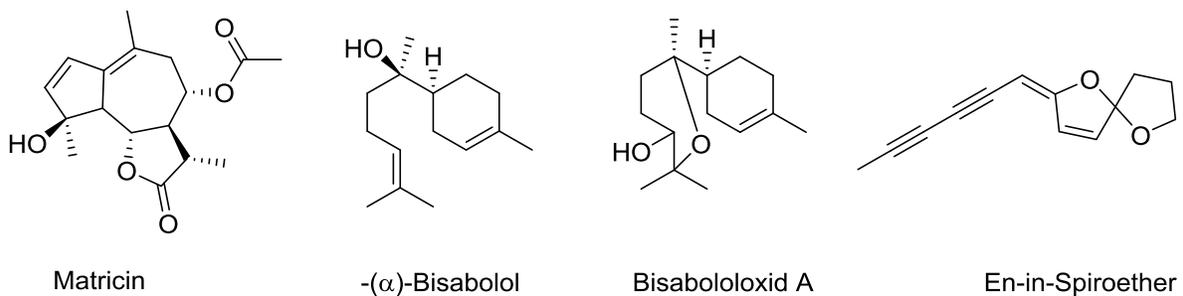


Abb. 11: Strukturen der im ätherischen Öl von Kamillenblüten vorkommenden Verbindungen.

Bereits im 17. Jh. wurde Kamillenöl zur Behandlung von Krämpfen beschrieben. Volksmedizinische Anwendung finden Kamillenzubereitungen schon immer bei Blähungen, krampfartigen Magen-Darm-Beschwerden sowie als Beruhigungsmittel. Offizielle Monographien führen leichte gastrointestinale Beschwerden, Symptome einer Erkältung, kleiner Ulzera sowie Entzündungen im Mund- und Rachenraum, Irritationen der Haut und Schleimhaut im Anal- und Genitalbereich sowie leichte Entzündungen der Haut, wie z.B. Sonnenbrand als Indikationen für Kamillenzubereitungen an (HMPC, 2011).

Für die antiinflammatorische Wirkung werden verschiedene Mechanismen und Inhaltsstoffe diskutiert. Sowohl Bisabolol und Bisabololoxide als auch die Flavonoide könnten an der antiinflammatorischen Wirkung über eine Hemmung der Cyclooxygenase (COX), Lipoxxygenase (LOX) und der Bildung von Leukotrien B<sub>4</sub> beitragen (Ammon and Kaul, 1992). Allerdings ist bei externer Anwendung der

Beitrag der Apigenin- und Luteolinderivate aufgrund ihrer Hydrophilie und der damit verbundenen schlechten Penetration durch die Haut sehr gering (Merfort et al., 1994). Schon seit langer Zeit stehen Matricin und seine Abbauprodukte bei der antiinflammatorischen Wirkung von Kamillenzubereitungen im Fokus.

#### 2.4.2 Antiinflammatorische Wirkung von Matricin und seinen Abbauprodukten

Matricin ist ein Sesquiterpenlacton (STL) vom Guaianolid-Typ ohne eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketogruppe. Als Proazulen wird Matricin bei der ätherischen Wasserdampfdestillation durch hohe Temperaturen und im sauren pH über mehrere Zwischenschritte, wie die Chamazulencarbonsäure, zum Chamazulen degradiert (siehe Abb. 12). Aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems ist das Chamazulen für die blaue Färbung des ätherischen Öls aus Kamillenblüten verantwortlich.

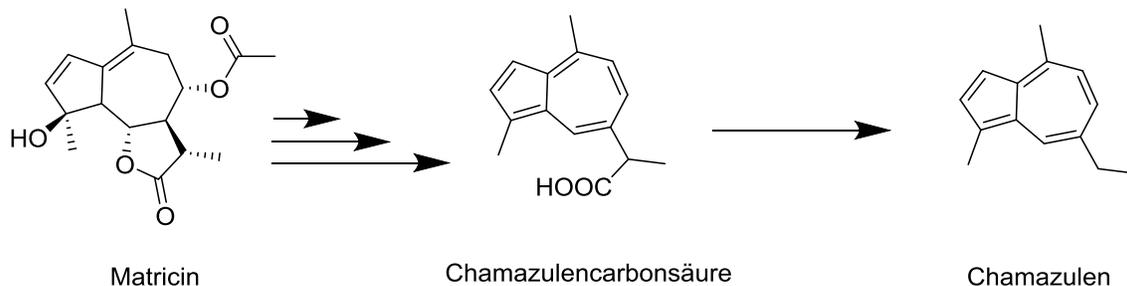


Abb. 12: Degradierung des Matricins zu Chamazulen.

Bereits 1939 untersuchten Hübner und Albath die entzündungshemmende Wirkung von Chamazulen, dem Rest des ätherischen Öls nach der Chamazulengewinnung sowie Kamillosan<sup>®</sup>, einer Mischung eines Ethanol-Extrakts (38,5 %) und des ätherischen Öls aus Kamillenblüten, an verschiedenen *in vivo* Entzündungsmodellen in Ratten, Katzen und Menschen. Die Autoren schrieben dem Chamazulen die antiinflammatorische Wirkung zu (Huebner and Albath, 1939), wobei zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, dass Matricin die Vorstufe von Chamazulen darstellt. Allerdings konnten Oettel und Wilhelm-Kollmannsperger sowohl für Chamazulen als auch für andere Azulene sowie einen Kamilleninfus und

ein Kamillenöl keine statistisch signifikanten antiinflammatorischen Effekte am Senfölschistosomosemodell bei Kaninchen nachweisen (Oettel and Wilhelm-Kollmannsperger, 1955). Erst 1956 wurde Matricin als Vorstufe des Chamazulens aus Kamillenblüten isoliert und dessen Struktur beschrieben. Am Carrageenan-Rattenödemmodell konnten Jakovlev et al. für Matricin einen größeren antiinflammatorischen Effekt als für Chamazulen nachweisen (Jakovlev et al., 1983). Ähnlich war das Ergebnis im Crotonöl-Mausödemitest, in dem ebenfalls Matricin gegenüber Chamazulen eine stärkere Wirksamkeit zeigte (Zidorn et al., 1999; Zitterl-Eglseer et al., 1991). Im Gegensatz dazu konnten Safayhi et al. zeigen, dass Chamazulen, aber nicht Matricin die Bildung von Leukotrien B<sub>4</sub> sowie die Lipoxygenase *in vitro* hemmt (Safayhi et al., 1994). Ramadan et al. fokussierten sich bei ihren Untersuchungen auf die Chamazulencarbonsäure, da sie in einer Metabolisierungsstudie im Menschen gezeigt hatten, dass bei der oralen Applikation von 500 mg Matricin pharmakologisch relevante Plasmaspiegel dieses Metaboliten nachweisbar waren. Interessanterweise wies Chamazulencarbonsäure sowohl im Carrageenan-Rattenödem- sowie im Phorbol-12-myristat-13-acetat-Mausödemitest eine antiinflammatorische Wirkung auf. Chamazulencarbonsäure hemmte weiterhin COX-II stärker als COX-I, was mit der mit der strukturellen Ähnlichkeit zu synthetischen Propionsäurederivaten, wie S-Naproxen, erklärt wurde (Ramadan et al., 2006). Sehr aktuell untersuchten Flemming et al. in einem zellbasierten Test Matricin und Chamazulen auf deren Einfluss auf die ICAM-1-Expression. Es konnte für Matricin, nicht aber für Chamazulen eine Reduktion der durch LPS und TNF- $\alpha$  induzierten Bildung von ICAM-1 auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. Sie wiesen weiter eine NF- $\kappa$ B-Abhängigkeit nach, da Matricin die durch TNF- $\alpha$  induzierte transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B im Reporter-Gen-Assay und die NF- $\kappa$ B-Translokation in den Zellkern hemmte (Flemming et al., 2015). Da Matricin aufgrund des Fehlens einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketogruppe nicht wie z.B. Helenalin, einem STL aus *Arnica montana* mit der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B interagieren kann, sollte nach den Autoren dafür ein anderer, bisher nicht geklärter

Mechanismus verantwortlich sein. Letztlich ist das Target für die *in vivo* nachgewiesene antiinflammatorische Wirkung nicht bekannt.

## 2.5 Zielsetzung

### 2.5.1 Wundheilungsfördernde Eigenschaften von *Calendula*-Extrakten

Lipophile und hydrophile Extrakte aus *Calendula*-Blüten werden zur Beschleunigung der Wundheilung angewandt. Trotz verschiedener *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen sind die Wirkstoffe und der Wirkmechanismus nicht geklärt.

Durch die Gewinnung eines *n*-Hexan-, Ethanol- und wässrigen Extrakts aus dem gleichen Drogenmaterial sollte das gesamte Inhaltsstoffspektrum der *Calendula*-Blüten für die Testung an zellbasierten und *in vitro* Versuchen erfasst werden. Außerdem sollte der *n*-Hexan-Extrakt im Hinblick auf die Trennung von Carotinoiden und Triterpenen phytochemisch untersucht werden.

Um einen möglichen Einfluss auf die Inflammationsphase der Wundheilung zu untersuchen, sollten die 3 *Calendula*-Extrakte auf eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowie der Expression des proinflammatorischen Chemokins IL-8 untersucht werden.

*In vivo* Studien beschrieben für *Calendula*-Zubereitungen eine Beschleunigung der Reepithelialisierung. Daher sollte untersucht werden, ob die *Calendula*-Extrakte und einige Triterpene die Migration und Proliferation von humanen immortalisierten Keratinocyten beeinflussen.

Da für *Calendula*-Zubereitungen eine Beschleunigung der Granulationsphase, in der die Bildung neuen Kollagens im Vordergrund steht, beschrieben ist, sollten die *Calendula*-Extrakte sowohl auf eine Hemmung einer bakteriellen Kollagenase als auch auf eine Erhöhung des Kollagengehalts im Überstand von primären humanen Fibroblasten untersucht werden.

### 2.5.2 Entzündungshemmende Eigenschaften von Matricin

Das Sesquiterpenlacton Matricin wird über eine Beeinflussung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade als ein potentieller Wirkstoff bei der entzündungshemmenden Wirkung von Kamillenzubereitungen angesehen, wobei das molekulare Target unbekannt ist.

Eine *in silico* Analyse ergab den IL-1-Rezeptor als mögliches molekulares Target von Matricin. Mittels EMSA sollte überprüft werden, ob Matricin über die Bindung des IL-1-Rezeptors die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hemmt. Außerdem sollte unter Verwendung von humanen immortalisierten Keratinocyten untersucht werden, ob die Expression des Adhäsionsmolekül ICAM-1 durch Matricin auch in humanen Keratinocyten gehemmt wird.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phytochemische Untersuchungen

#### 3.1.1 Charakterisierung der *Calendula*-Extrakte

In Anlehnung an die offiziellen Monografien und um das gesamte Spektrum an Inhaltsstoffen erfassen zu können, wurden aus dem gleichen Drogenmaterial 3 verschiedene Extrakte hergestellt: ein *n*-Hexan-Extrakt (HE), ein Ethanol-Extrakt (EE) und wässriger Extrakt (WE). Von diesen Extrakten wurden Fingerprint  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgenommen (siehe Abb. 13 bis Abb. 15). Die DC-Analysen der Extrakte ergaben, dass HE mit Carotinoiden, Triterpenen, Sesquiterpenglycosiden und Phytosterolen und EE mit glycosidierten Flavonoiden, Triterpensaponinen und Kaffeesäurederivaten angereichert waren. WE wies neben den enthaltenen Polysacchariden Reste von Flavonoiden und Triterpensaponinen auf (siehe Abb. 126). Außerdem war es möglich, nach der phytochemischen Aufarbeitung von HE den Zonen im DC einzelne Triterpene zuzuordnen (siehe Abb. 125).

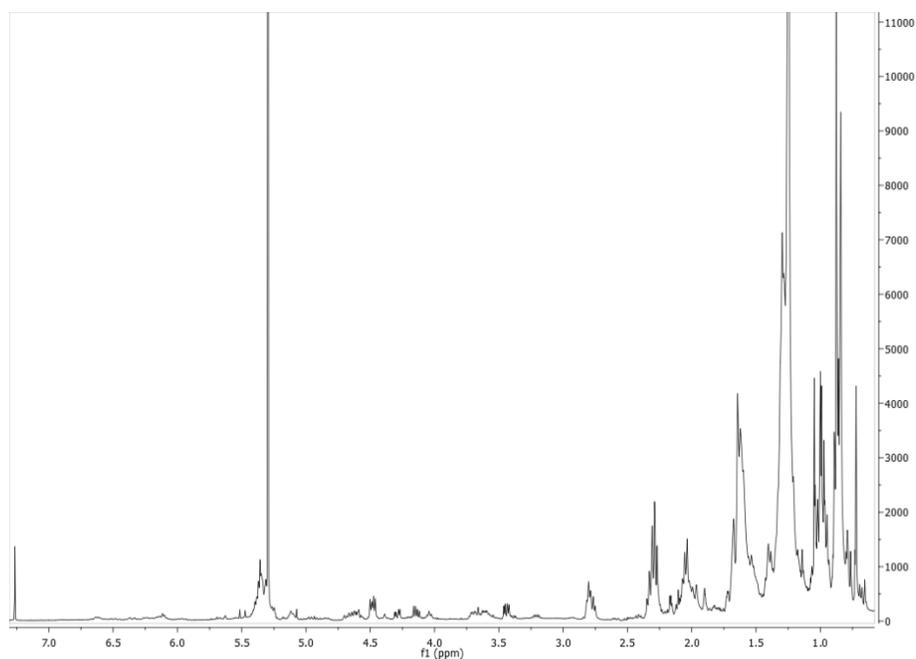


Abb. 13:  $^1\text{H}$ -Spektrum des *n*-Hexan-Extrakts (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

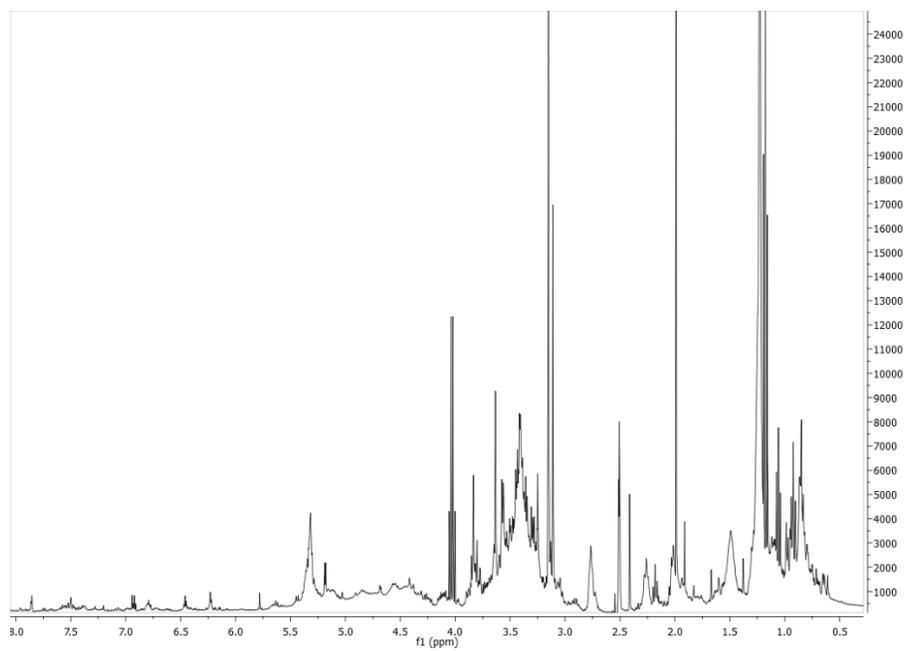


Abb. 14:  $^1\text{H}$ -Spektrum des Ethanol-Extrakts (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

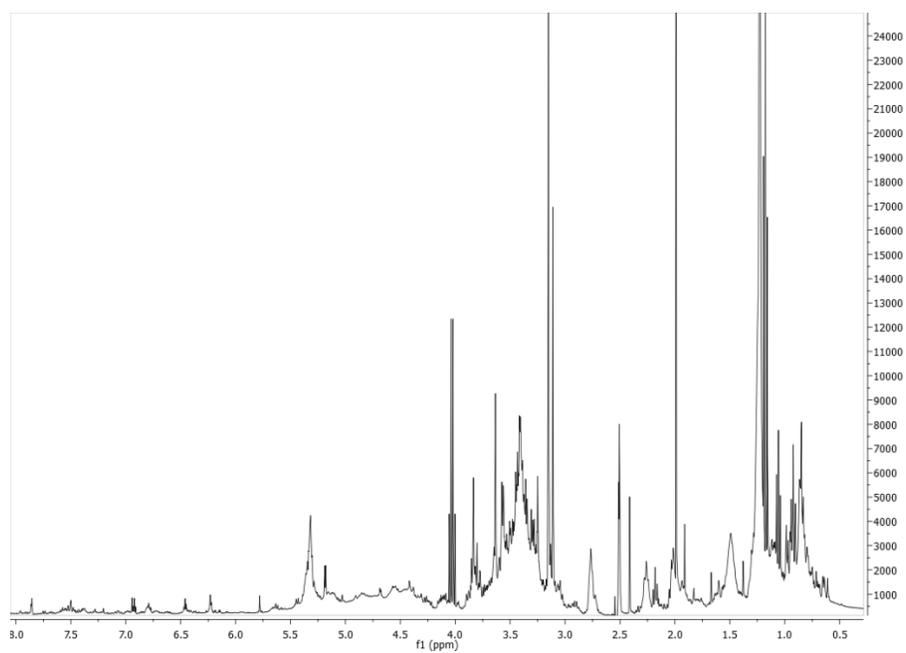


Abb. 15:  $^1\text{H}$ -Spektrum des wässrigen Extrakts (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

## 3.1.2 Faradiol 3,16-diester (1 – 4)

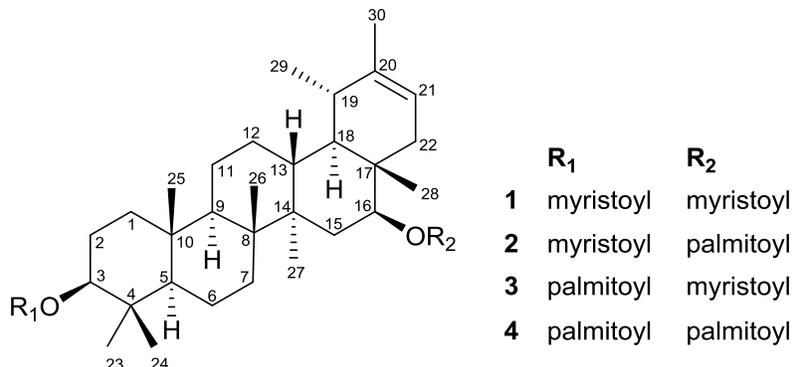


Abb. 16: Struktur der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 – 4.

Die Verbindungen 1 – 4 wurden nach Trennung der Fraktion TFa mittels MPLC als Gemisch in der Fraktion TFa.5 zu 11,8 mg angereichert. Die DC-Untersuchung von TFa.5 mit FM 1 und Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure ließ aufgrund der violetten Färbung der Bande auf Triterpene schließen, die sich von den anderen isolierten Triterpendiolmonoestern durch einen deutlich höheren  $R_f$ -Wert von 0,93 unterschieden.

Das Gemisch wurde einer basischen Hydrolyse unterworfen und anschließend mittels GC-MS-Analyse untersucht. Im Gaschromatogramm trat ein Peak bei einer  $R_t$  von 36,185 min auf. Das EI-MS (siehe Abb. 17) zeigte eine Fragmentierung, die mit Literaturangaben von Faradiol übereinstimmte (Pyrek and Baranowska, 1978). Das unter den gleichen Bedingungen untersuchte Faradiol, das nach Hydrolyse aus Faradiol 3-myristat erhalten wurde (Hamburger et al., 2003), wies ebenfalls die gleiche  $R_t$  als auch das gleiche EI-MS auf. Danach handelte es sich bei dem Gemisch um Ester des Triterpens Faradiol.

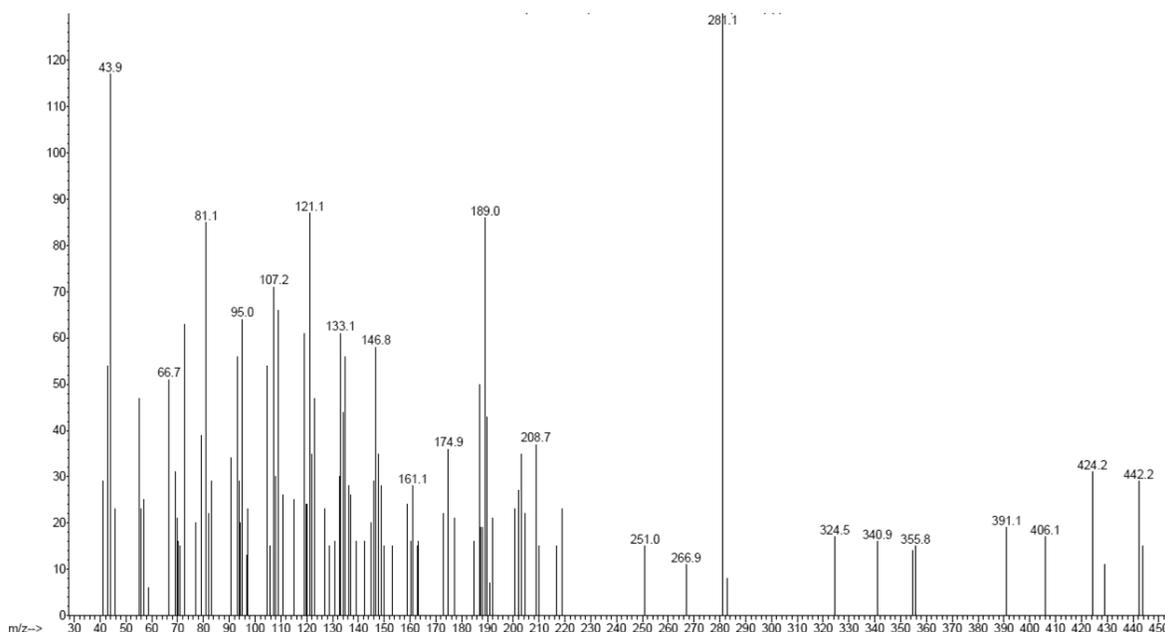


Abb. 17: EI-MS der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 nach basischer Hydrolyse

Zur weiteren Bestätigung und zur Abklärung, welche OH-Gruppen verestert vorlagen, wurden vom Gemisch 1 – 4 1D- und 2D-NMR-Analysen durchgeführt. Im  $^1\text{H}$ -Spektrum (Abb. 18) traten Signale von 6 Methyl-Singulets [ $\delta_{\text{H}}$  0,86 (H-23); 0,86 (H-24); 0,90 (H-25); 1,08 (H-26); 1,10 (H-27); 0,84 (H-28)], einem olefinischen Methyl-Singulett [ $\delta_{\text{H}}$  1,67 (H-30)] und einem Methyl-Dublett [ $\delta_{\text{H}}$  1,03 (H-29)] auf, was charakteristisch für ein pentazyklisches Triterpen mit Doppelbindung im Ringsystem ist. Die  $^{13}\text{C}$ -Werte stimmten mit denen in der Literatur für Faradiol 3-myristat angegebenen Werten (siehe Tab. 1) überein (Schmidt et al., 2004). Zusätzlich traten weitere Signale von Acylgruppen auf. Das Vorliegen eines Triterpens vom  $\psi$ -Taraxasten-Typ mit der  $\Delta^{20}$ -Doppelbindung wurde durch zwei  $\text{sp}^2$ -hydrierte C-Atome bei  $\delta_{\text{C}}$  139,6 und 117,9 sowie durch die im HSQC-Spektrum (Abb. 21) auftretende Kopplung von C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  117,9) mit H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  5,28) bestätigt. Das Vorliegen dieser Doppelbindung wurde weiterhin im HMBC-Spektrum (Abb. 22) durch die dort auftretenden Fernkopplungen von C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  117,9) mit H-30 ( $\delta_{\text{H}}$  1,67), C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  139,6) mit H-29 ( $\delta_{\text{H}}$  1,03) und H-30 ( $\delta_{\text{H}}$  1,67) verifiziert. Entsprechend wies auch das  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Abb. 20) Kopplungen von H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  5,28) mit H-22a ( $\delta_{\text{H}}$  1,65) und H-22b ( $\delta_{\text{H}}$  1,85) auf. Das Vorliegen einer Oxymethingruppe an C-3

wurde durch das bei  $\delta_H$  4,50 auftretende Dublett, wie es auch für H-3 des Faradiol 3-myristats aufgezeigt wurde, bestätigt (Schmidt et al., 2004). Auch die zweite OH-Gruppe an C-16 muss verestert vorliegen, da im Vergleich zu Faradiol 3-myristat (hier  $\delta_H$  3,437) das Dublett deutlich tieffeldverschoben war (Schmidt et al., 2004). Dieses lässt sich durch den bei Vorliegen eines Esters auftretenden abschirmenden Effekt erklären, d.h. sowohl die OH-Gruppe an C-3 als auch an C-16 lagen verestert vor. Darüber hinaus lag die chemische Verschiebung für C-16 im ähnlichen Bereich (hier  $\delta_C$  79,2), wie bei der von Neukirch et al. synthetisch hergestellten Verbindung Faradiol 3,16-dibenzoat ( $\delta_C$  79,79) (Neukirch et al., 2005).

Aus den übrigen, nicht zum Triterpengrundgerüst gehörenden Signalen, insbesondere dem im  $^1H$ -Spektrum auftretenden intensiven Signal bei  $\delta_H$  1,28 ( $CH_n$ ), das auf das Vorliegen einer langkettigen Alkylkette hindeutete, sowie durch das im  $^{13}C$ -Spektrum (Abb. 19) auftretende Signal für Carboxyl-Gruppen (C-1',  $\delta_C$  173,6) ließ sich ableiten, dass langkettige Fettsäuren als Esterkomponenten an beiden OH-Gruppen des Faradiols gebunden waren. Zudem war im HMBC-Spektrum eine Kopplung zwischen der Carboxylgruppe (C-1',  $\delta_C$  173,6) mit H-2' ( $\delta_H$  2,33) zu beobachten. Die übrigen  $^1H$ - und  $^{13}C$ -Signale, die mit # in den NMR-Spektren gekennzeichnet waren und nicht den Faradiol 3,16-diestern zugeordnet werden konnten, gehörten zu Verunreinigungen mit Fetten in der vorliegenden Fraktion.

Da sich im NMR die Signale der Fettsäuren und des Triterpengrundgerüsts überlagerten, war es nicht möglich die jeweilige Fettsäure an C-3 bzw. C-16 zu identifizieren. Deshalb wurde zunächst eine HR-+APCI-MS (siehe Abb. 23) durchgeführt. Leider ließen sich keine intakten  $[M+H]^+$ -Ionen nachweisen. Die nach Abspaltung einer Fettsäure (FS) entstandenen  $[M+H-FS]^+$ -Ionen mit  $m/z$  635,5759 und  $m/z$  663,6070 ließen aber darauf schließen, dass Myristin- bzw. Palmitinsäure als Esterkomponenten der Faradiol 3,16-diester vorhanden waren. Es konnten aber keine Aussagen getroffen werden, welche Fettsäure mit welcher OH-Gruppe verestert war und welche Kombinationsmöglichkeiten in diesem Gemisch vorlagen.

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Lämmerhofer gelang es, das Gemisch der Diester mittels HPLC-Methode aufzutrennen und die einzelnen Peaks mittels HR-APCI-QTOF-MS zu identifizieren. Diese Analysen sind in Kapitel 3.1.11 näher beschrieben. Demnach setzt sich das Gemisch (siehe Abb. 16) aus Faradiol 3,16-dimyristat (**1**), Faradiol 3-myristat,16-palmitat (**2**), Faradiol 3-palmitat,16-myristat (**3**) und Faradiol 3,16-diplamitat (**4**) zusammen. Hierbei handelt es sich um neue Naturstoffe, die bisher noch nicht beschrieben wurden.

**Tab. 1:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 – 4 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte zu Faradiol 3-myristat (nach (Schmidt et al., 2004)).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ [Lit.]	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	37,8	38,4	n.d.
2	22,6	23,7	1,63 m
3	80,4	80,5	4,50 dd (11.2, 5.6)
4	37,8	27,8	
5	55,3	55,4	0,84 m
6	18,0	18,2	1,42 m
7	34,1	34,1	1,41
8	41,1	41,1	
9	49,8	49,9	1,34 m
10	36,8	36,5	
11	21,4	21,5	1,59 m
12	27,0	27,2	2,08 m
13	38,7	n.d.	n.d.
14	42,7	42,5	
15	33,1	37,0	1,35 m 1,78 m
16	79,2	76,3	4,88 dd (11.6, 4.4)
17	37,8	39,9	
18	47,6	47,5	1,19 m
19	35,7	35,9	1,68 m
20	139,6	139,7	
21	117,9	118,3	5,28 brd (7.2)
22	38,7	37,5	1,65 m 1,85 m
23	27,9	28,0	0,86 s

Fortsetzung Tab. 1.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)
24	16,5	16,6	0,86 s
25	16,3	16,3	0,90 s
26	16,0	16,0	1,08 s
27	16,0	16,4	1,10 s
28	12,7	11,6	0,84 s
29	22,3	22,4	1,03 d (6.4)
30	21,4	21,5	1,67 s
Acyl			
1`	173,6	173,7	
2`	34,8	34,9	2,33 t (7.2)
3`	25,1	25,2	1,33 m
4` - 13` (4` - 11`)*	29,1 - 29,7	29,1 - 30,1	1,27 m
14` (12`)*	31,9	31,9	1,29 m
15` (13`)*	22,6	22,7	1,30 m
16` (14`)*	14,1	14,1	0,90 t (7.2)

in Klammern C-Atome für Myristoyl-Rest

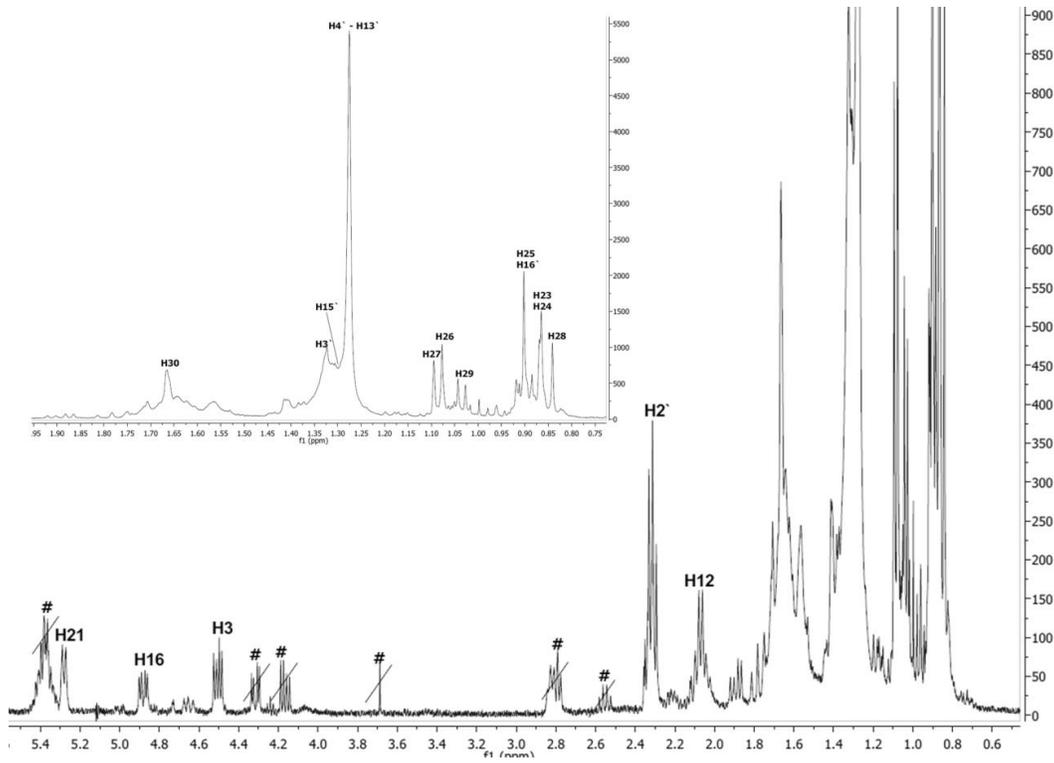


Abb. 18:  $^1\text{H}$ -Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

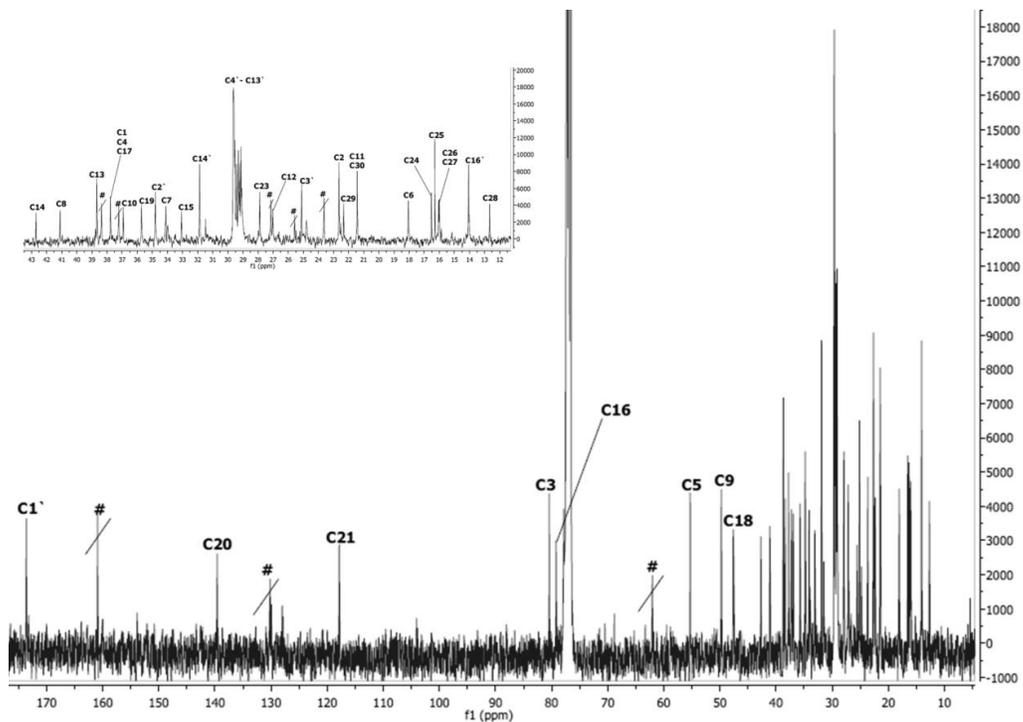


Abb. 19:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

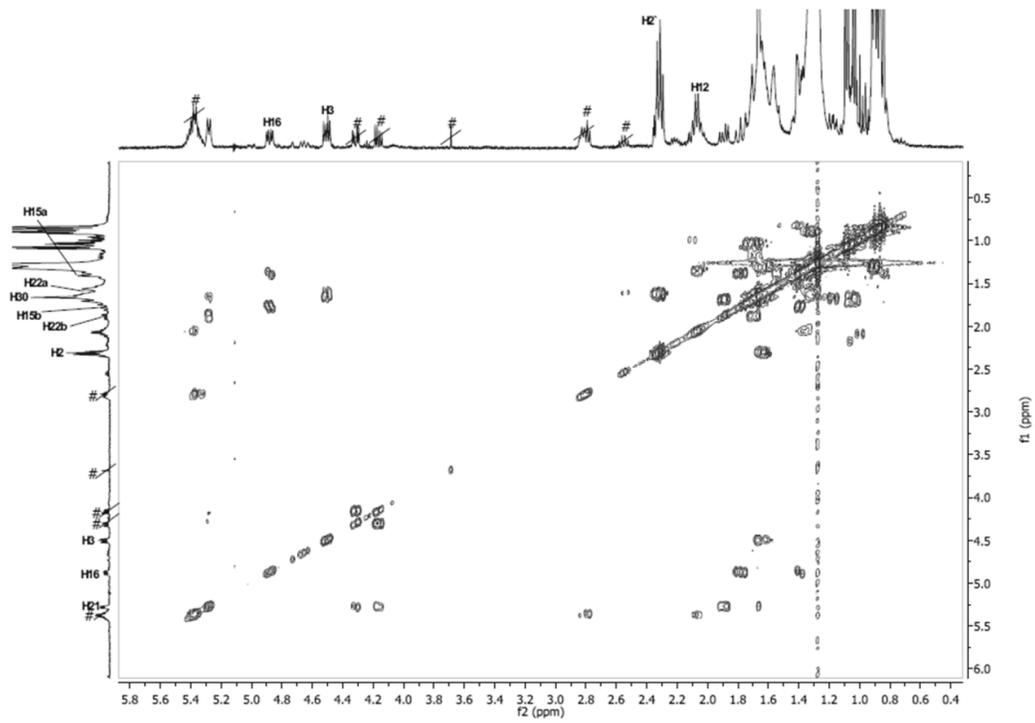


Abb. 20:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

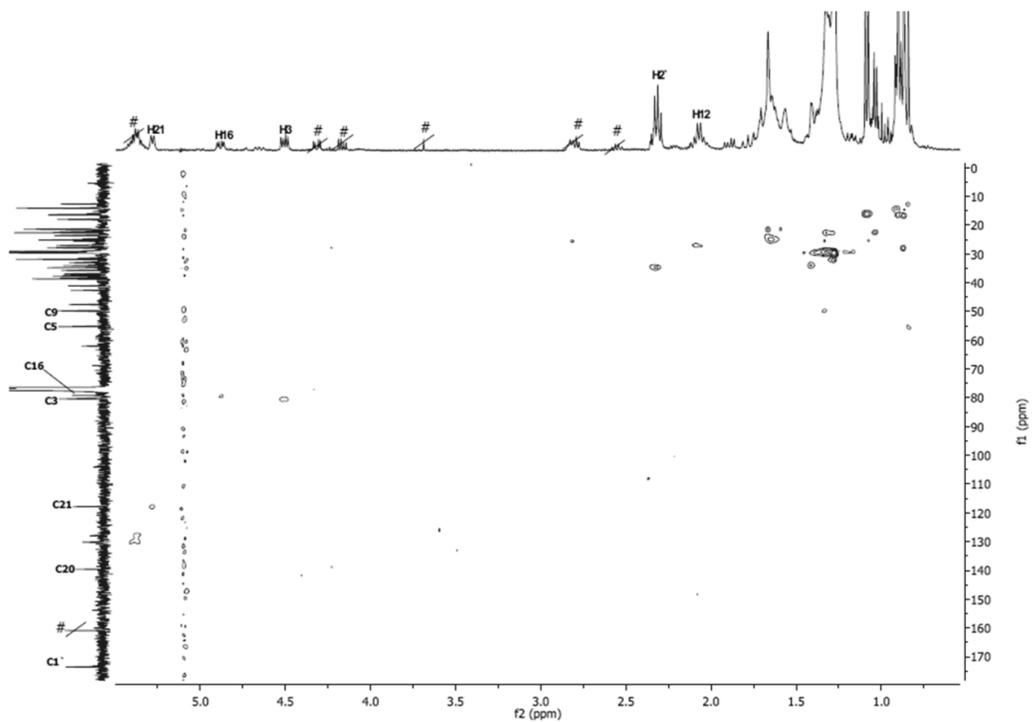


Abb. 21: HSQC-Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

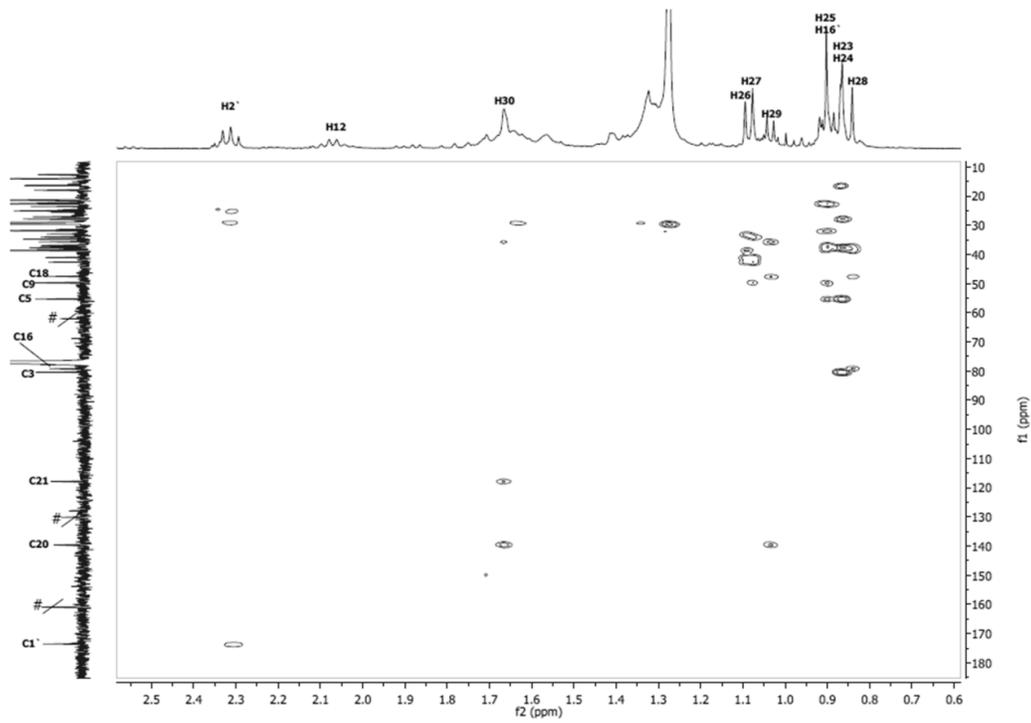


Abb. 22: HMBC-Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

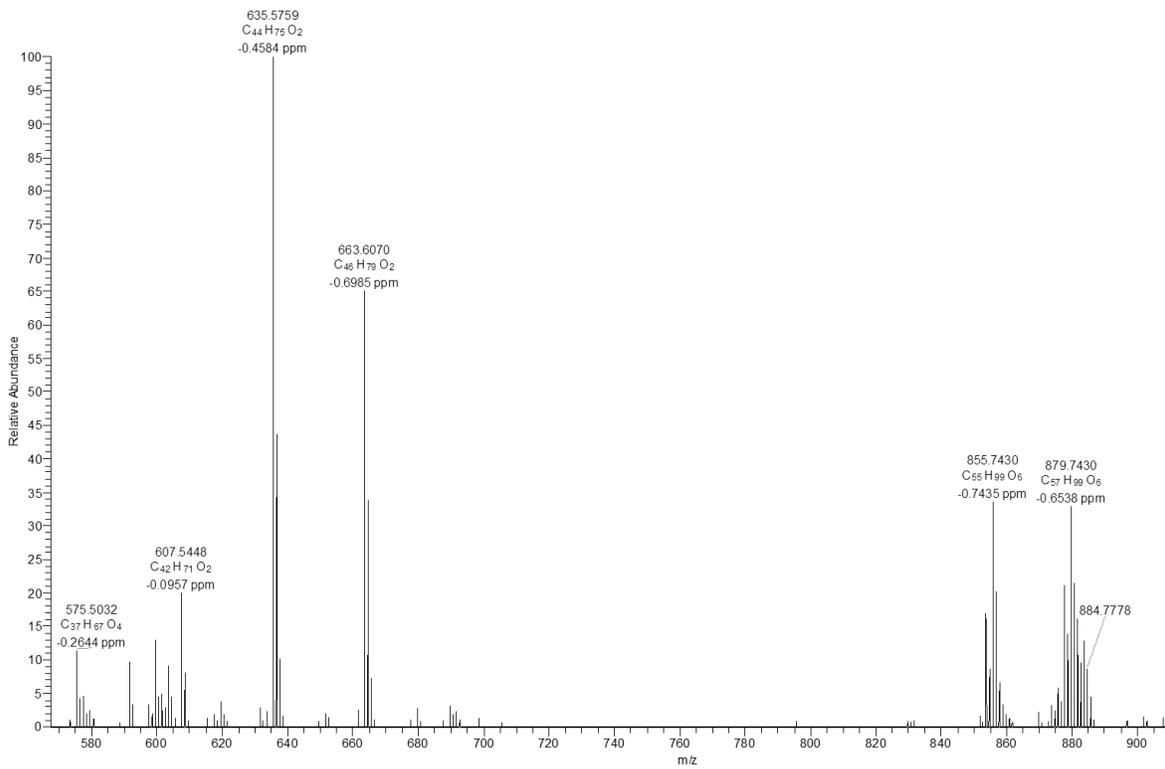


Abb. 23: HR-+APCI-Massenspektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4.

### 3.1.3 Dammarendiol II 3-myristat (**5a**) und -palmitat (**5b**)

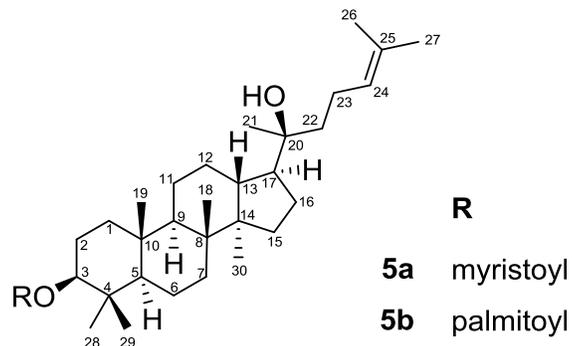


Abb. 24: Struktur der Verbindungen **5a+b**.

Die Verbindungen **5a+b** wurden nach SC-Trennung der Fraktion TFa.11.2 in einer Ausbeute von 7,8 mg (TFa.11.2.5) isoliert. Die DC-Analytik mit FM 1 ergab eine violette Bande mit höherem  $R_f$ -Wert von 0,86 als Faradiol 3-myristat.

Nach basischer Hydrolyse wies das Gaschromatogramm ein Signal bei  $R_t = 25,409$  min auf. Das dazu gehörige EI-Massenspektrum (Abb. 25) zeigte einen Peak bei  $m/z$  426, der aus der Abspaltung von  $H_2O$   $[M-H_2O]^+$  resultieren sollte. Ein Molpeak trat wegen der großen Instabilität des Triterpens nicht auf. Die übrigen Signale sowie der Basispeak bei  $m/z$  109 gaben einen Hinweis auf das tetrazyklische Triterpen Dammarendiol II (Assimopoulou and Papageorgiou, 2005; van der Doelen et al., 1998). Abb. 26 zeigt ein mögliches EI-Fragmentierungsschema dieses tetrazyklischen Triterpens. Im HR-+APCI-Massenspektrum des nicht hydrolysierten Gemisches (siehe Abb. 27) traten Signale bei  $m/z$  637,5922 und  $m/z$  665,6235 auf, die mit einer Abspaltung von  $H_2O$   $[M-H_2O]^+$  und dem Vorliegen eines Myristinsäure- bzw. Palmitinsäureesters in Einklang zu bringen sind. Entsprechend trat nach weiterer Fragmentierung dieser Fettsäuren nur ein Basispeak bei  $m/z$  409 auf. Das Fehlen eines Molpeaks bei Dammarendiol II 3-myristat und -palmitat bei Verwendung der EI-MS-Methode ist auch bei (Ukiya et al., 2001) beschrieben.

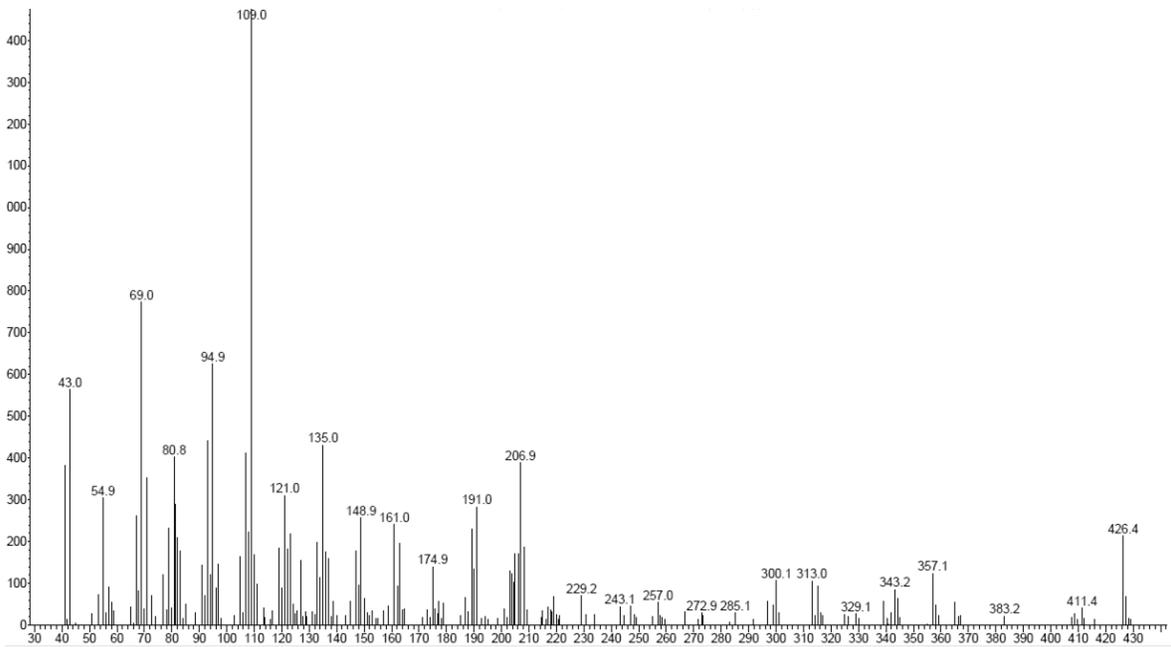


Abb. 25: EI-Massenspektrum der Verbindungen 5a+b nach basischer Hydrolyse.

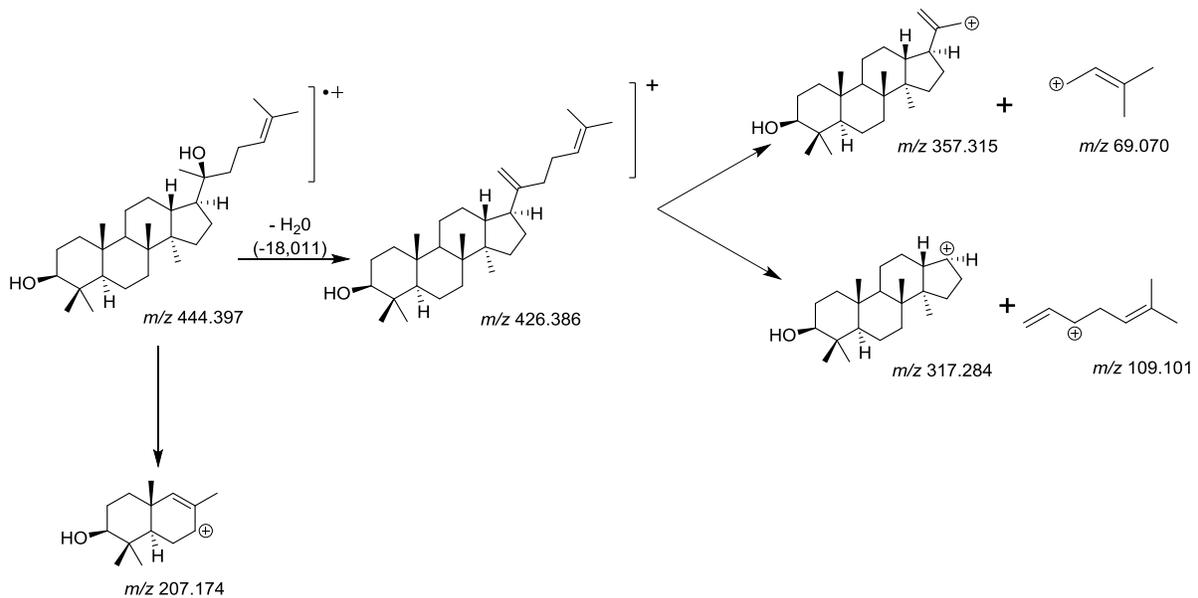


Abb. 26: EI-MS-Fragmentierungsschema von Dammarendiol II (nach (Assimopoulou and Papageorgiou, 2005)).

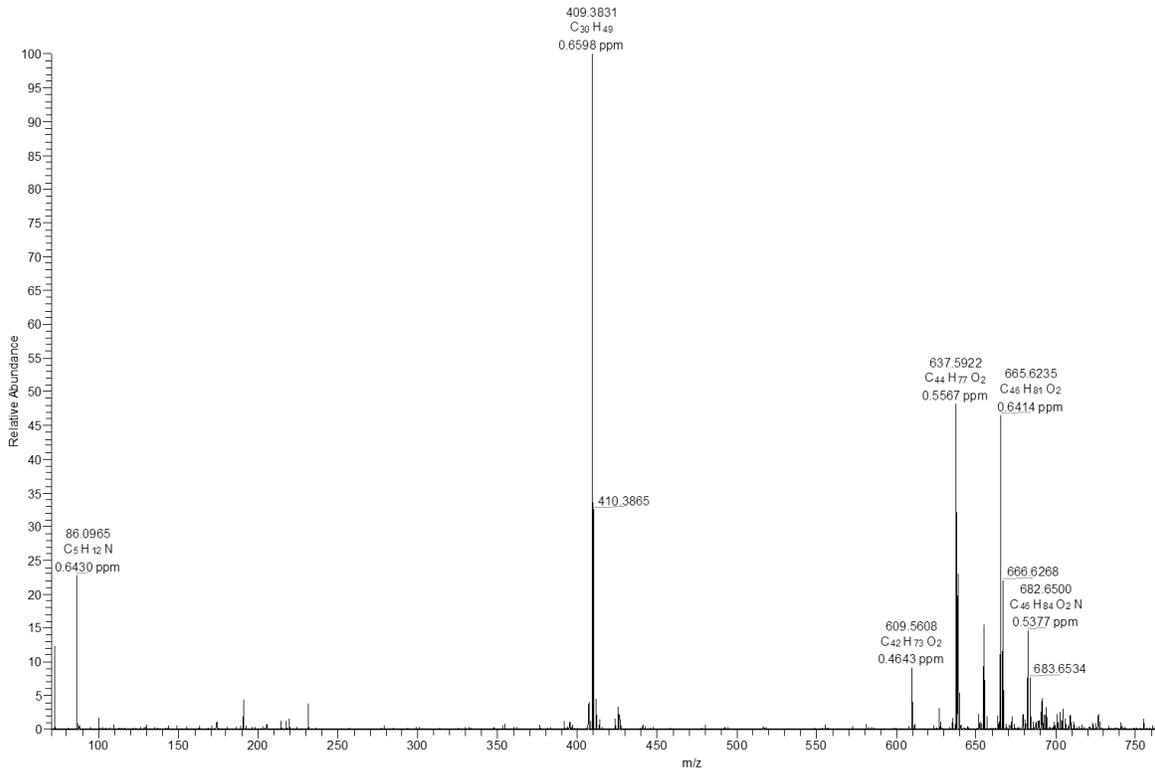


Abb. 27: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 5a+b.

Zur weiteren Bestätigung dieser Struktur wurden 1D- und 2D-NMR-Untersuchungen durchgeführt. Die 30  $^{13}\text{C}$ -Signale sowie die  $^1\text{H}$ -Signale (siehe Tab. 2), die für ein Triterpendiol mit einer Doppelbindung sprachen, unterschieden sich von denen eines pentazyklischen Triterpendiols und stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten für Dammarendiol II ((20S)-Dammar-24-en-38,20-diol) überein (Fuchino et al., 1995; Ukiya et al., 2001). Die  $^{13}\text{C}$ -Signale für C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  124,7) und C-25 ( $\delta_{\text{C}}$  131,5), die im HMBC-Spektrum (Abb. 32) mit H-26 ( $\delta_{\text{H}}$  1,62) und H-27 ( $\delta_{\text{H}}$  1,68) koppelten und die Kopplung im  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Abb. 30) des olefinischen Protons H-24 ( $\delta_{\text{H}}$  5,11) mit H-23 ( $\delta_{\text{H}}$  2,04) bestätigten den Isoprenylrest der Seitenkette. Die Seitenkette war hydroxyliert, wobei die OH-Gruppe an einem quartären C-Atom in Nachbarschaft zu einer Methylgruppe lokalisiert sein musste, da im HMBC-Spektrum eine Kopplung von C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  75,2) mit H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  1,13) zu beobachten war, das Signal für C-20 aber keine Kopplung im HSQC-Spektrum (Abb. 31) aufwies. Das Vorliegen einer veresterten OH-Gruppe an C-3 wurde durch die im  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Spektrum (Abb. 29 und Abb. 28) auftretenden Signale bei  $\delta_{\text{C}}$  80,5 (C-3)

und  $\delta_H$  4,47 (H-3) sowie deren 2D-NMR-Kopplungen bestätigt. Die übrigen Signale konnten den Acylresten zugeordnet werden. Dammarendiol II 3-monoester mit langkettigen Fettsäuren als Esterkomponente (siehe Abb. 24), die bereits aus *Chrysanthemum morifolium* isoliert worden sind (Ukiya et al., 2001), wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals aus *Calendula*-Blüten isoliert. Vom Dammaran-Typ wurde mittels GC-MS-Analyse in *Calendula*-Blüten bisher nur das nicht veresterte Dammara-20,24-dien 3 $\beta$ -ol nachgewiesen (Akihisa et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden die  $^1H$ -NMR-Werte von Dammarendiol II 3-myristat und -palmitat vervollständigt.

**Tab. 2:**  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Werte der Verbindungen 5a+b ( $CDCl_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}C$ -Werte zu Dammarendiol II (nach (Fuchino et al., 1995)) sowie  $^1H$ -NMR-Werte von Dammarendiol II-3-palmitat (nach (Ukiya et al., 2001)).

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
1	38,6	39,0	1,05 m	
			1,68 m	
2	24,7	27,4	1,53 – 1,67 m	
3	80,5	79,0	4,47 dd (10.4, 6.0)	4,48 dd (10.4, 5.5)
4	37,9	39,0		
5	55,9	55,8	0,82 m	
6	18,1	18,3	1,40 – 1,50 m	
7	35,1	35,2	1,27 m	
			1,53 m	
8	40,3	40,3		
9	50,5	50,6	1,32 m	
10	37,0	37,1		
11	21,5	21,5	1,48 m	
12	25,3	27,5	1,62 m	
13	42,1	42,3	1,62 m	
14	50,2	50,3		
15	31,1	31,2	1,06 m	
			1,44 m	
16	24,7	24,8	1,62 m	

Fortsetzung Tab. 2.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
17	49,7	49,8	1,74 m	
18	16,4	16,2	0,86 s	
19	15,4	15,5	0,95 s	
20	75,2	75,4		
21	25,1	25,4	1,13 s	1,14 s
22	40,5	40,5	1,47 m	
23	22,6	22,5	2,04 m	
24	124,7	124,7	5,11 brt (7.2)	5,12 tt (7.1, 2.0)
25	131,5	131,6		
26	17,7	17,7	1,62 brs	1,63 s
27	25,7	25,7	1,68 brs	1,69 s
28	27,9	28,0	0,84 s	0,87 s
29	16,5	15,3	0,84 s	0,88 s
30	16,2	16,4	0,86 s	0,96 s
Acyl				
1`	173,6			
2`	34,8		2,33 t (7.2)	
3`	25,1		1,33 m	
4` - 13` (4` - 11`)*	29,1 – 29,7		1,27 m	
14` (12`)*	31,9		1,29 m	
15` (13`)*	22,6		1,30 m	
16` (14`)*	14,1		0,90 t (7.2)	

in Klammern C-Atome für Myristoyl-Rest

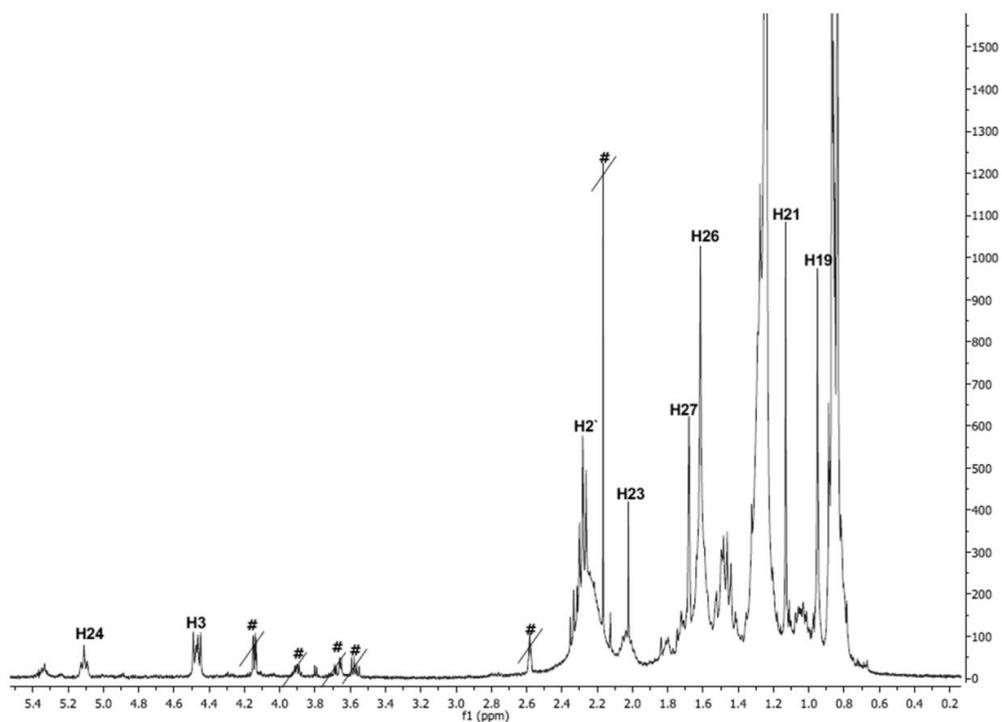


Abb. 28:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

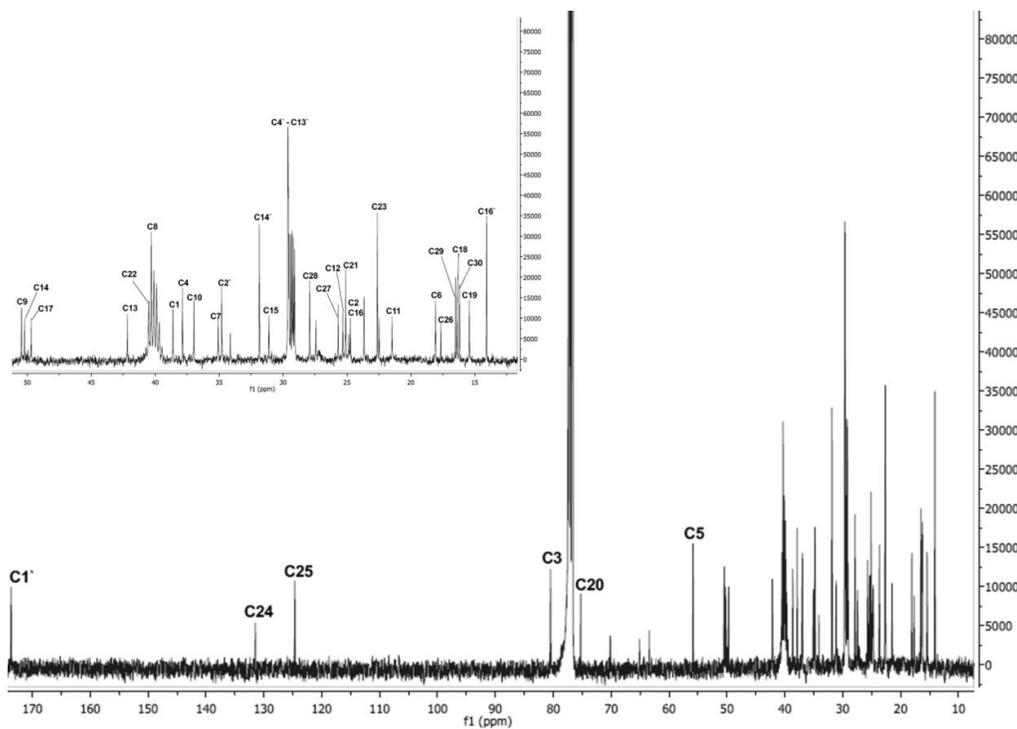


Abb. 29:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

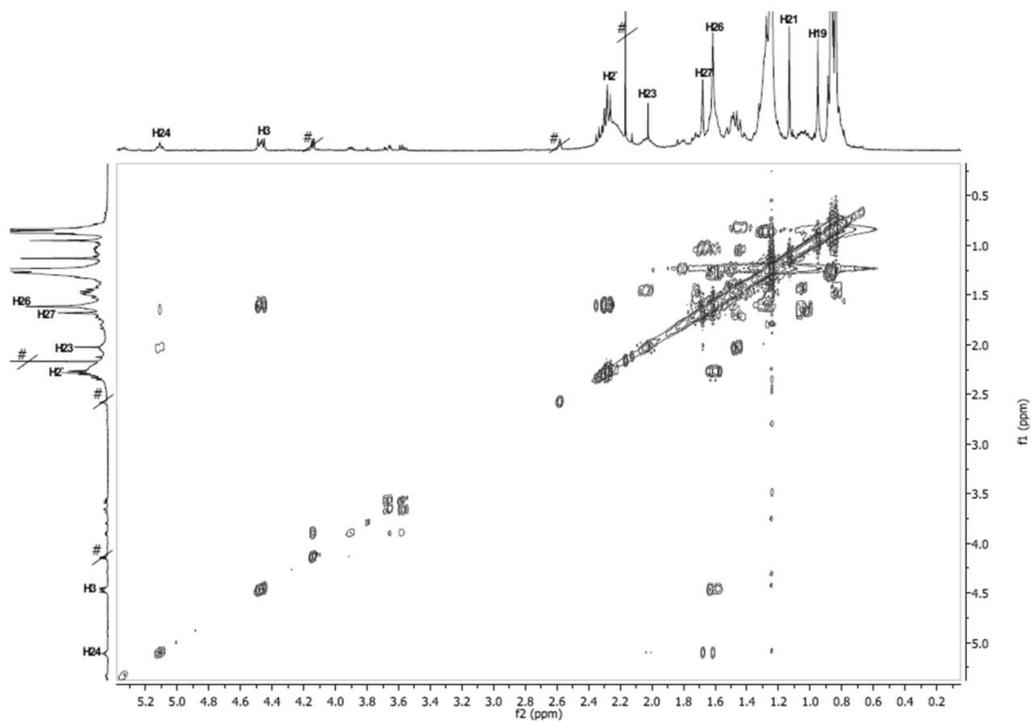


Abb. 30:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

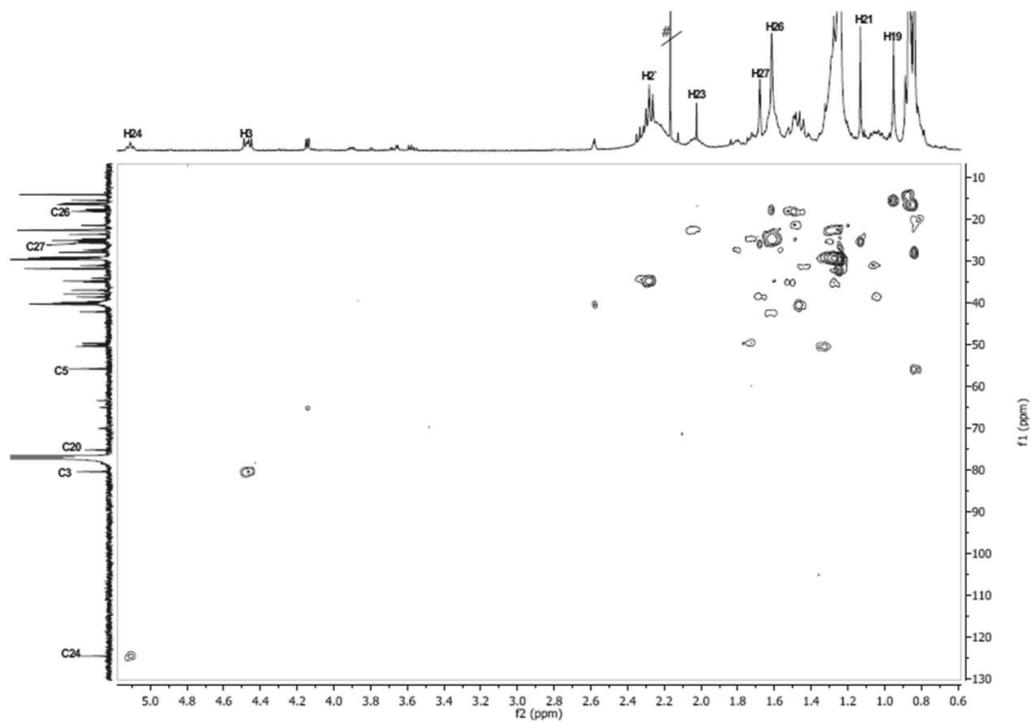


Abb. 31: HSQC-Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

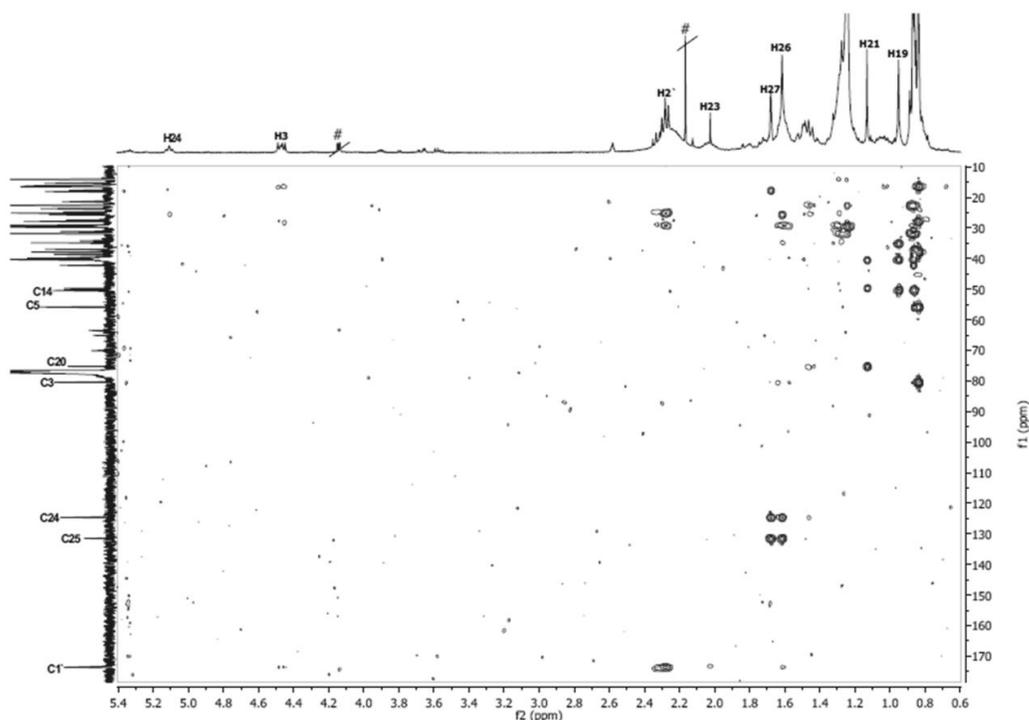


Abb. 32: HMBC-Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

### 3.1.4 Arnitriol A 3-myristat (6a) und -palmitat (6b)

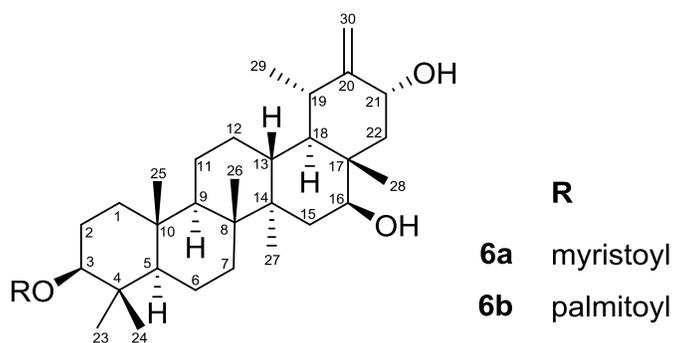


Abb. 33: Struktur der Verbindungen 6a+b.

Nach der SC-Auftrennung der Fraktion TFb.10 wurden in der Fraktion TFb.10.5 die Verbindungen **6a+b** angereichert. Nach Durchführung einer analytischen DC mit FM 1 erschien die Fraktion als violette Bande nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure mit einem deutlich niedrigeren R<sub>F</sub>-Wert von 0,14 als Faradiol 3-myristat.

Das HR-+APCI-Spektrum (Abb. 34) zeigte Signale bei  $m/z$  651,5712 und  $m/z$  679,6025, die analog wie bei den vorherigen Triterpenen nach Abspaltung von  $H_2O$  entstanden sein dürften und dem Fragment  $[M+H-H_2O]^+$  entsprechen. Das bei  $m/z$  441,3727 auftretende Signal lässt sich durch Abspaltung von Myristin- bzw. Palmitinsäure aus diesen beiden Fragmenten erklären. Die Abspaltung zweier Moleküle  $H_2O$  aus diesem Bruchstück führte zur Bildung der bei  $m/z$  423,3622  $[M+H-FS-H_2O]^+$  und  $m/z$  405,3517  $[M+H-FS-2H_2O]^+$  auftretenden Signale, was im Einklang mit zwei freien OH-Gruppen und einer veresterten OH-Gruppe, also von Triterpentriolen, steht.

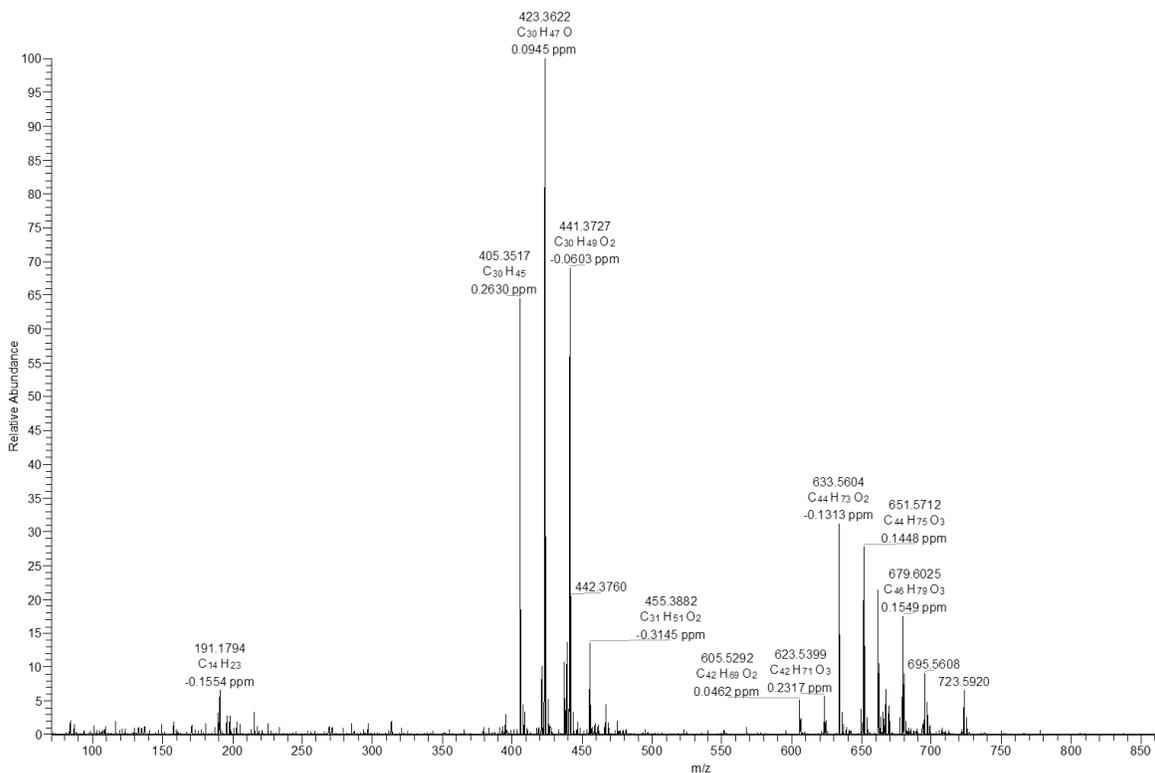


Abb. 34: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 6a+b.

Im  $^{13}C$ -Spektrum (Abb. 36) sind 30 Signale im Hoch- und Tieffeld erkennbar, die zu einem pentazyklischen Triterpen mit einer Doppelbindung und 3 Oxymethingruppen gehörten. Die ermittelten  $^1H$ - und  $^{13}C$ -Werte (siehe Tab. 3) stimmten mit denen für Arnitriol A (20(30)-Taraxasten-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20 $\alpha$ -triol) 3-monoestern in der Literatur angegebenen Werten überein (Schmidt et al., 2004). Die Signale bei  $\delta_C$  155,6 (C-20) und  $\delta_C$  113,6 (C-30), das im HSQC-Spektrum (Abb. 38)

mit 2 Singulettts  $\delta_{\text{H}}$  4,93 (H-30a) und  $\delta_{\text{H}}$  5,03 (H-30b) koppelte, sprachen für das Vorhandensein einer Exomethylengruppe. Diese ist für Triterpene des 20(30)-Taraxasten-Typs typisch. Die Signale der sauerstoffs substituierten  $\text{sp}^3$ -Kohlenstoffe lagen bei  $\delta_{\text{C}}$  80,5 (C-3),  $\delta_{\text{C}}$  76,6 (C-16) und  $\delta_{\text{C}}$  70,7 (C-21). Die Zuordnung der entsprechenden Protonen erfolgte durch das HSQC-Spektrum. Die Tieffeldverschiebung von H-3 bei  $\delta_{\text{H}}$  4,50 war durch die Estergruppe an C-3 begründet. Die Fernkopplung von H-3 mit C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  173,67) bestätigte die Position der Estergruppe an C-3. Das Vorliegen einer freien OH-Gruppe an C-16 wurde durch die chemische Verschiebung des Protons an C-16 bei  $\delta_{\text{H}}$  3,47 bestätigt. Die Tieffeldverschiebung von H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  4,44) wies darauf hin, dass die OH-Gruppe direkt in Nachbarschaft zur Exomethylengruppe gebunden ist (siehe Abb. 35). Die Position der OH-Gruppe an C-21 wurde weiterhin durch die HMBC-Kopplungen (siehe Abb. 39) von C-21 mit H-30a und H-30b sowie die Kopplungen von H-21 mit H-22a ( $\delta_{\text{H}}$  1,35) und H-22b ( $\delta_{\text{H}}$  2,45) im  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Abb. 37) bestätigt. Die kleineren Kopplungskonstanten für H-21 ( $J_{21,22a}$  9 Hz und  $J_{21,22b}$  5 Hz) im Vergleich zu H-3 und H-16 bestätigten die  $\alpha$ -Orientierung der OH-Gruppe an C-21. Die übrigen  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Signale ließen sich den Acylgruppen zuordnen. Die Arnitriol A 3-monoester (Abb. 33) sind bekannte Naturstoffe, die bereits aus *Arnica lonchophylla* (Schmidt et al., 2004) isoliert wurden, aber hier erstmals in *Calendula*-Blüten identifiziert wurden.

**Tab. 3:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindungen 6a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Werte zu Arnitriol A 3-palmitat (nach (Schmidt et al., 2004)).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ [Lit]	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) [Lit.]
1	38,4	38,5	1,04 m	1,02
			1,73 m	1,72
2	23,6	23,7	1,60 m	1,64
3	80,5	80,5	4,50 dd (11.2, 4.8)	4,48 dd (11, 5)
4	37,6	37,9		
5	55,4	55,4	0,82 brd (8.8)	0,80 brd (11)
6	18,1	18,2	1,40 m	1,39
			1,55 m	1,53
7	33,9	34,0	1,42 m	1,40

Fortsetzung Tab. 3.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
8	40,9	41,0		
9	49,8	49,8	1,35 m	1,34
10	36,9	37,0		
11	21,3	21,3	1,58 m	1,56
12	25,1	25,9	1,32 m	1,13 dq (13; 4)
			1,68 m	1,69
13	38,4	38,4	1,60 m	1,59
14	42,4	42,4		
15	35,9	36,0	1,27 m	1,27
			1,59 m	1,58
16	76,6	76,6	3,47 dd (11.6, 4.4)	3,45 dd (11, 4)
17	39,4	39,5		
18	47,2	42,3	1,21 m	1,20
19	37,8	37,7	2,24 dq (6.8, 6.8)	2,23 dq (7, 7)
20	155,6	155,7		
21	70,7	70,7	4,44 dd (8.8, 4.8)	4,42 dd (9, 5)
22	44,6	44,6	1,35 m	1,32
			2,45 m	2,45 dd (14, 9)
23	27,9	28,0	0,86 s	0,85 s
24	16,5	16,6	0,86 s	0,85 s
25	15,8	15,9	0,89 s	1,02 s
26	16,3	16,4	1,04 s	1,01 s
27	16,3	16,3	1,02 s	0,88 s
28	11,7	11,8	0,78 s	0,76 s
29	28,2	28,3	1,24 d (6.8)	1,23 d (7)
30	113,6	113,7	4,93 s	4,91 s
			5,03 s	5,00 s
Acyl				
1`	173,6			
2`	34,8		2,31 t (7.2)	
3`	25,9		1,34 m	
4` - 13` (4` - 11`)*	29,1 – 29,7		1,27 m	
14` (12`)*	31,9		1,30 m	
15` (13`)*	22,7		1,31 m	
16` (14`)*	14,1		0,90 t (7.2)	

in Klammern C-Atome für Myristoyl-Rest

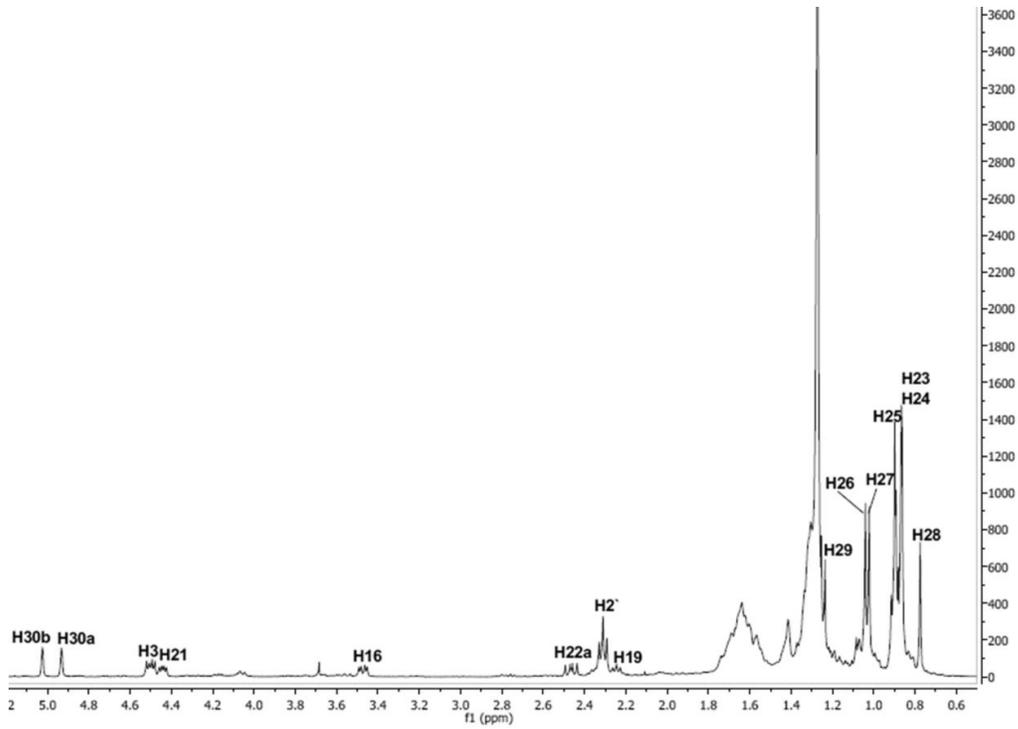


Abb. 35:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

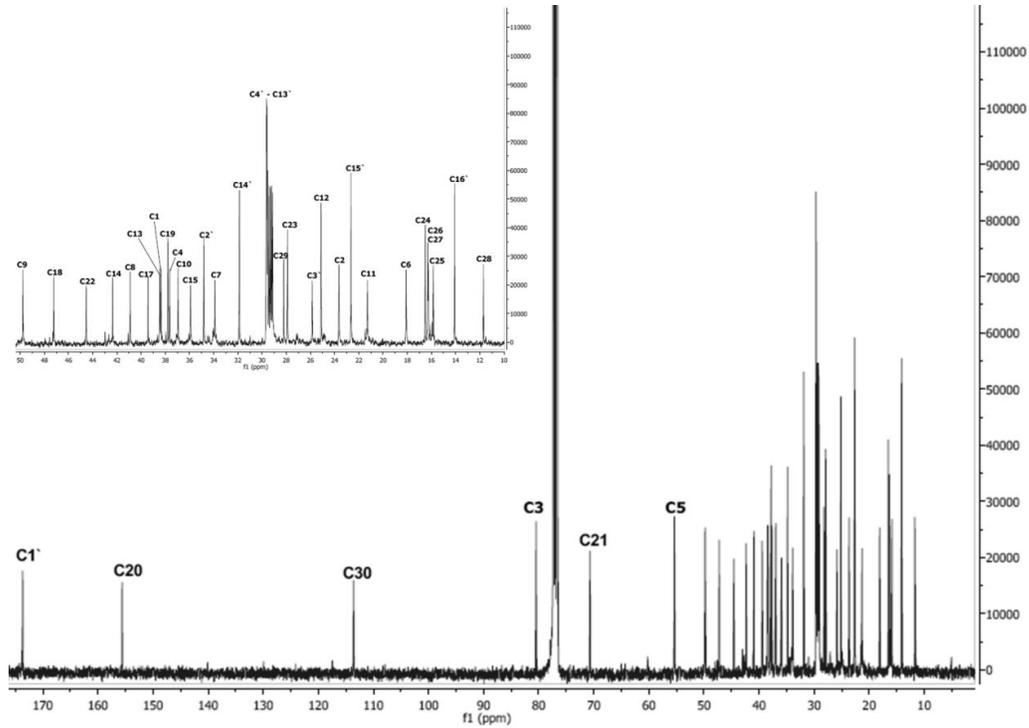


Abb. 36:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

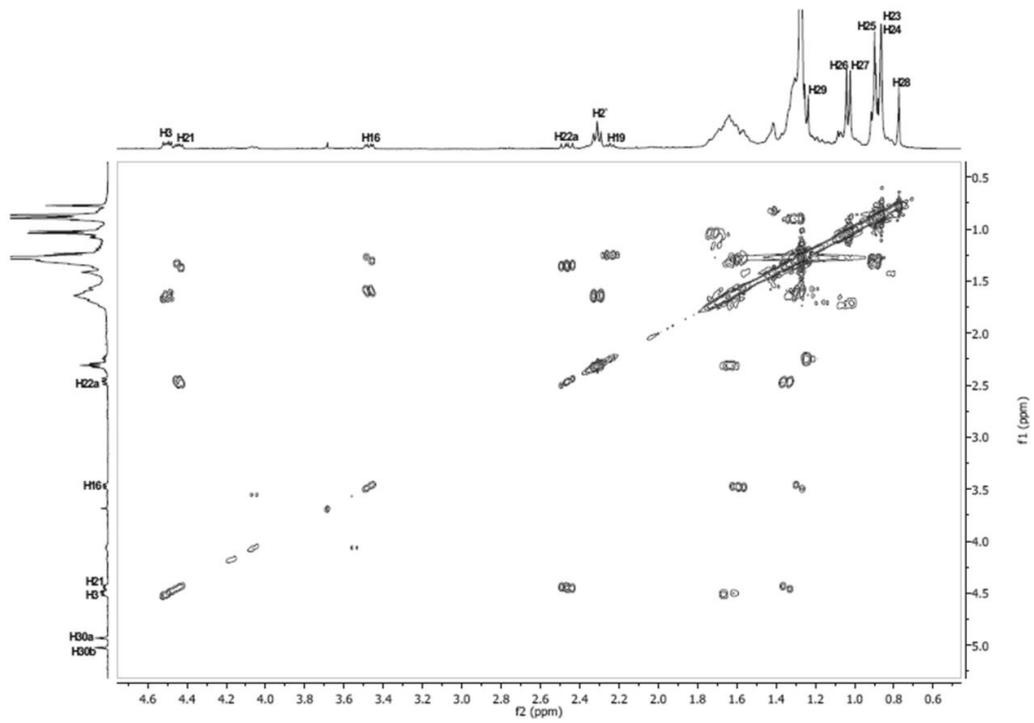


Abb. 37:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

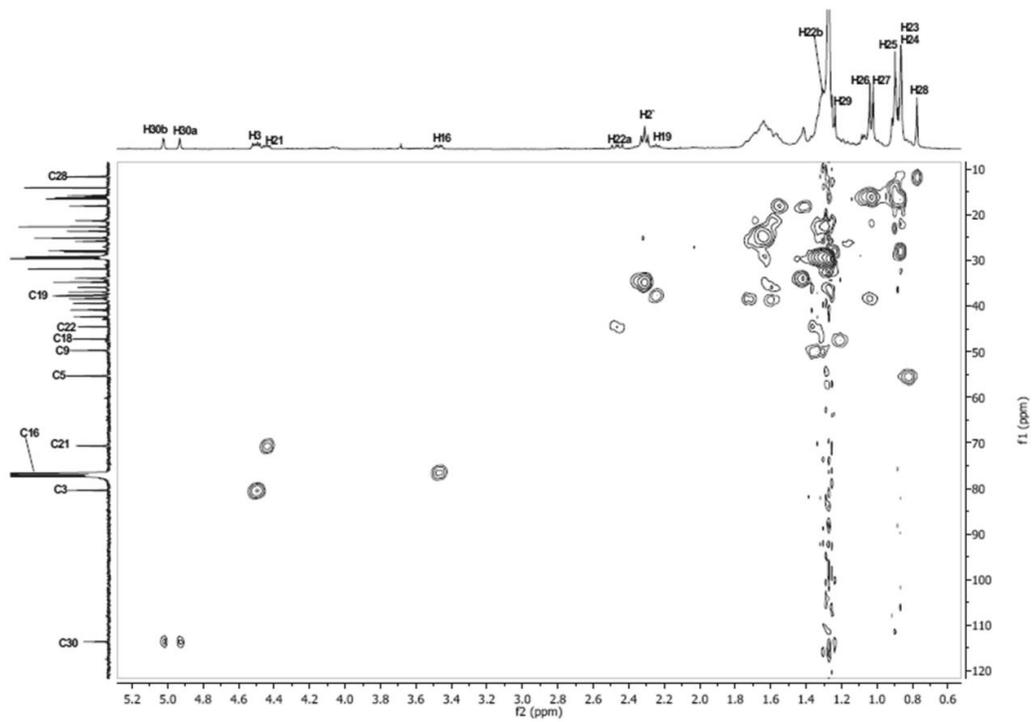


Abb. 38: HSQC-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

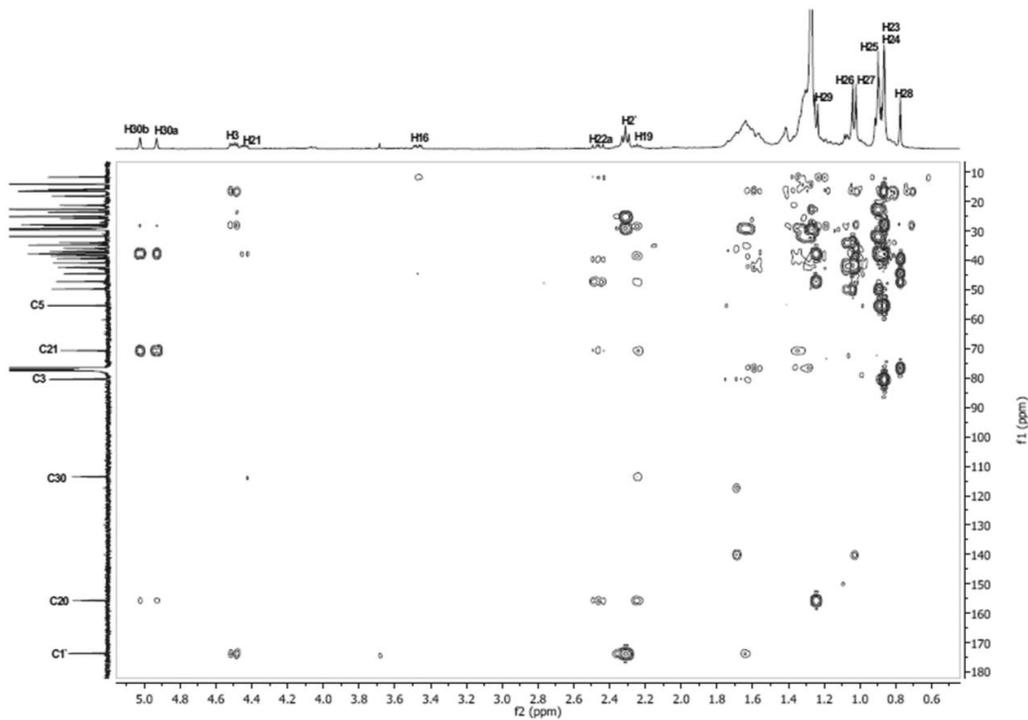


Abb. 39: HMBC-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

### 3.1.5 Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-myristat (7a) und -palmitat (7b)

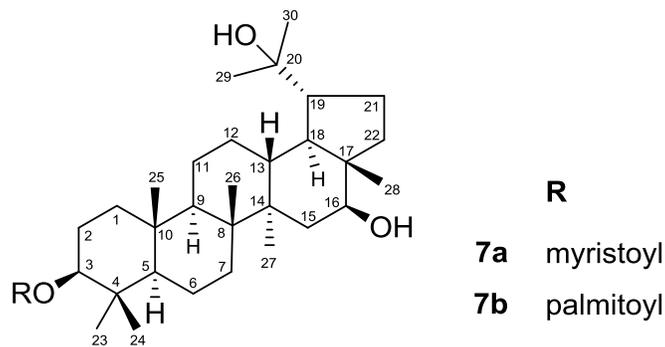


Abb. 40: Struktur der Verbindungen 7a+b.

Nach der SC-Auftrennung der Fraktion TFb.11 wurden die Verbindungen **7a+b** in der Fraktion TFb.11.3 zu 3,7 mg isoliert. Der R<sub>F</sub>-Wert von 0,11 der violetten Bande nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure nach analytischer DC, das mit FM 1 entwickelt wurde, lag etwa auf Höhe der Verbindungen **6a+b** und ließ vermuten, dass es sich bei den Verbindungen **7a+b** um Triterpentriolmonoester handeln könnte.

Das HR-+APCI-Spektrum (Abb. 41 und Abb. 42) zeigte wie bei den vorhergehenden Verbindungen keinen Molpeak, sondern Fragmentionen bei  $m/z$  653,5870 und  $m/z$  681,6183, die dem Fragment  $[M+H-H_2O]^+$  entsprachen. Aus diesen Fragmentionen kam es jeweils zur Abspaltung eines weiteren Moleküls  $H_2O$ , wodurch die Signale bei  $m/z$  663,6075 und 635,5763 entstanden. Nach Abspaltung von Myristin- bzw. Palmitinsäure trat analog wie bei den Verbindungen **6a+b** das beiden gemeinsame Fragmention bei  $m/z$  443,4885  $[M+H-FS]^+$  auf. Dieser Wert war um 2 Masseinheiten größer, was auf ein gesättigtes pentazyklisches Triterpentriol hindeutete.

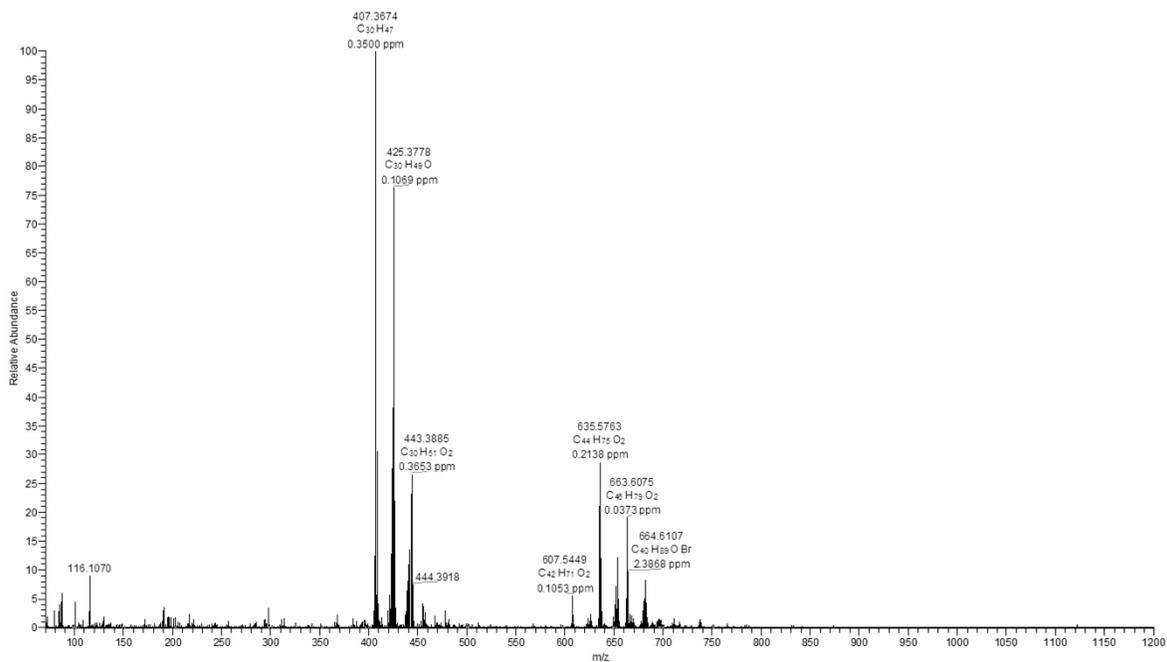


Abb. 41: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen **7a+b**.

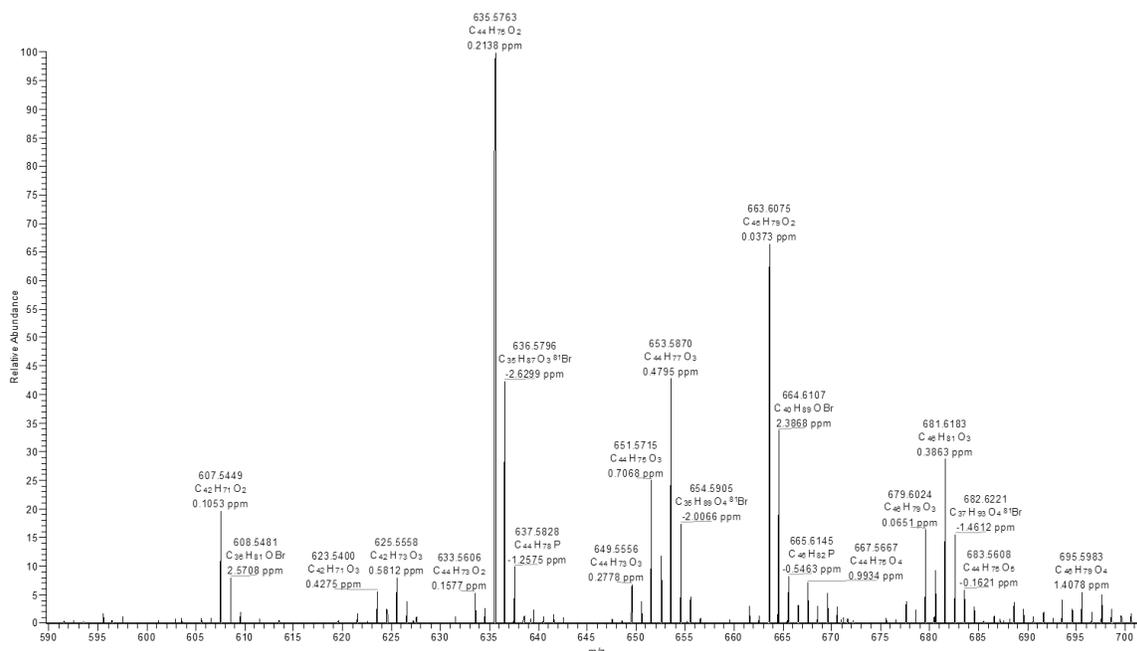


Abb. 42: HR-+APCI-Massenspektrum (Ausschnitt) der Verbindungen 7a+b.

30 Signale im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Abb. 44), das Fehlen von charakteristischen Signalen zwischen 100 und 160 ppm sowie 3 Signale für sauerstoffsubstituierte C-Atome bei  $\delta_{\text{C}}$  80,5 (C-3),  $\delta_{\text{C}}$  77,2 (C-16) und  $\delta_{\text{C}}$  73,5 (C-20) bestätigten die Annahme eines Triterpentriols ohne Doppelbindung. Es traten weiterhin im  $^1\text{H}$ -Spektrum (Abb. 43) 8 Singulettts auf, die Methylgruppen zuzuordnen waren. Hiervon lagen 2 Signale im vergleichsweise tieferen Feld ( $\delta_{\text{H}}$  1,25 und  $\delta_{\text{H}}$  1,14). Gleiches galt für die chemischen Verschiebungen der dazugehörigen C-Atome ( $\delta_{\text{C}}$  31,5 und  $\delta_{\text{C}}$  25,1). Dieses lässt sich nur in Einklang bringen, wenn in Nachbarschaft eine tertiäre Hydroxylgruppe vorliegt. Entsprechend traten im HMBC-Spektrum (Abb. 47) Kopplungen von C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  73,5) mit H-29 ( $\delta_{\text{H}}$  1,25) und H-30 ( $\delta_{\text{H}}$  1,14) auf. Die 30  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Daten (siehe Tab. 4) stimmten insgesamt mit denen für Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-monoester überein (Schmidt et al., 2004). Die Position der 2 Oxymethingruppen an C-3 und C-16, sowie die Veresterung an C-3 wurden, wie bei den Verbindungen 6a+b, durch die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale und die 2D-NMR-Kopplungen (siehe Abb. 45 und Abb. 46) bestätigt. Die übrigen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale waren langkettigen Acylresten zuzuordnen, bei denen es sich nach der MS-Analyse um Myristin- bzw. Palmitinsäure handelte. Diese Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-monoester (siehe Abb. 40)

wurden bereits aus *Arnica lonchophylla* (Schmidt et al., 2004) isoliert. Sie konnten hier erstmals in *Calendula*-Blüten nachgewiesen werden.

**Tab. 4:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Werte der Verbindungen 7a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Werte zu Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-monoestern (nach (Schmidt et al., 2004)).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ [Lit.]	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) [Lit.]
1	38,3	38,4	1,02 m 1,70 m	
2	23,6	23,7	1,60 – 1,68 m	1,62
3	80,5	80,6	4,49 dd (10.0, 6.4)	4,48 dd (11, 6)
4	37,8	37,8		
5	55,2	55,3	0,81 brd (11.6)	0,79 dd (11, 2)
6	18,1	18,2	1,44 m 1,55 m	1,42
7	34,4	34,5	1,44 m	1,40
8	41,4	41,5		
9	49,8	49,9	1,28 m	
10	37,0	37,0		
11	21,3	21,4	1,28 m	
12	28,8	28,9	1,30 m	
13	36,3	36,7	1,74 m	1,70
14	44,4	44,5		
15	36,9	37,2	1,35 m 1,63 m	1,35 1,60
16	77,2	77,6	3,62 dd (11.2, 5.2)	3,60 dd (11, 5)
17	50,0	50,11		
18	47,4	47,5	1,38 m	1,38
19	49,3	49,4	1,91 m	1,91 m
20	73,5	73,4		
21	28,6	28,6	1,32 m	
22	37,8	37,9	1,62 m	1,65
23	27,9	28,0	0,86 s	0,85 s
24	16,5	16,6	0,86 s	0,84 s
25	16,1	16,5	0,88 s	0,87 s
26	16,2	16,2	1,08 s	1,07 s
27	16,4	16,3	1,02 s	1,01 s
28	13,6	13,7	0,84 s	0,82 s
29	31,5	31,6	1,25 s	1,24 s

Fortsetzung Tab. 4.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
30	25,1	25,0	1,14 s	1,13 s
Acyl				
1`	173,6			
2`	34,8		2,31 t (7.2)	
3`	25,9		1,34 m	
4` - 13` (4` - 11`)*	29,1 – 29,7		1,27 m	
14` (12`)*	31,9		1,30 m	
15` (13`)*	22,7		1,31 m	
16` (14`)*	14,1		0,90 t (7.2)	

in Klammern C-Atome für Myristoyl-Rest

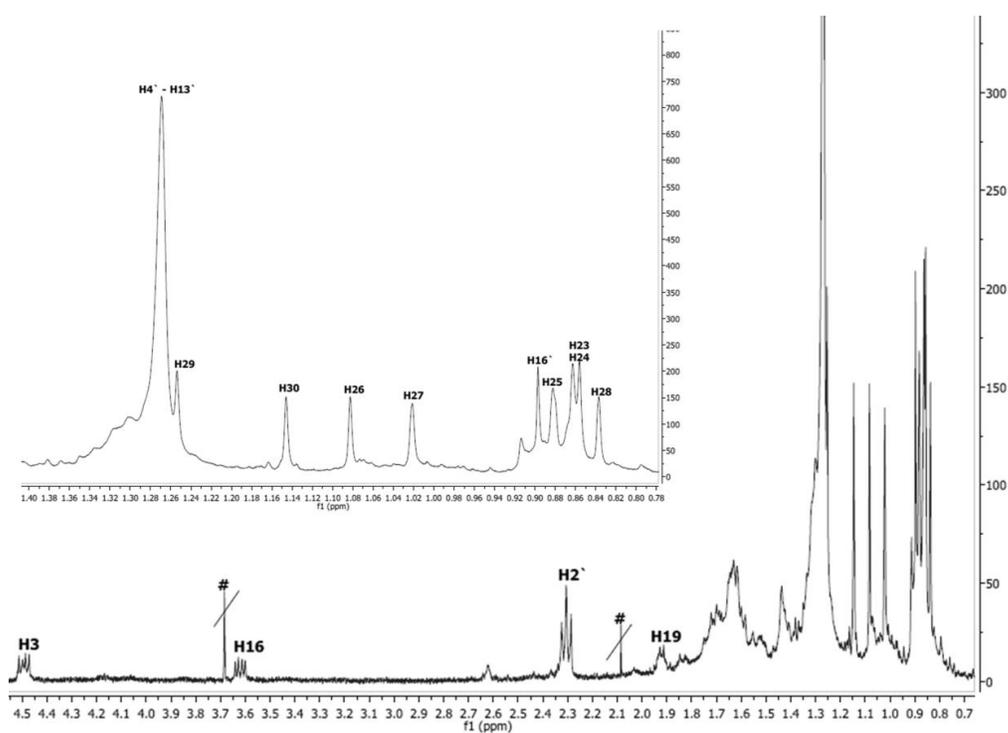


Abb. 43:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

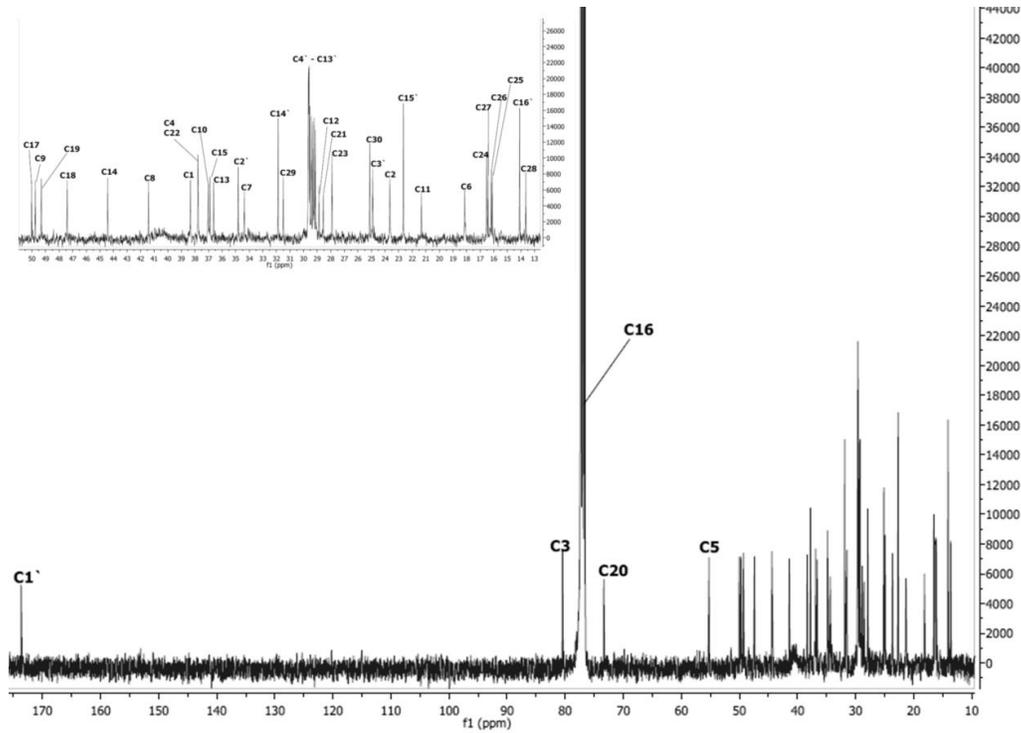


Abb. 44:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

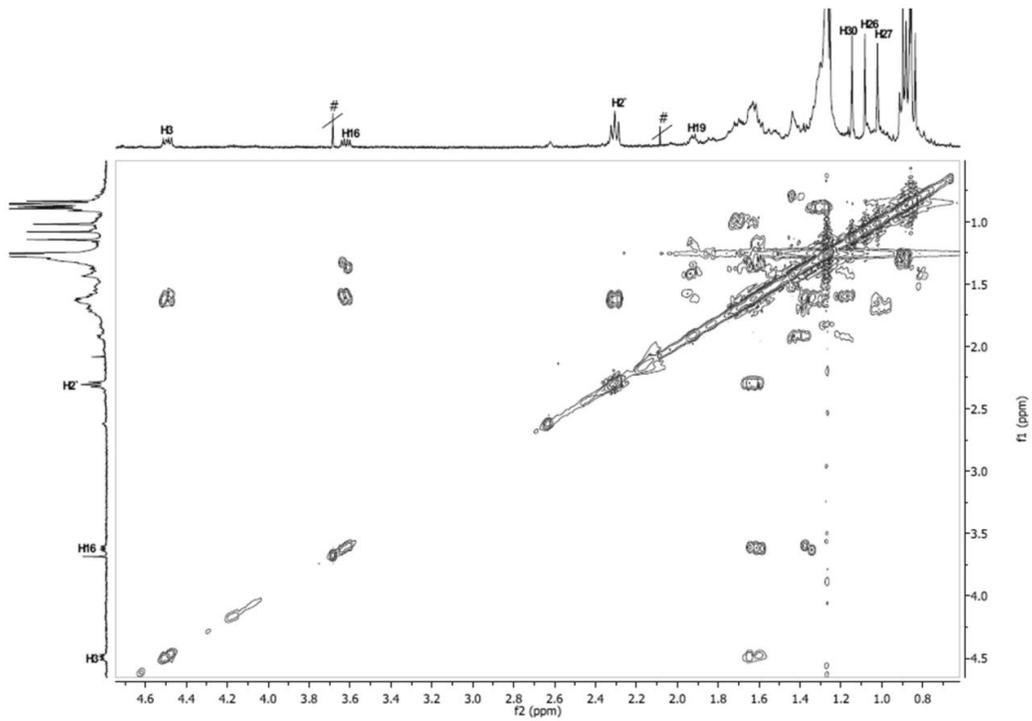


Abb. 45:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

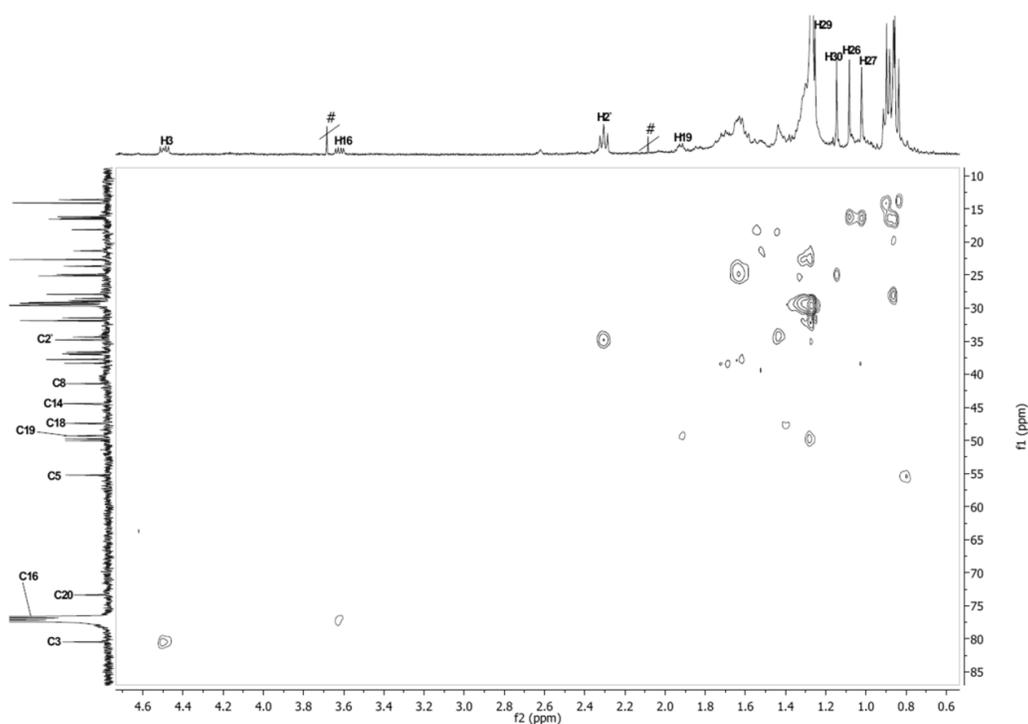


Abb. 46: HSQC-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

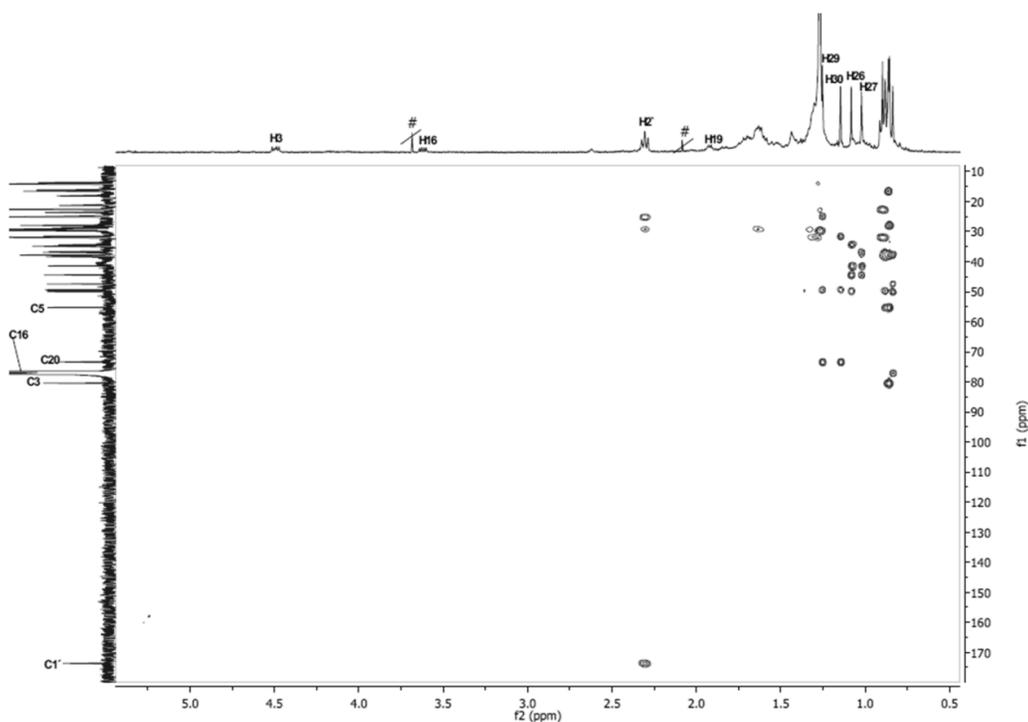
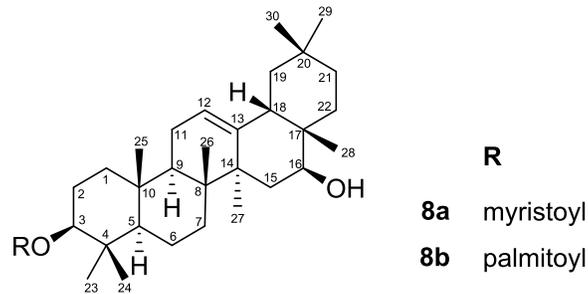


Abb. 47: HMBC-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

### 3.1.6 Maniladiol 3-myristat (8a) und -palmitat (8b)



**Abb. 48: Struktur der Verbindungen 8a+b.**

Nach der SC-Trennung der Fraktion TFa mittels MPLC wurden die Verbindungen **8a+b** in der Fraktion TFa.9 zu 38,9 mg angereichert. Die DC-Untersuchung mit FM 1 dieser Fraktion ließ aufgrund der violetten Färbung der Bande und des ähnlichen  $R_f$ -Werts von 0,87 im Vergleich zum Faradiol 3-myristat auf Triterpendiolmonoester schließen.

Das HR-+APCI-Massenspektrum (Abb. 49) zeigte Signale der  $[M+H-H_2O]^+$ -Ionen des Myristin- und Palmitinsäureesters eines Triterpendiols bei  $m/z$  635,5755 und  $m/z$  663,6066. Weiterhin traten Fragmentionen nach Abspaltung der jeweiligen Fettsäure bei  $m/z$  425,3773 und nach weiterer Abspaltung von  $H_2O$  bei  $m/z$  407,3669 auf. Das Gaschromatogramm nach basischer Hydrolyse der Verbindungen wies ein Signal bei der  $R_t = 27,569$  min auf. Das zugehörige EI-Massenspektrum (Abb. 50) bestätigte durch die Signale bei  $m/z$  442  $[M]^+$ ,  $m/z$  424  $[M-H_2O]^+$  und  $m/z$  406  $[M-2H_2O]^+$  das Vorliegen eines Triterpendiols als Grundkörper. Der Basispeak bei  $m/z$  234 entsprach dem für  $\Delta^{12}$ -Oleanen-Triterpene charakteristischen Retro-Diels-Alder-Fragment. Das Fragmentierungsschema (Abb. 51) stimmte mit dem in der Literatur für Maniladiol angegebenen Daten überein (Pyrek, 1979; von Raison, 1999).

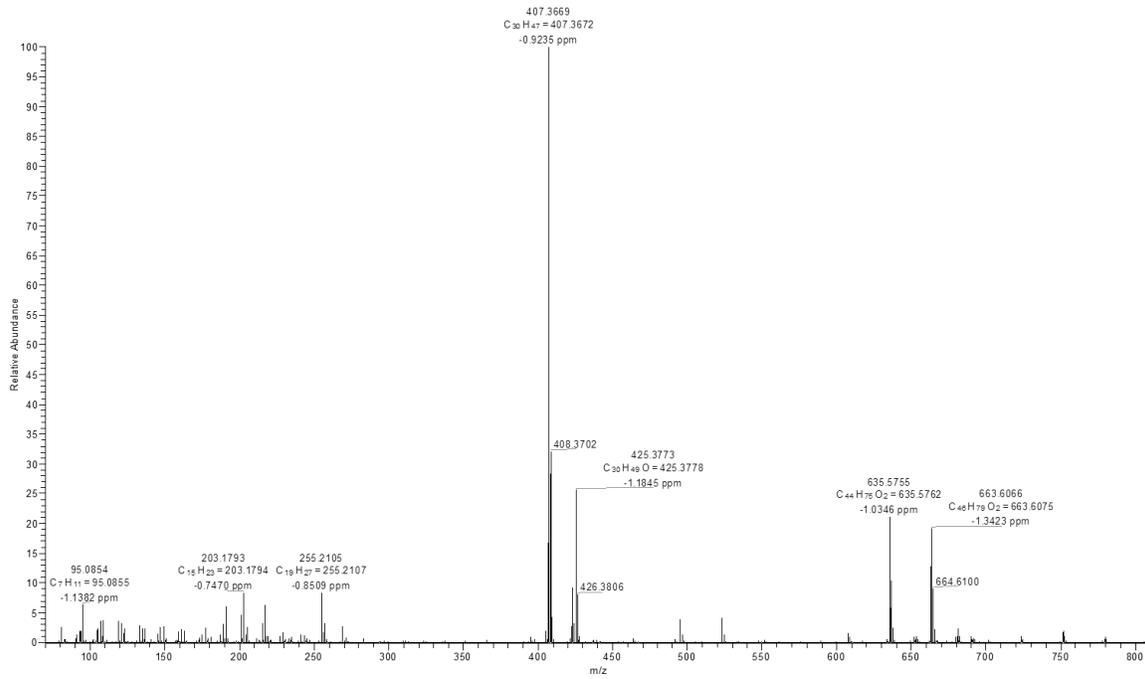


Abb. 49: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 8a+b.

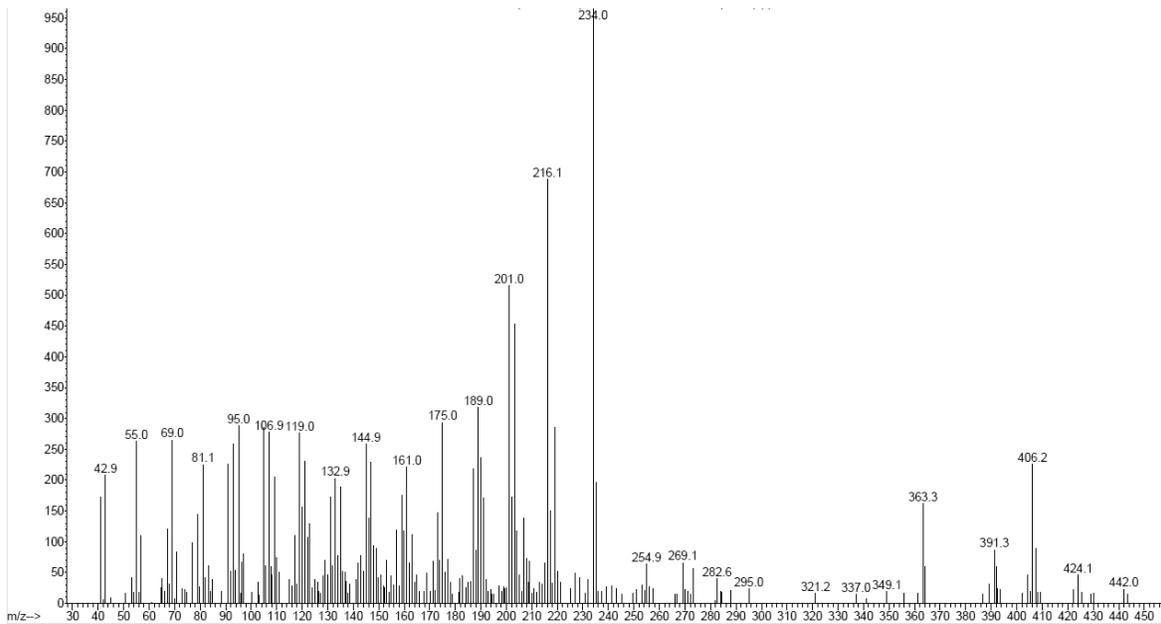


Abb. 50: EI-MS-Massenspektrum der Verbindungen 8a+b nach basischer Hydrolyse.

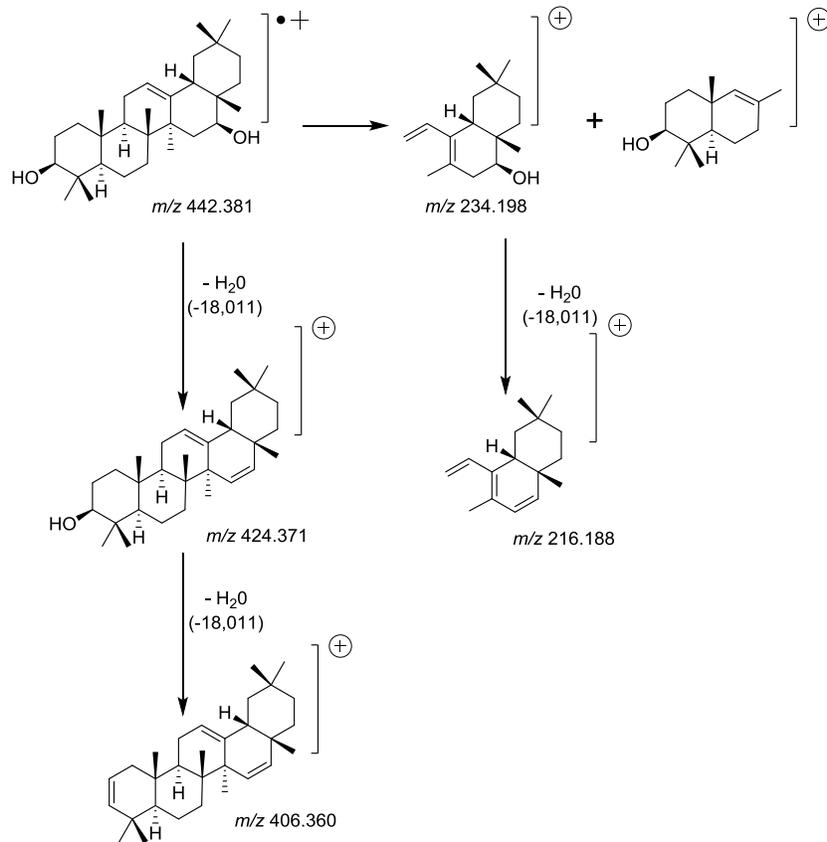


Abb. 51: EI-MS-Fragmentierungsschema von Maniladiol (nach (von Raison, 1999)).

Für eine weitere Bestätigung der Strukturen wurden 1D- und 2D-NMR-Spektren (siehe Abb. 52 bis Abb. 56) der Verbindungen **8a+b** aufgenommen. 30 der im  $^{13}C$ -NMR auftretenden Signale sowie die  $^1H$ -NMR-Daten (siehe Tab. 5) stimmten mit den Literaturangaben für Maniladiol (Olean-12-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diol) überein (Schmidt et al., 2004). Die bei  $\delta_C$  122,2 und  $\delta_C$  143,5 auftretenden Signale für olefinische C-Atome sowie das Ein-Protonen-Triplett bei  $\delta_H$  5,22 (H-12) bestätigten das Vorliegen der  $\Delta$ 12-Doppelbindung (Schmidt et al., 2004). Die Singulets bei  $\delta_H$  0,92 (H-29) und  $\delta_H$  0,93 (H-30) sowie die Kopplungen von C-19 ( $\delta_C$  46,4) mit H-29 und H-30 belegten die für ein pentazyklisches Triterpen vom Oleanen-Typ charakteristische geminale Stellung der 2 Methylgruppen im E-Ring. Die Lage der Oxymethingruppen an C-3 und -16 sowie die Veresterung an C-3 konnten durch die 2D-NMR-Spektren bestätigt werden. Die Tieffeldverschiebung des Signals für H-16 war charakteristisch für das Vorliegen einer OH-Gruppe bei pentazyklischen Triterpenen mit  $\Delta$ 12-Doppelbindung, die sich durch eine Entschirmung aufgrund

der Doppelbindung erklären lässt. Die verbliebenen Signale konnten den langkettigen Acylresten zugeordnet werden. Maniladiol 3-monoester (siehe Abb. 48) sind bereits aus *Calendula*-Blüten isoliert worden (Hamburger et al., 2003; Pyrek, 1979).

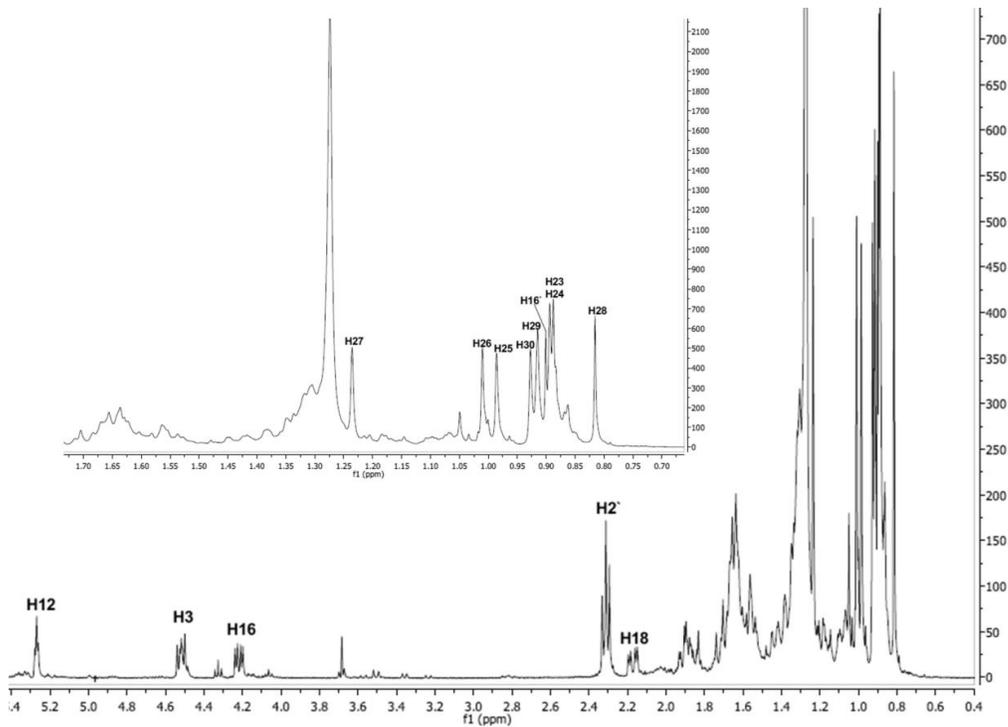
**Tab. 5:** <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Werte der Verbindungen 8a+b (CDCl<sub>3</sub>) und Literaturangaben der <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Werte zu Maniladiol 3-palmitat (nach (Schmidt et al., 2004)).

Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub> [Lit]	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>H</sub> (J in Hz) [Lit]
1	38,2	38,7	1,07 m	1,05
			1,65 m	1,63
2	23,5	23,1	1,63 m	1,63
3	80,4	80,5	4,52 dd (10.8, 4.8)	4,50 dd (10, 5)
4	37,7	37,8		
5	55,2	55,3	0,86 m	0,84
6	18,2	18,2	1,42	1,41
			1,56	1,56
7	32,5	32,6	1,30 m	1,35
			1,60 m	1,56
8	39,9	39,9		
9	46,7	46,8	1,56 m	1,54
10	36,7	36,8		
11	23,5	23,5	1,88 m	1,89
12	122,3	122,2	5,27 t (4.0)	5,25 t (4)
13	143,5	143,6		
14	43,7	43,8		
15	35,5	35,6	1,33 m	1,30
			1,68 m	1,67
16	65,9	66,0	4,22 dd (11.6, 4.8)	4,20 dd (11, 5)
17	37,3	37,3		
18	49,0	49,1	2,17 dd (14, 4.8)	2,15 dd (14, 4)
19	46,4	46,5	1,06 m	1,06
			1,70 m	1,68
20	30,9	30,9		
21	34,1	34,2	1,19 m	1,14
			1,39 m	1,37
22	30,5	30,6	a	1,17
			1,85 m	1,83

Fortsetzung Tab. 5.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit]
23	28,0	28,1	0,89 s	0,88 s
24	16,8	16,8	0,89 s	0,87 s
25	15,5	15,6	0,99 s	0,97 s
26	16,8	16,8	1,01 s	0,99 s
27	27,0	27,1	1,24 s	1,21 s
28	21,4	21,5	0,82 s	0,79 s
29	23,9	24,0	0,92 s	0,89 s
30	33,2	33,3	0,93 s	0,91 s
Acyl				
1`	173,6			
2`	34,8		2,31 t (7.2)	
3`	25,1		1,34 m	
4` - 13` (4` - 11`)*	29,1 - 29,7		1,27 m	
14` (12`)*	31,9		1,30 m	
15` (13`)*	22,6		1,31 m	
16` (14`)*	14,1		0,90 t (7.2)	

in Klammern C-Atome für Myristoyl-Rest; a nicht zu bestimmen

Abb. 52:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

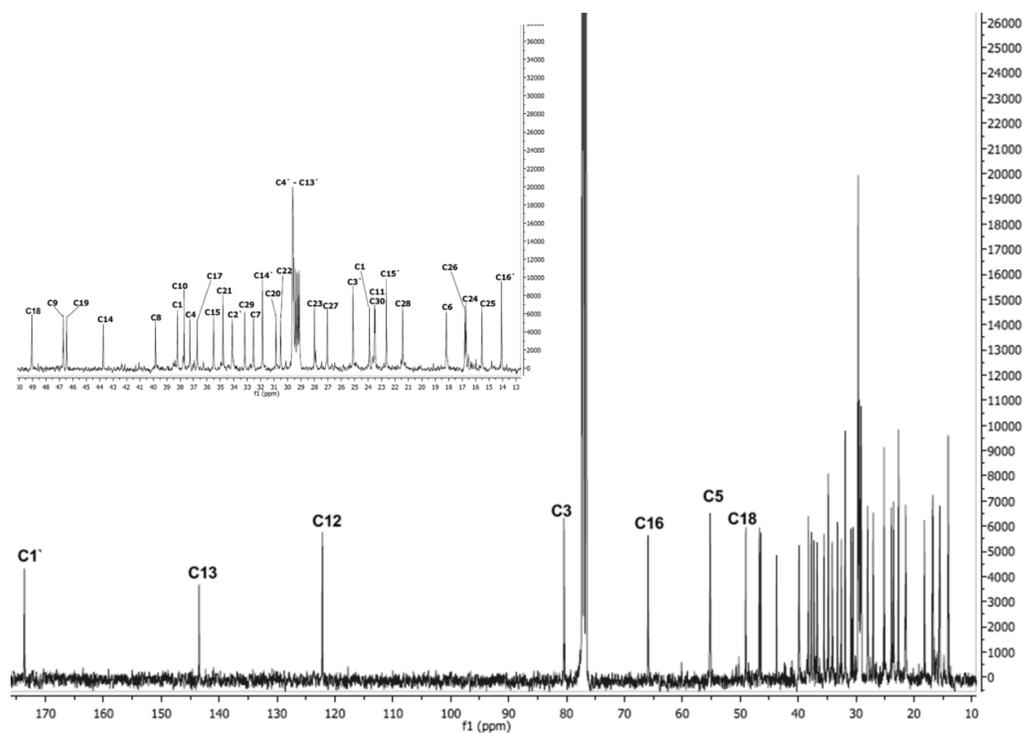


Abb. 53:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

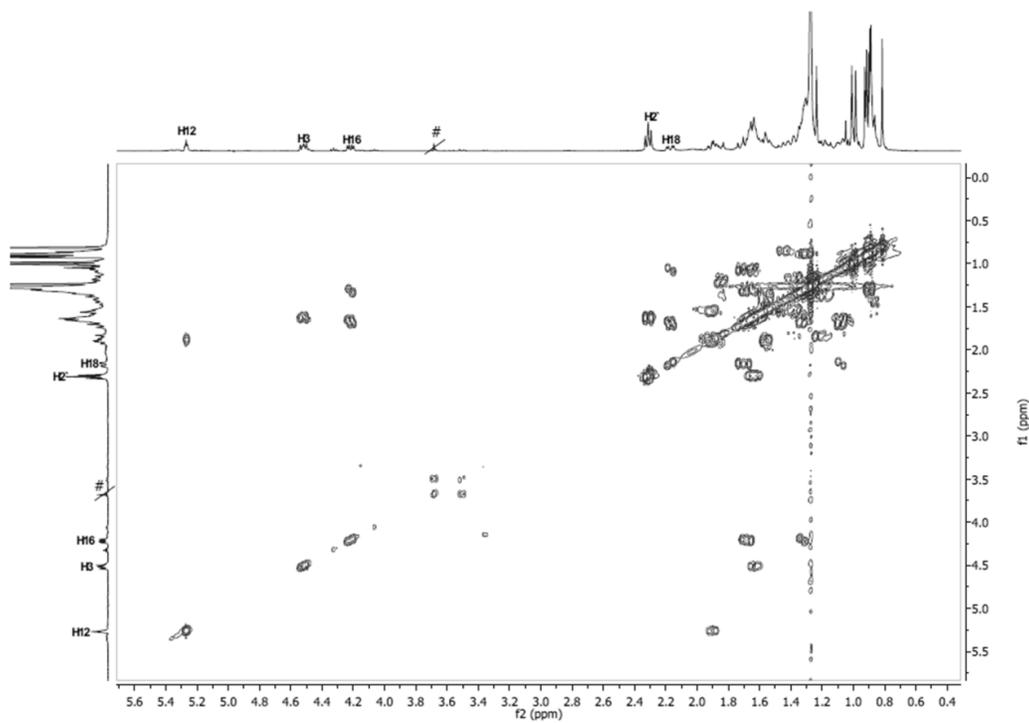


Abb. 54:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

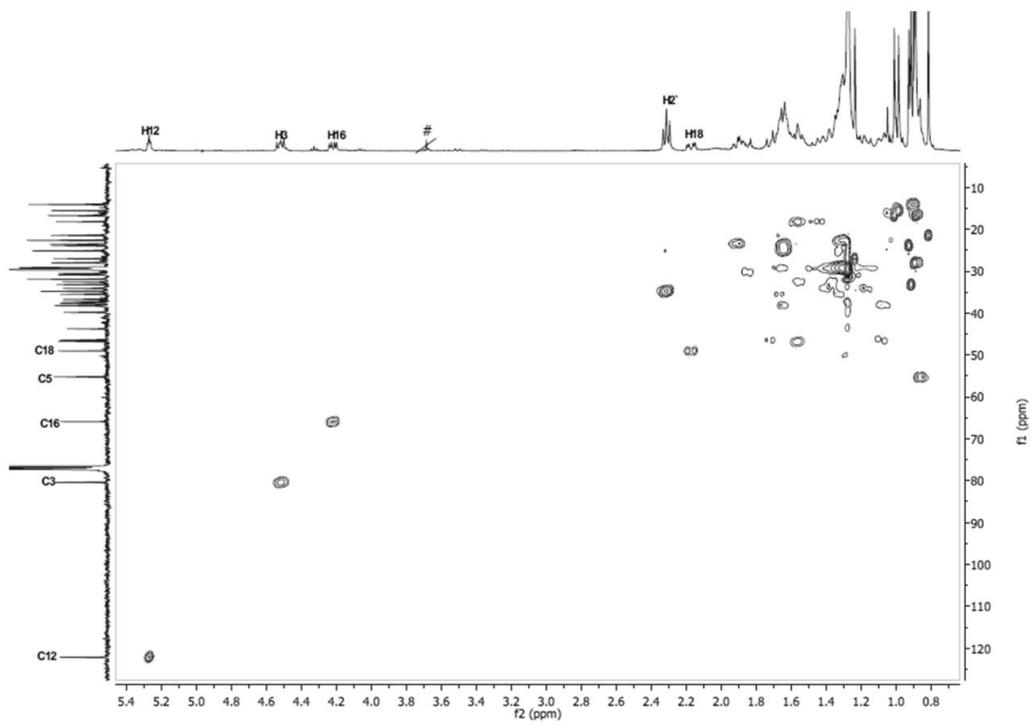


Abb. 55: HSQC-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

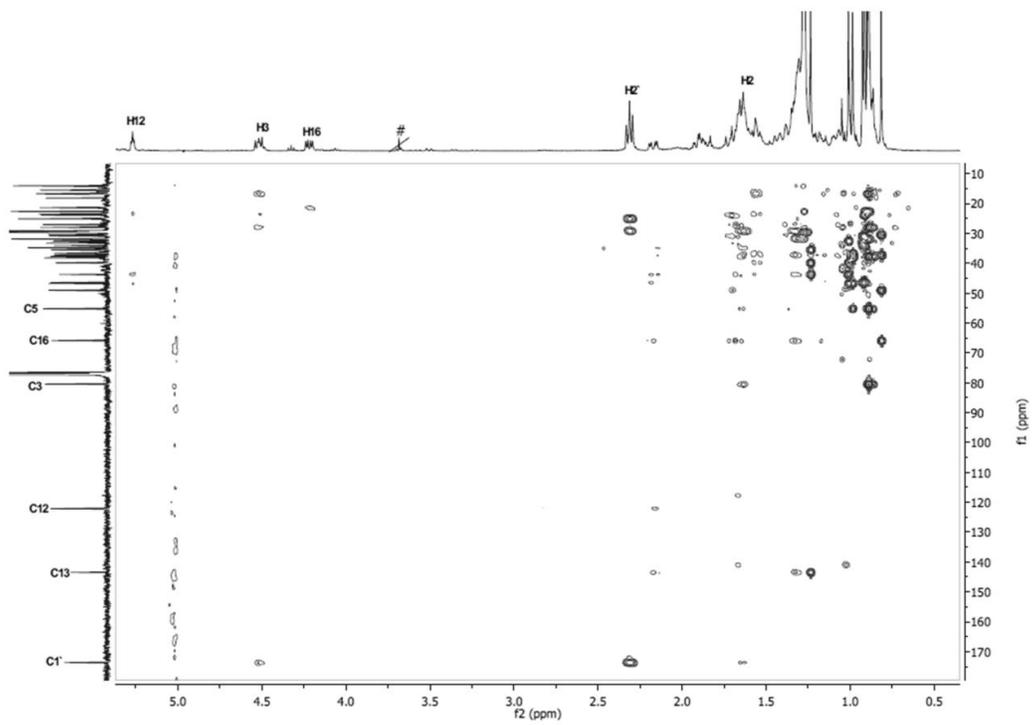


Abb. 56: HMBC-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

3.1.7 Calenduladiol 3-myristat (**9a**) und -palmitat (**9b**)

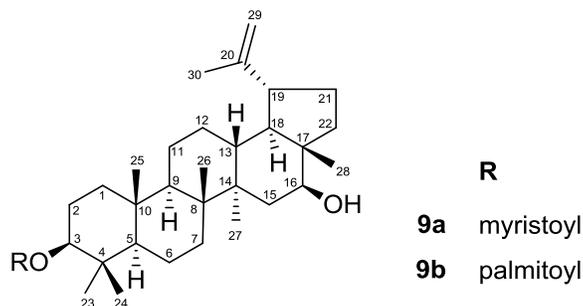


Abb. 57: Struktur der Verbindungen **9a+b**.

Die Verbindungen **9a+b** wurden nach SC-Trennung der Fraktion TFa.12 in einer Fraktion zu 3,7 mg angereichert. Der  $R_f$ -Wert von 0,71 und die violette Färbung der Bande auf dem DC nach Entwicklung mit FM 1 ließen Triterpendiolmonoester vermuten. Aufgrund der geringen isolierten Menge wurde keine GC-MS-Analyse nach basischer Hydrolyse durchgeführt.

Das HR-+APCI-Spektrum (Abb. 58) wies wie bei den anderen Triterpendiolmonoestern Fragmentationen bei  $m/z$  635,5760 und  $m/z$  663,6074  $[M+H-H_2O]^+$  auf. Aus dem nach Abspaltung der entsprechenden Säure entstehenden gemeinsamen Fragmentation bei  $m/z$  425,3777  $[M+H-FS]^+$  könnte nach weiterer Abspaltung von  $H_2O$  das Fragmentation bei  $m/z$  407,3672 gebildet werden. Aus diesem Fragmentierungsmuster konnte auf das Vorliegen eine Triterpendiols mit Myristin- bzw. Palmitinsäure als Acylkomponente geschlossen werden. Entsprechend traten im HR-ESI-MS (Abb. 59) Quasimolekülonen für die jeweiligen  $Na^+$ -Addukte von **9a** bei  $m/z$  675,5685  $[C_{44}H_{76}O_3Na]^+$  und **9b** bei  $m/z$  703,5999  $[C_{46}H_{80}O_3Na]^+$  auf.

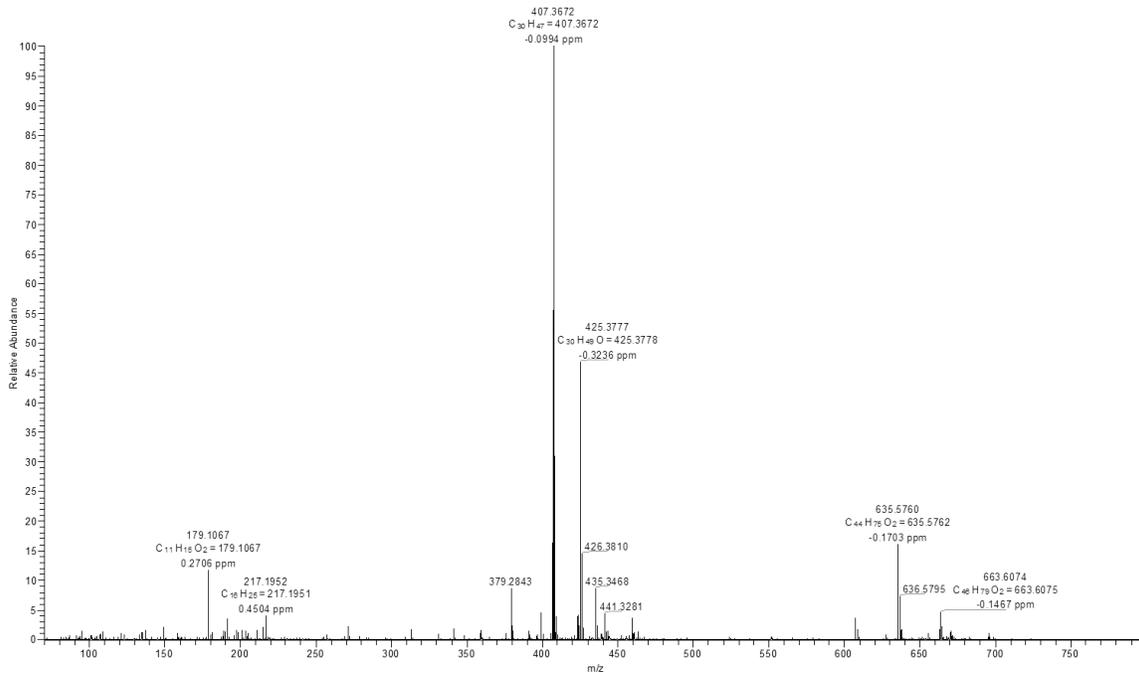


Abb. 58: HR-APCI-Massenspektrum der Verbindungen 9a+b.

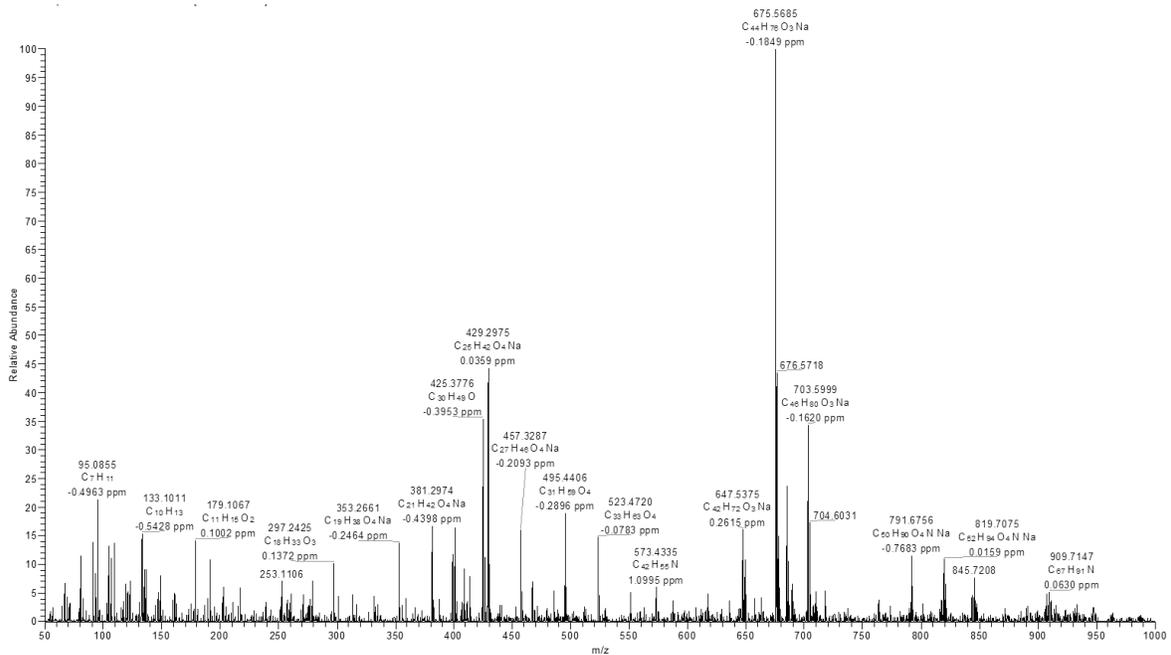


Abb. 59: HR-ESI-Massenspektrum der Verbindungen 9a+b.

Aus dem  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Abb. 61) stimmen die chemischen Verschiebungen von 30 Signalen im Hoch- und Tieffeld mit den Literaturdaten von Calenduladiol 3-monoestern (siehe Tab. 6) überein (Neukirch et al., 2004; Schmidt et al., 2004). Die

<sup>1</sup>H-NMR-Signale bei  $\delta_H$  4,62 (H-29a) und  $\delta_H$  4,73 (H-29b) (siehe Abb. 60), die im HSQC-Spektrum (Abb. 63) mit C-29 ( $\delta_C$  109,8) und im HMBC-Spektrum (Abb. 64) mit C-19 ( $\delta_C$  47,6) koppelten, bestätigten das Vorliegen einer Isopropylseitenkette des 20(29)-Lupen-Typs. Ein weiterer Beleg für das Vorliegen dieses Strukturelements war die im <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY-Spektrum (Abb. 62) auftretende allylische Kopplung mit H-30 ( $\delta_H$  1,71). Die chemischen Verschiebungen bei  $\delta_C$  80,5 und  $\delta_C$  77,2 sprachen für das Vorliegen von sauerstoffsubstituierten C-Atomen. Ihre Positionen an C-3 und C-16 sowie die Veresterung an C-3 konnten wie bei den Verbindungen **7a+b** durch 2D-NMR-Korrelationen bewiesen werden. Die übrigen <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale ließen sich den langkettigen Acylresten zuordnen. Calenduladiol 3-myristat / -palmitat (siehe Abb. 57) wurden bereits aus *Calendula*-Blüten isoliert (Neukirch et al., 2004).

**Tab. 6:** <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Werte der Verbindungen **9a+b** (CDCl<sub>3</sub>) und Literaturangaben der <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Werte zu Calenduladiol 3-myristat (nach (Schmidt et al., 2004)).

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
1	38,4	38,4	1,65 – 1,75 m	0,97
				1,67
2	23,7	23,7	1,55 – 1,70 m	1,63
3	80,5	80,5	4,49 dd (10.8, 5.2)	4,47 dd (11, 6)
4	37,6	37,8		
5	55,4	55,4	0,81 m	0,79
6	18,1	18,2	1,42 m	1,40
			1,55 m	1,53
7	34,1	34,2	1,42 m	1,40
8	40,9	40,9		
9	49,9	49,9	1,30 m	1,28
10	37,8	37,1		
11	20,8	20,9	1,45 m	1,45
			1,55 m	
12	24,7	24,7	1,65 m	1,25
				1,59
13	37,0	37,3	1,65 m	1,63

Fortsetzung Tab. 6.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
14	44,0	44,1		
15	36,8	36,9	1,27 – 1,36 m	1,29 1,55
16	77,2	77,2	3,63 dd (10.8, 4.4)	3,61 dd (11, 4)
17	48,5	48,6		
18	47,7	47,7	1,40 m	1,39
19	47,6	47,6	2,52 ddd (10.8, 10.8, 5.6)	2,49 ddd(11, 11, 5)
20	149,9	150,0		
21	29,9	29,9	1,45 m 1,98 m	1,35 1,97 dddd (11, 11, 11, 11)
22	37,8	37,7	1,55 – 1,70 m	1,58 1,67
23	27,9	28,0	0,86 s	0,84 s
24	16,5	16,6	0,86 s	0,84 s
25	16,5	16,1	0,88 s	0,85 s
26	15,9	16,0	1,06 s	1,04 s
27	16,1	16,2	1,01 s	0,99 s
28	11,6	11,7	0,82 s	0,79 s
29	109,8	109,8	4,62 s 4,73 s	4,60 s 4,71 s
30	19,3	19,3	1,71 brs	1,68 s
Acyl				
1`	173,6			
2`	34,8		2,31 t (7.2)	
3`	25,1		1,34 m	
4` - 13` (4` - 11`)*	29,1 – 29,7		1,27 m	
14` (12`)*	31,9		1,30 m	
15` (13`)*	22,6		1,31 m	
16` (14`)*	14,1		0,90 t (7.2)	

in Klammern C-Atome für Myristoyl-Rest

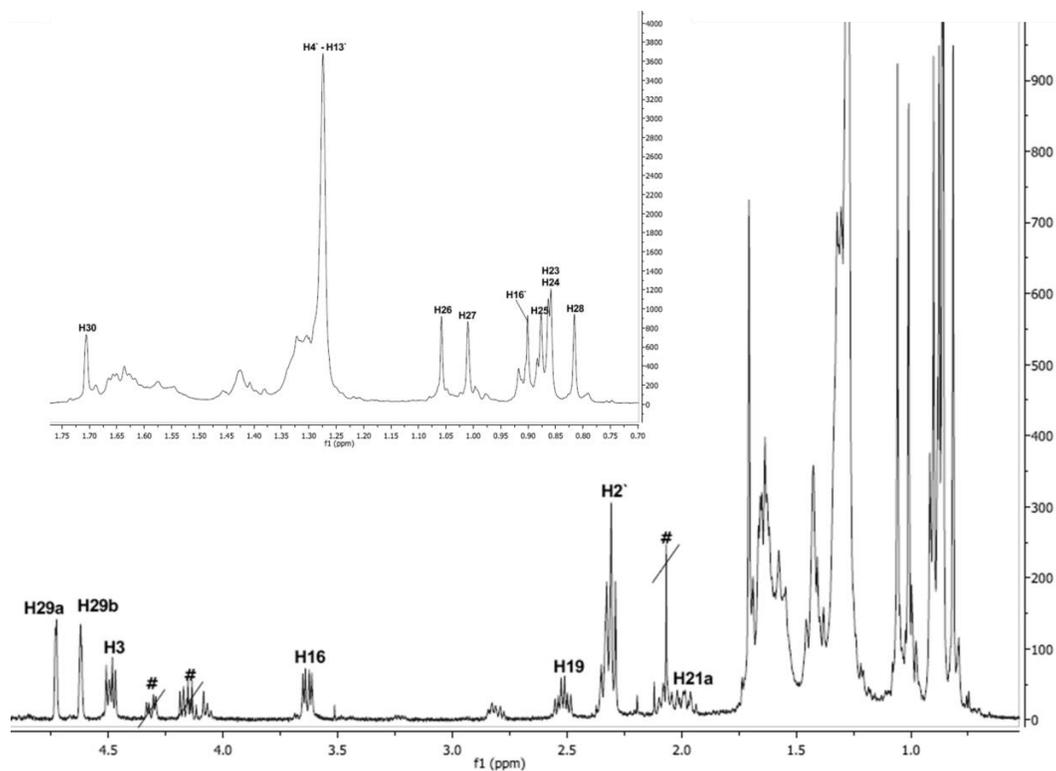


Abb. 60:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

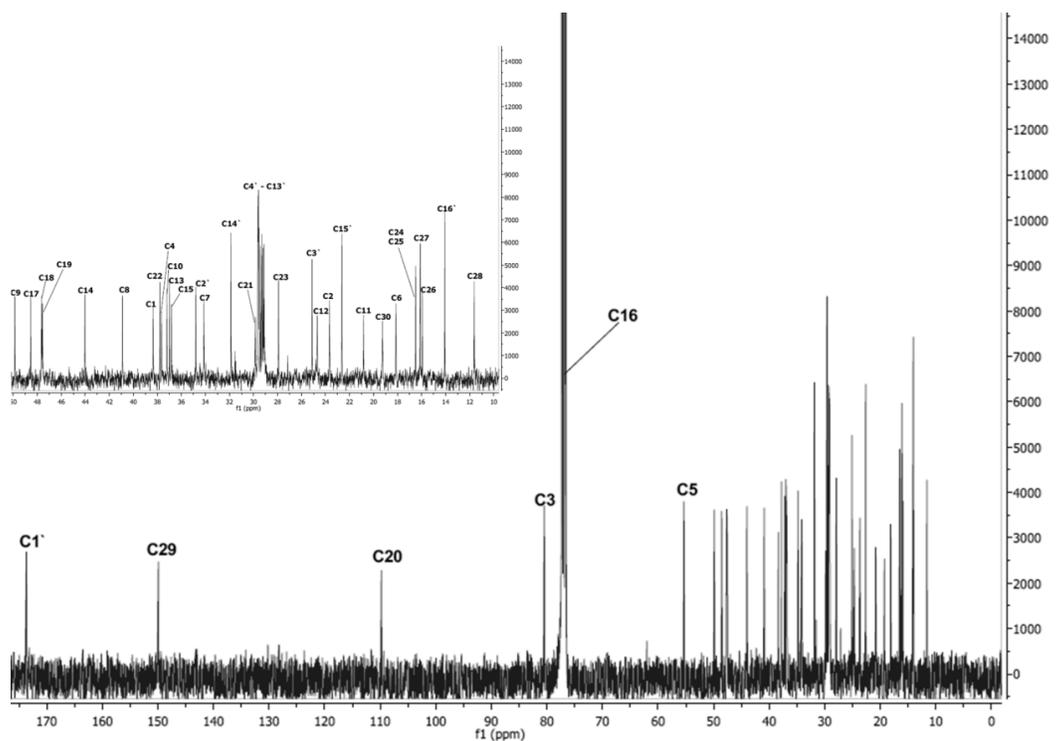


Abb. 61:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

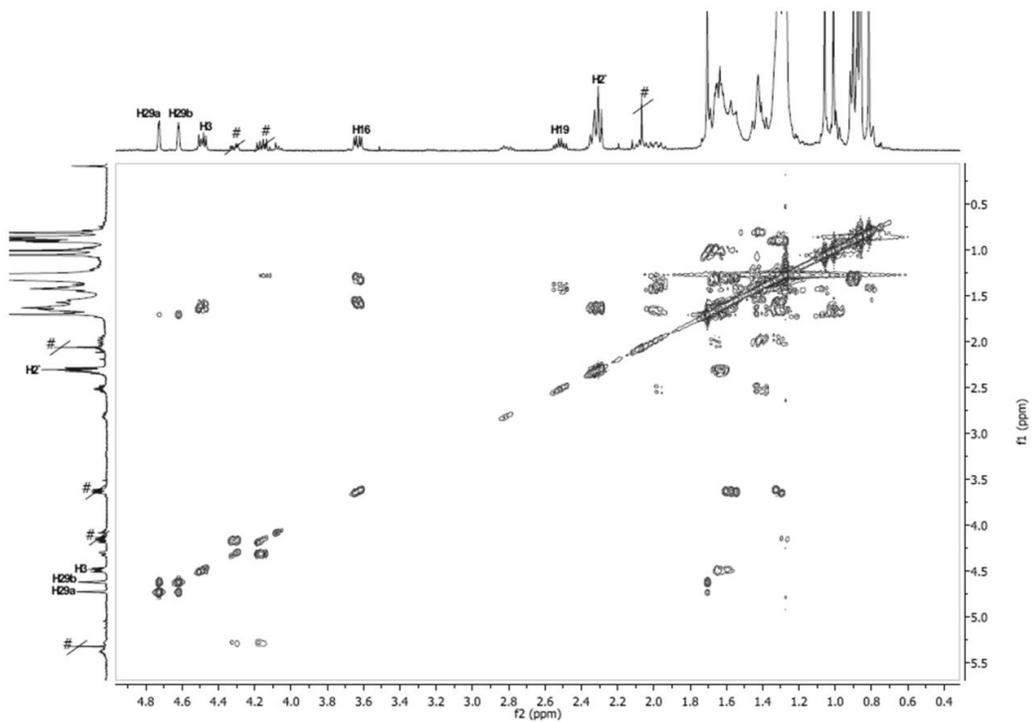


Abb. 62:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

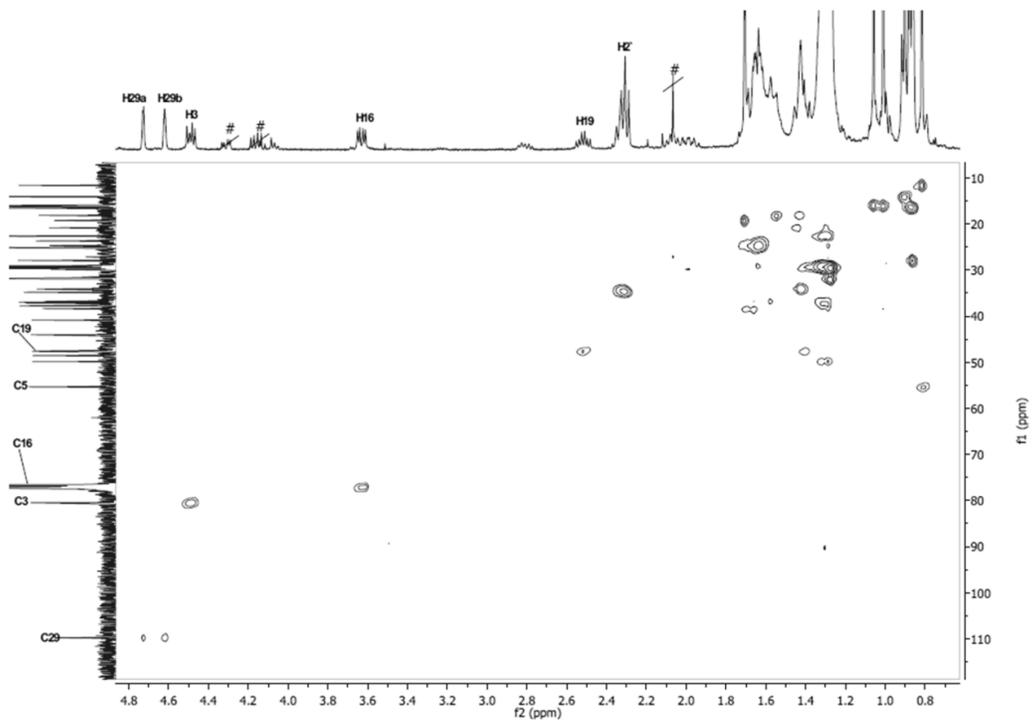


Abb. 63: HSQC-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

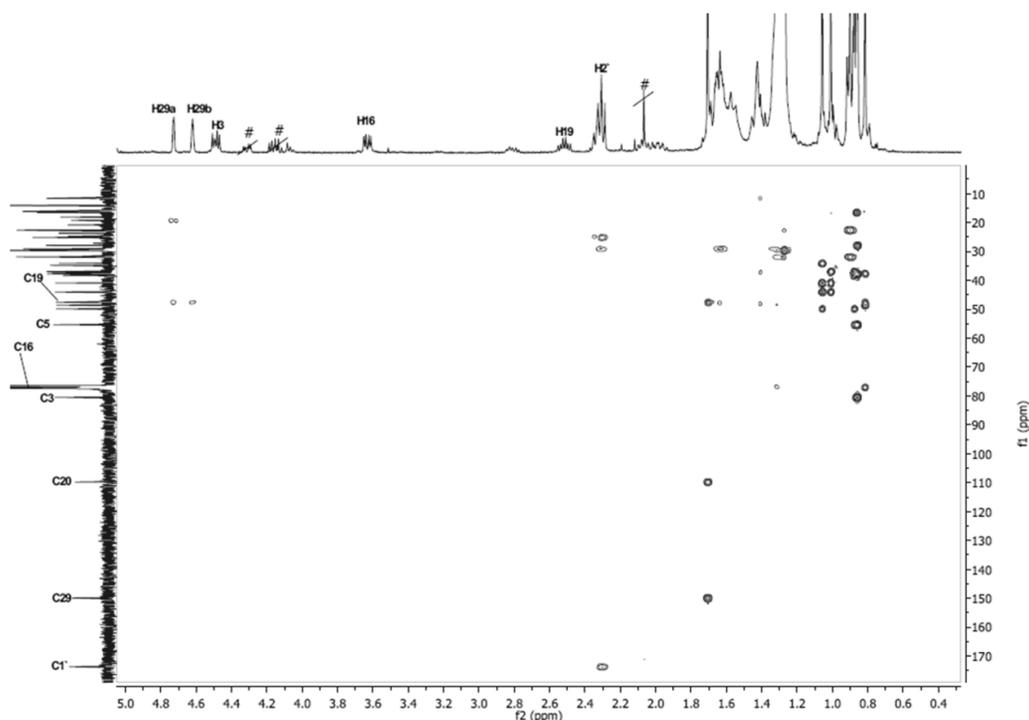


Abb. 64: HMBC-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

### 3.1.8 Faradiol (10)

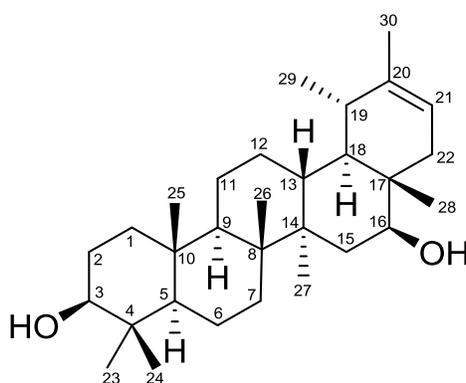


Abb. 65: Struktur der Verbindung 10.

Verbindung 10 wurde in der Fraktion TFb.10.2 zu 3,8 mg nach der SC-Trennung der Fraktion TFb.10 isoliert. Die violette Färbung und der R<sub>f</sub>-Wert von 0,24 nach einem DC mit FM 1 ließ das Vorliegen von Triterpenen vermuten.

Die 30 Signale im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Abb. 67) stimmten weitgehend mit denen der Faradiol 3,16-diester (**1** – **4**) überein. Allerdings traten bei Verbindung **10** die Signale für die Protonen der 2 Oxymethingruppen im höheren Feld bei  $\delta_{\text{H}}$  3,22 (H-3) und  $\delta_{\text{H}}$  3,46 (H-16) auf (siehe Abb. 66), was für das Vorliegen freier OH-Gruppen sprach. Entsprechend stimmten die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte (siehe Tab. 7) mit den Literaturwerten für Faradiol überein (Della Loggia et al., 1994). Faradiol (siehe Abb. 65) wurde bereits in *Calendula*-Blüten identifiziert (Nizyński et al., 2015).

**Tab. 7:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindung **10** ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}\text{C}$ -Werte von Faradiol (nach (Della Loggia et al., 1994)).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ [Lit.]	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	38,7	38,9	0,95 m
			1,74 m
2	27,3	27,4	1,54 – 1.70 m
3	78,9	79,0	3,22 dd (11.2, 4.8)
4	38,8	38,8	
5	55,2	55,4	0,72 m
6	18,2	18,3	1,42 m
			1,56 m
7	34,1	34,2	1,42 m
8	41,0	41,1	
9	49,9	50,0	1,31 m
10	37,0	37,6	
11	21,5	21,6	1,29 m
12	29,7	27,3	1,32 m
13	38,8	38,8	1,66 m
14	42,4	42,5	
15	37,5	37,1	1,35 m
			1,67 m
16	76,3	76,3	3,46 dd (11.2, 4.8)
17	39,9	39,9	
18	47,5	47,6	1.07 m
19	35,8	35,9	1,68 m
20	139,7	139,7	
21	118,2	118,3	5,33 brd (7.2)

Fortsetzung Tab. 7.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)
22	36,5	36,6	2,12 m
			1,67
23	27,9	28,0	1,00 s
24	15,3	15,4	0,79 s
25	16,3	16,3	0,87 s
26	16,0	16,0	1,07 s
27	16,3	16,4	1,03 s
28	11,5	11,6	0,75 s
29	22,4	22,4	1,02 d (7.2)
30	21,6	21,5	1,67 brs

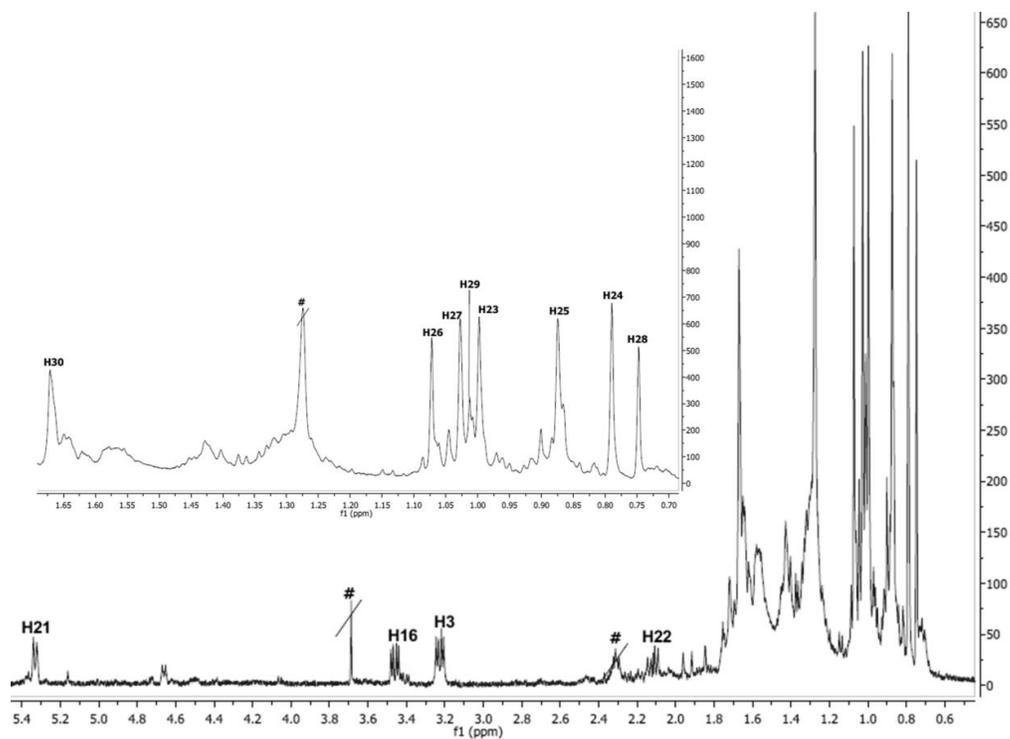


Abb. 66:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

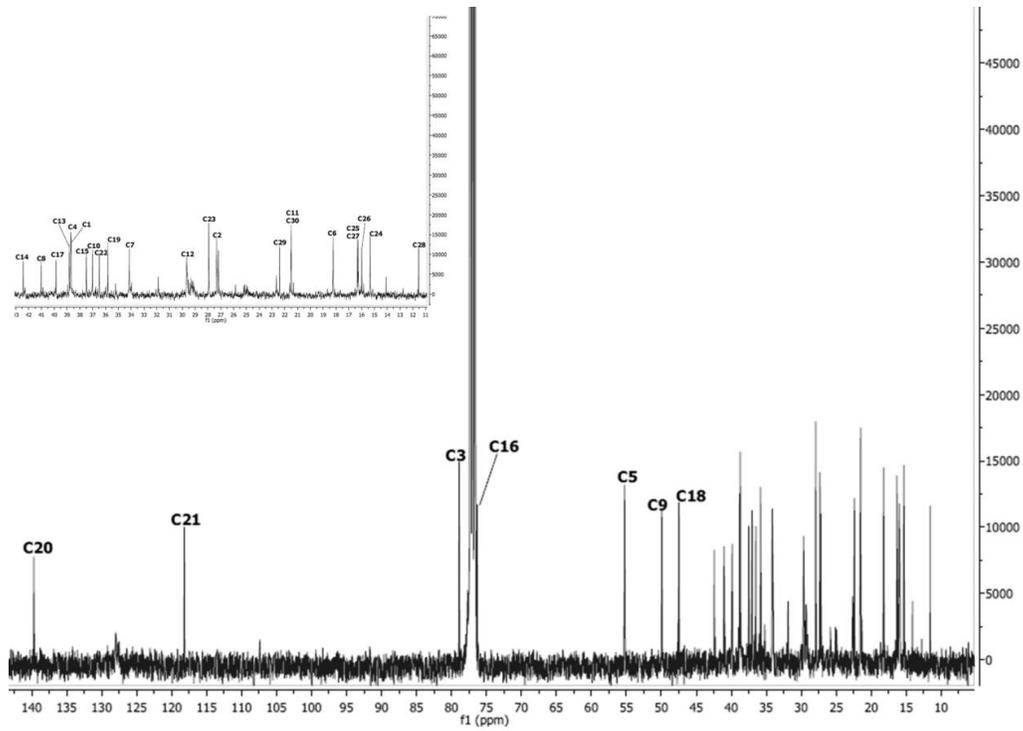


Abb. 67:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

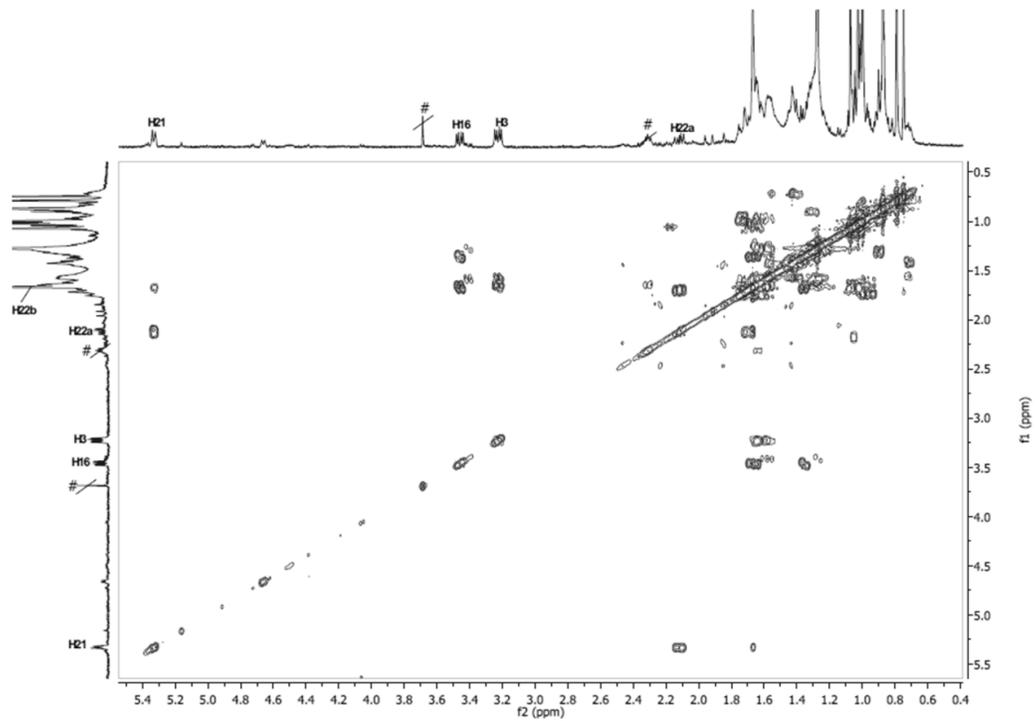


Abb. 68:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

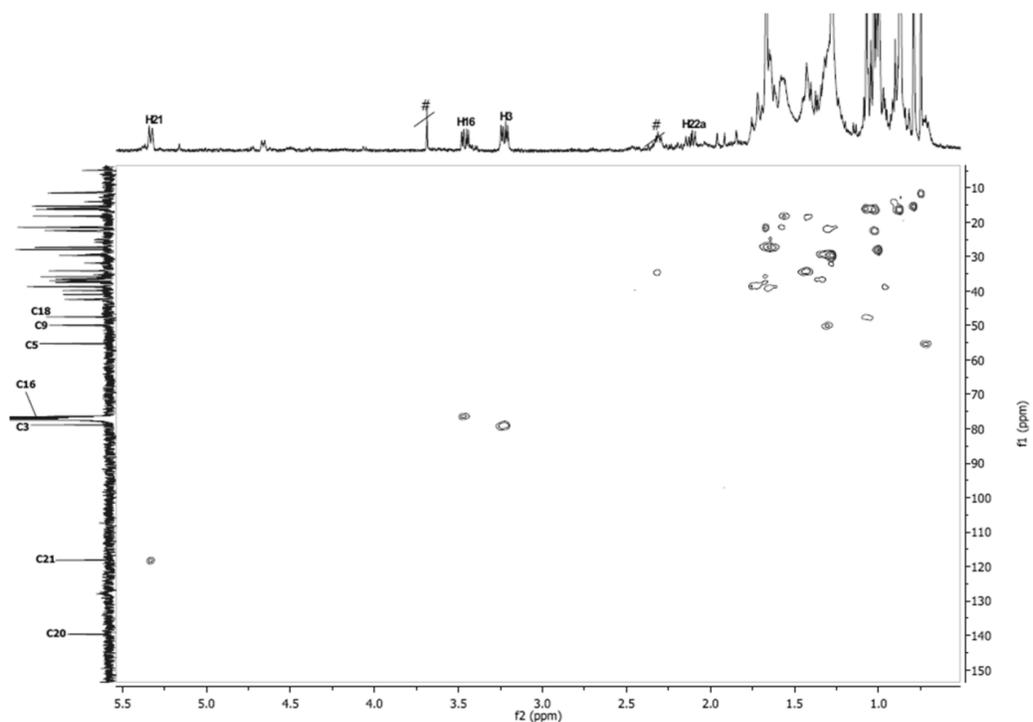


Abb. 69: HSQC-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

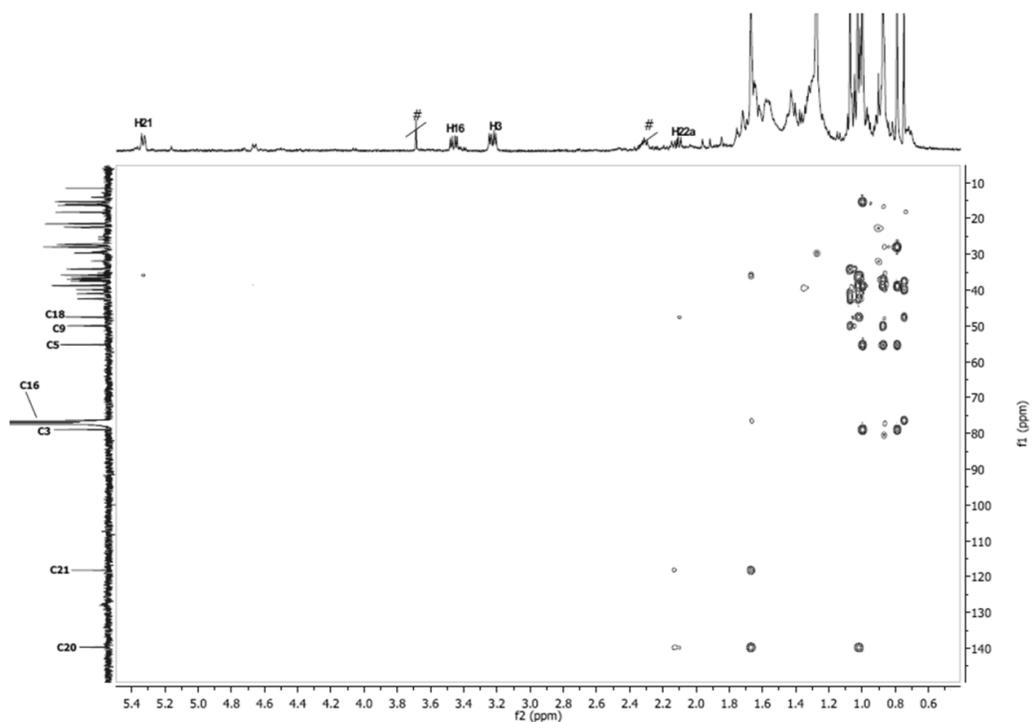


Abb. 70: HMBC-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Durchgestrichene und mit # gekennzeichnete Signale gehören zu Verunreinigungen.

### 3.1.9 Faradiol 3-myristat (11a), -palmitat (11b), Arnidiol 3-myristat (12a), -palmitat (12b)

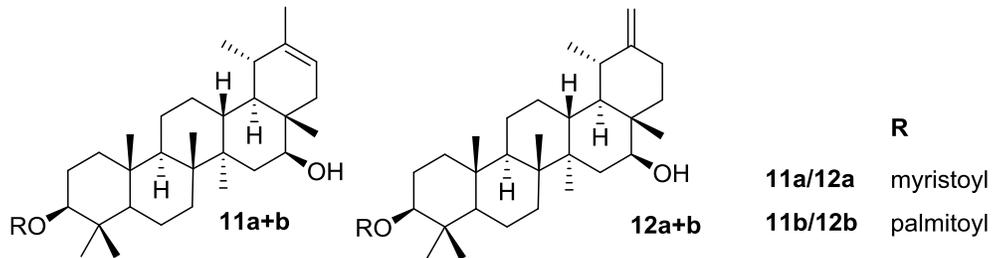


Abb. 71: Strukturen der Faradiol 3-ester (11a+b) und Arnidiol 3-ester (12a+b).

Die Verbindungen **11a+b** und **12a+b** wurden nach SC-Auftrennung der Fraktion I.13.II.1.5 in einer Fraktion zu 9,0 mg isoliert. Auf einem analytischen DC mit FM 1 erschien diese Fraktion als eine violette Bande auf Höhe des Faradiol 3-myristats, was das Vorliegen von Triterpendiolmonoestern nahelegte.

Die bei  $m/z$  635,6971 und  $m/z$  663,5760 im HR-+APCI MS-Spektrum (Abb. 72) auftretenden Fragmentationen  $[M+H-H_2O]^+$  sowie weitere Fragmentationen bei  $m/z$  425,3776  $[M+H-FS]^+$  und  $m/z$  407,3671  $[M+H-FS-H_2O]^+$  zeigten an, dass hier Myristin- und Palmitinsäureester eines Triterpendiols vorlagen. Das Gemisch wurde basisch hydrolysiert und einer GC-MS-Analyse unterworfen. Das erhaltene Gaschromatogramm (Abb. 73) zeigte 2 angetrennte Peaks bei  $R_t = 36.613$  und  $36.963$  min, was auf das Vorliegen zweier sehr ähnlicher Triterpene schließen ließ. Die dazugehörigen Massenspektren (Abb. 74 und Abb. 75) wiesen jeweils einen  $M^+$ -Peak bei  $m/z$  442 sowie einen  $[M-H_2O]^+$ -Peak bei  $m/z$  424 auf, was für das Vorliegen von 2 Triterpendiolen sprach. Das Fragmentierungsmuster beider Verbindungen war unterschiedlich. Das Fehlen des charakteristischen Retro-Diels-Alder-Fragments bei  $m/z$  234 (siehe Maniladiol 3-ester) schloss das Vorliegen eines Triterpens vom  $\Delta^{12}$ -Oleanen- oder Ursen-Typs aus. Das Auftreten der Fragmente  $m/z$  207 und  $m/z$  189 in unterschiedlichen Intensitäten zeigte das Vorliegen der isomeren Triterpene Faradiol und Arnidiol an, was durch Abgleich mit den Literaturdaten bestätigt wurde (Pyrek and Baranowska, 1978). Danach handelte es sich beim ersten Peak im GC um Faradiol, beim zweiten um Arnidiol. Die

entsprechenden isomeren Triterpendiolmonoester Faradiol 3-myristat / -palmitat und Arnidiol 3-myristat / -palmitat (siehe Abb. 71) sind bereits aus *Calendula officinalis* L. isoliert worden. Faradiol in Form der 3-monoester ist die Haupttriterpenverbindung in *Calendula*-Blüten.

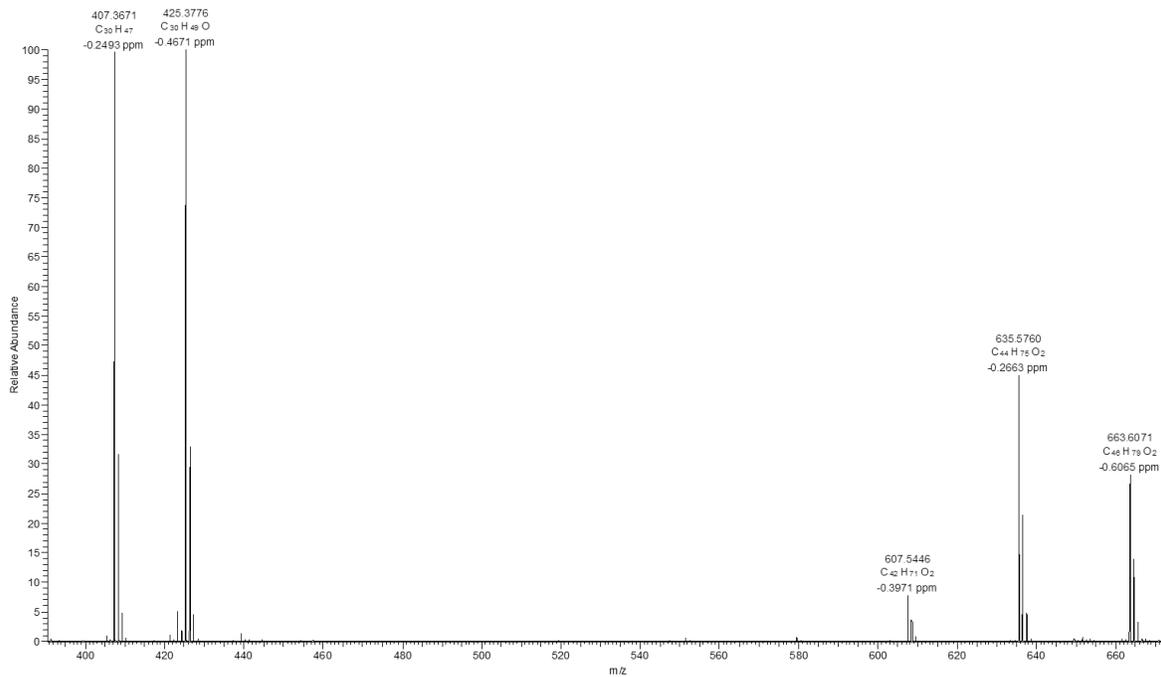


Abb. 72: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 11a+b und 12a+b.

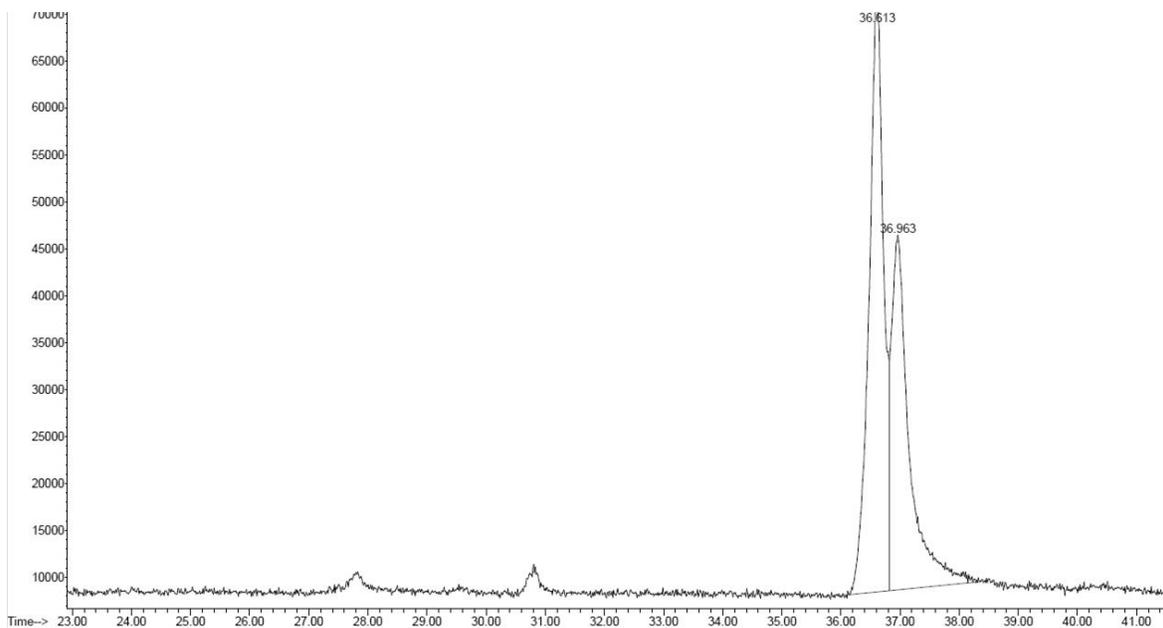


Abb. 73: Gaschromatogramm der Verbindungen 11a+b und 12a+b nach basischer Hydrolyse.

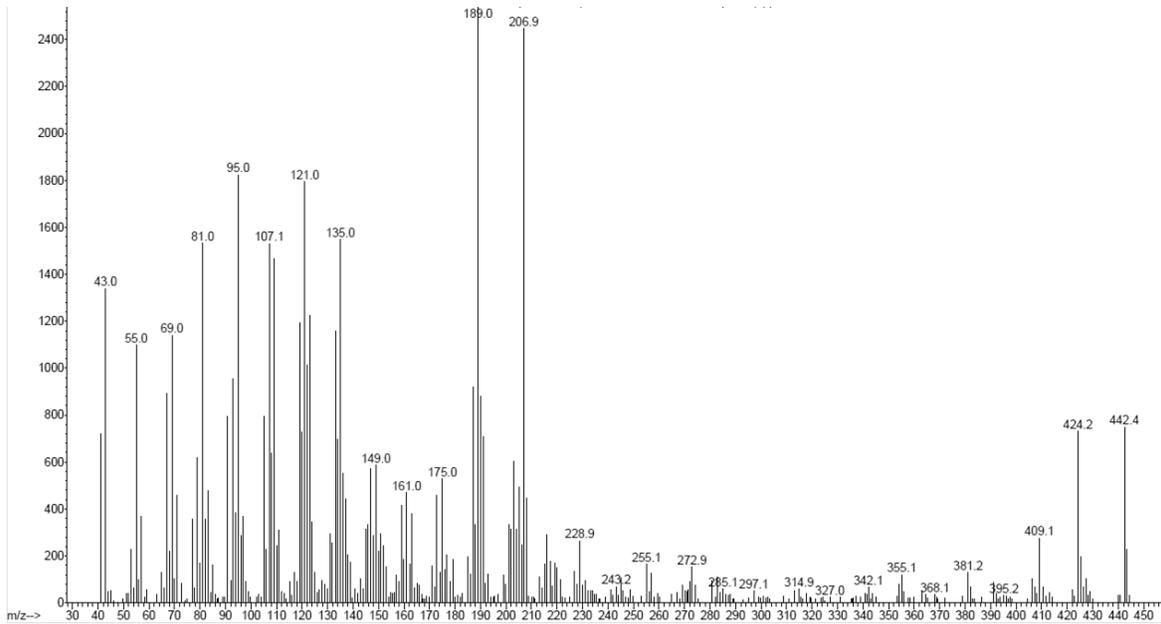


Abb. 74: EI-Massenspektrum der Verbindungen 11a+b nach basischer Hydrolyse.

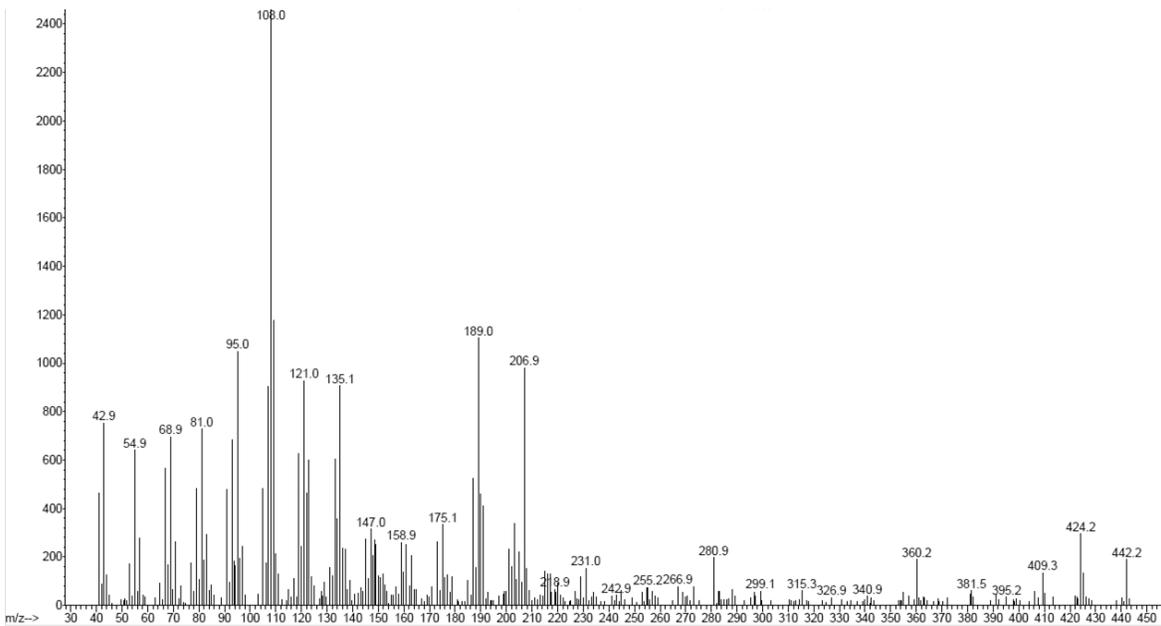


Abb. 75: EI-Massenspektrum der Verbindungen 12a+b nach basischer Hydrolyse.

3.1.10  $\beta$ -Amyrin (13),  $\alpha$ -Amyrin (14),  $\psi$ -Taraxasterol (15), Taraxasterol (16)

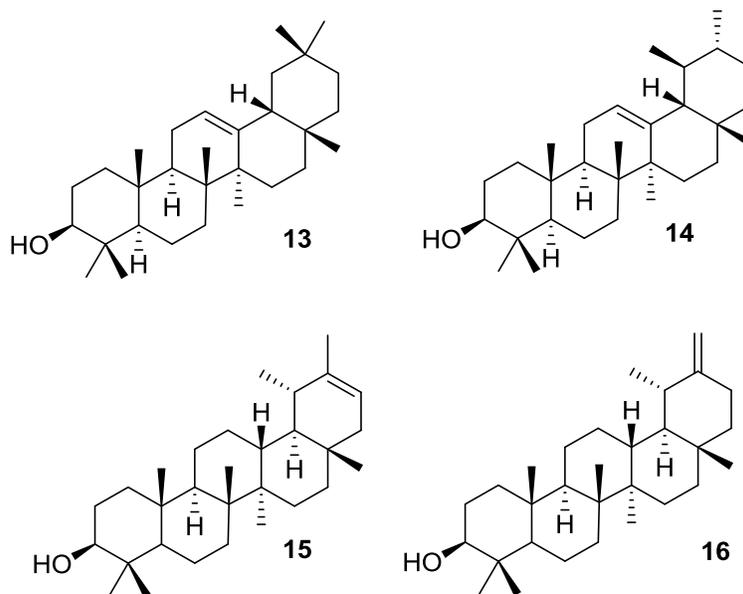


Abb. 76: Strukturen von  $\beta$ -Amyrin (13),  $\alpha$ -Amyrin (14),  $\psi$ -Taraxasterol (15), Taraxasterol (16).

Nach der SC-Auftrennung der Fraktion I.13.II.1.6 wurden die Verbindungen **13** – **16** in einer Fraktion zu 4,1 mg isoliert. Auf einem analytischen DC mit FM 1 erschien diese Fraktion als violette Bande auf der Höhe von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin, sodass Triterpenmonole in dieser Fraktion vermutet werden konnten.

Die Zusammensetzung dieser Fraktion wurde mittels GC-MS-Analyse untersucht. Das Gaschromatogramm (Abb. 77) wies neben einem Hauptpeak mit  $t_R = 22.115$  min drei weitere Peaks mit  $t_R = 17.470$  min, 18.884 min und 22.440 min auf. Die Verbindungen **13** ( $t_R = 17.470$  min) und **14** ( $t_R = 18.884$  min) wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und der Fragmentierung mit gemessenen Standardsubstanzen als  $\beta$ -Amyrin (**13**) und  $\alpha$ -Amyrin (**14**) identifiziert. Außerdem zeigten die EI-Massenspektrum des  $\alpha$ -Amyrins (Abb. 78), dass das Fragment bei  $m/z$  203 kleiner ist als das Fragment bei  $m/z$  189, was charakteristisch für den  $\Delta^{12}$ -Ursen-Typ war. Hingegen ist bei  $\beta$ -Amyrin, einem Triterpenmonol vom  $\Delta^{12}$ -Oleanen-Typ das Fragment  $m/z$  203 deutlich intensiver als das Fragment  $m/z$  189 (Abb. 79) (Karlner and Djerassi, 1966). Die anderen beiden Peaks wurden nach Vergleich der EI-Massenspektren (Abb. 80 und Abb. 81) mit Literaturangaben als  $\psi$ -Taraxasterol

(15) und als Taraxasterol (16) identifiziert (Lee et al., 1985; von Raison, 1999). Den Intensitäten der Peaks im GC nach stellte  $\psi$ -Taraxasterol die Hauptkomponente des Triterpenmonolgemisches dar. Die vier Triterpenmonole (siehe Abb. 76) sind bereits aus *Calendula*-Blüten isoliert worden (Akihisa et al., 1996; Kasprzyk and Pyrek, 1968; Nizyński et al., 2015).

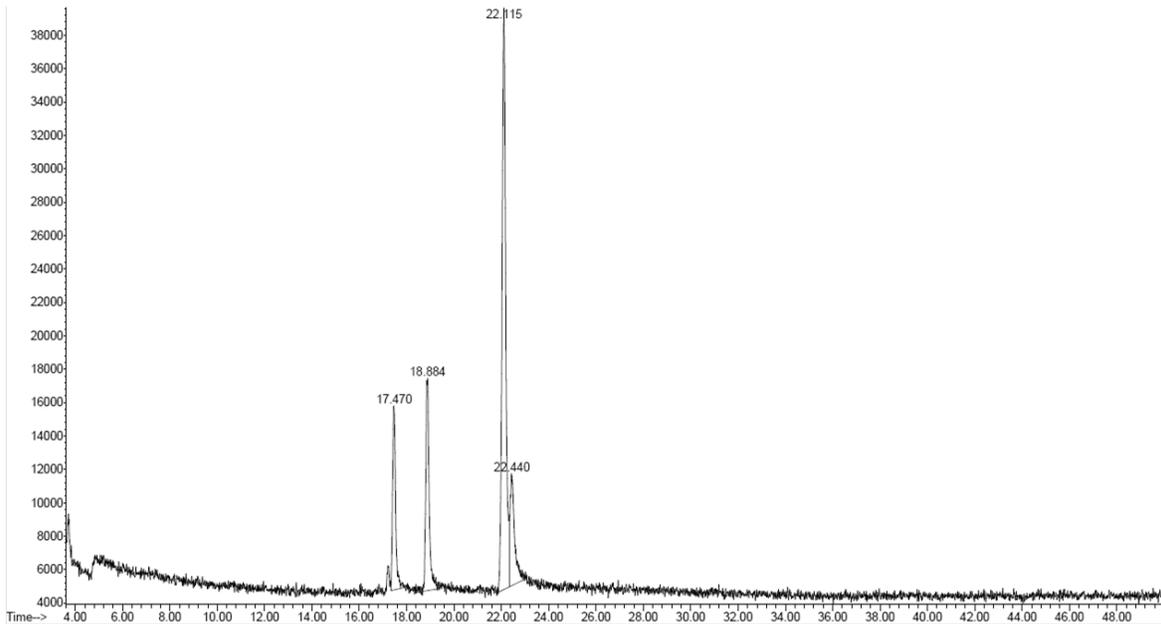


Abb. 77: Gaschromatogramm der Verbindungen 13 – 16.

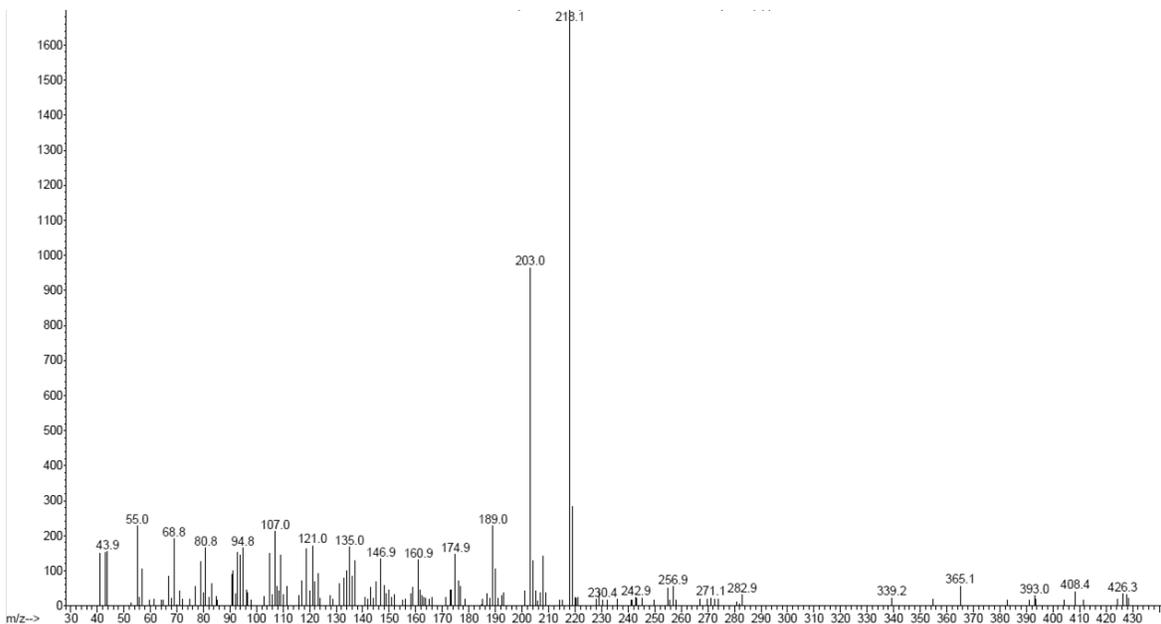


Abb. 78: EI-Massenspektrum der Verbindung 13 nach GC-MS-Analyse.

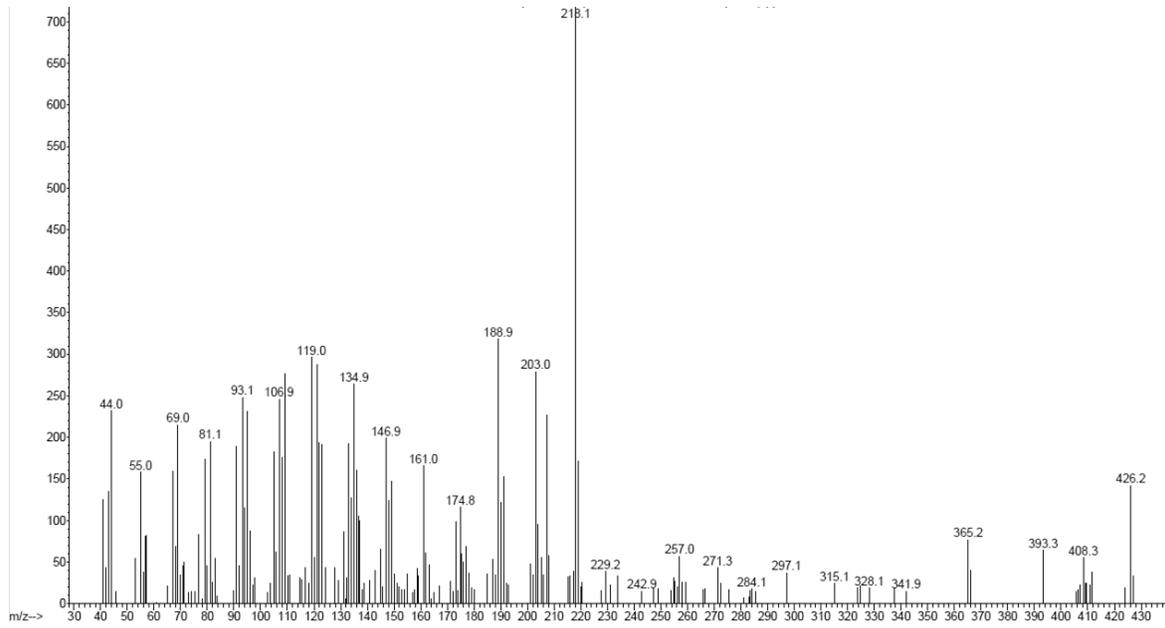


Abb. 79: EI-Massenspektrum der Verbindung 14 nach GC-MS-Analyse.

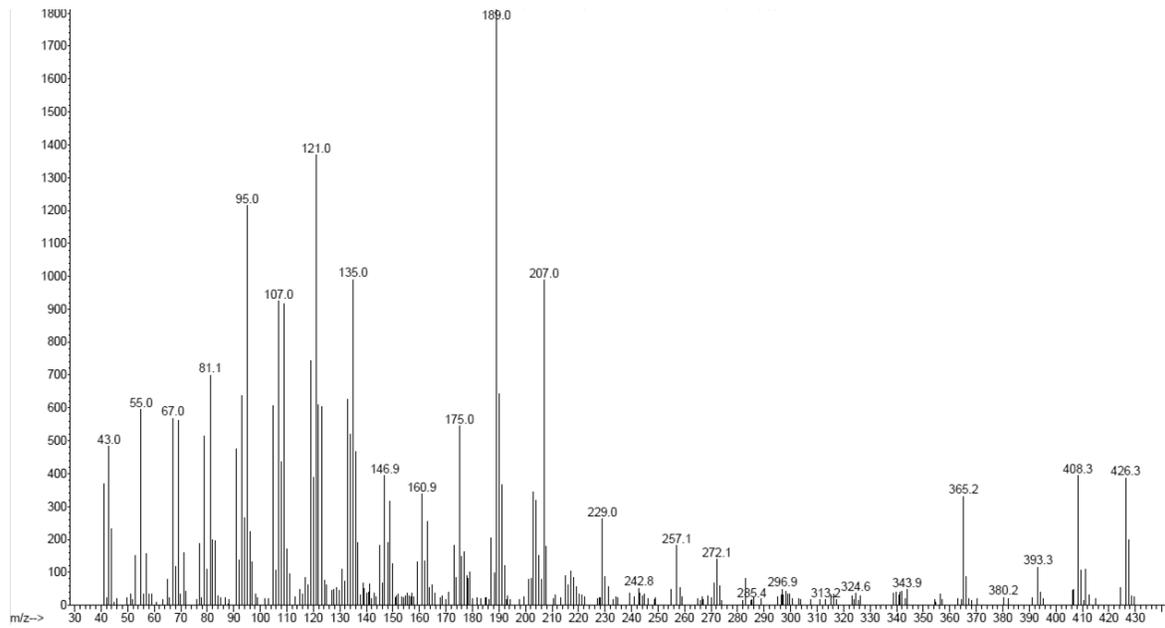


Abb. 80: EI-Massenspektrum der Verbindung 15 nach GC-MS-Analyse.

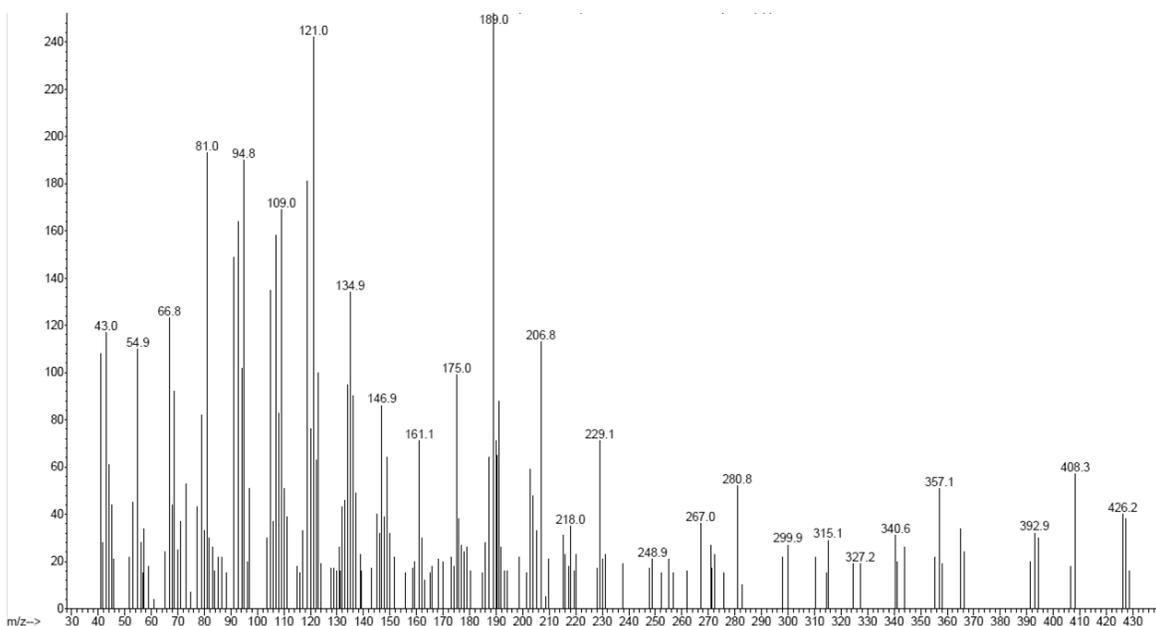


Abb. 81: EI-Massenspektrum der Verbindung 16 nach GC-MS-Analyse.

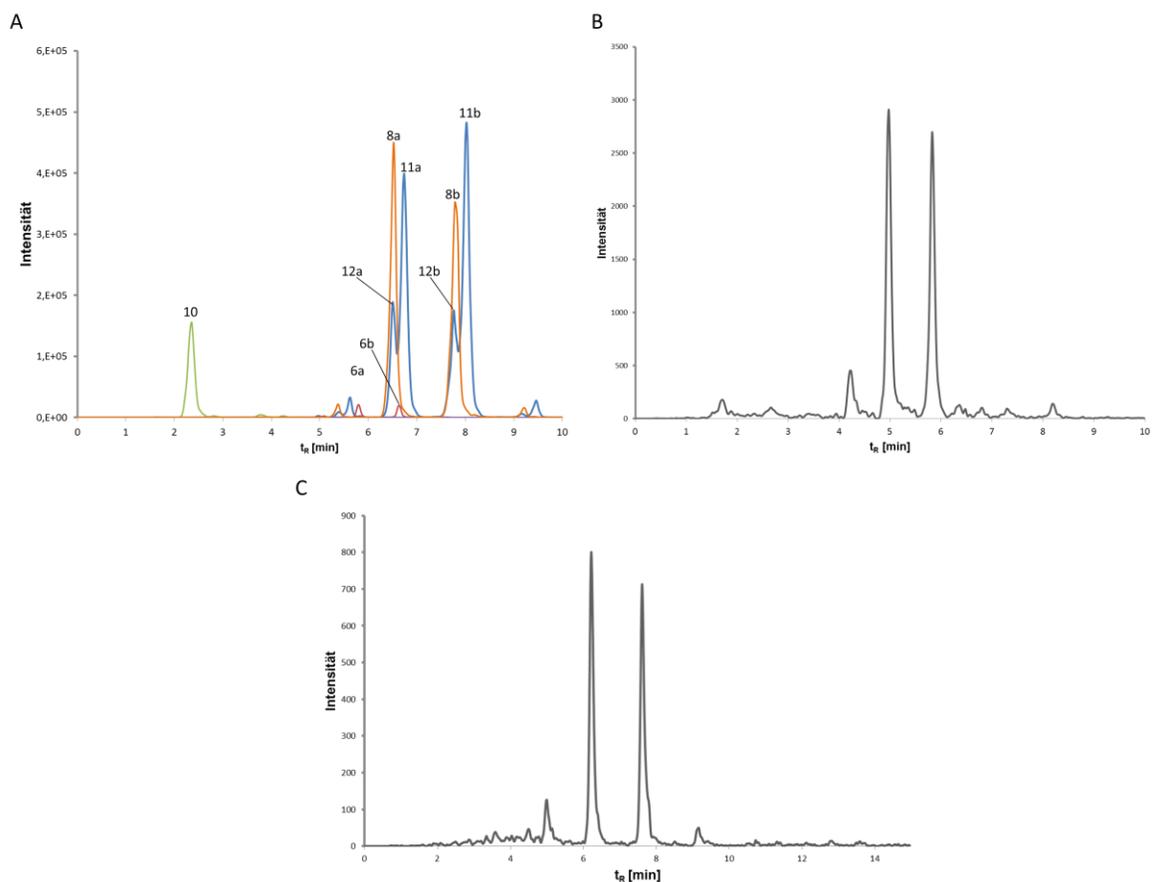
### 3.1.11 (U)HPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Analyse zur Trennung und Identifizierung der Triterpendiolmonoester und -diester

Die in den vorherigen Kapiteln bei den einzelnen Triterpenestern aufgeführten HR-+APCI-Spektren und HR-+ESI-Spektren enthielten die entsprechenden Myristin- und Palmitinsäureester jeweils als Gemisch. Wegen der Instabilität der Ester traten die entsprechenden Quasimoleküle nicht auf. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Lämmerhofer und seinem Doktoranden A. Sievers-Engler, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen, entwickelte diese eine Methode zur Auftrennung der Triterpenester und eine weitere zum Nachweis der entsprechenden Quasimoleküle (Nicolaus et al., 2016).

#### 3.1.11.1 Trennung und Charakterisierung der Triterpenmonoester mittels UHPLC-APCI-QTOF-MS

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Triterpenmonoestergemische wurden mittels UHPLC an einer Kinetex core shell RP-C18-Säule und einem Gradienten von 100% Acetonitril bis zu 100% Methanol aufgetrennt. Die Triterpenester

zerfielen bereits in der Ionenquelle und wurden bevorzugt als Signal  $[M+H-FS-nH_2O]^+$  mittels APCI-QTOF MS detektiert. In Abb. 82 wurden die von den einzelnen Triterpengemischen erhaltenen XICs (extracted ion chromatogram) übereinandergelegt. Als Bezugsfragment diente die Fragmention  $[M+H-2H_2O]^+$  für Faradiol (**10**) bzw.  $[M+H-FS-nH_2O]^+$  für die Triterpendiol und -triolemonoester. Wie zu sehen ist, wurden die jeweiligen Myristin- und Palmitinsäureester der Triterpendiole und -triole gut voneinander getrennt. Auch das Gemisch der isomeren Faradiol- und Arnidiol 3-monoester (**11a+b** / **12a+b**) konnte mit 4 aufgelösten Peaks getrennt werden.



**Abb. 82: UHPLC-Trennung der Triterpenmonoester mittels einer RP-C18-Säule und Übereinanderlagerung der XICs (extracted ion chromatograms).** Bezogen auf  $[M+H-2H_2O]^+$  bei Faradiol und  $[M+H-FS-nH_2O]^+$  bei den Triterpenestern. A) Verbindungen **6a+b** ( $m/z$  405,3515); **8a+b** ( $m/z$  407,3672); **10** ( $m/z$  407,3672); **11a+b** / **12a+b** ( $m/z$  407,3672). B) Verbindungen **7a+b** ( $m/z$  407,3672). C) Verbindungen **5a+b** ( $m/z$  409,3828).

Für eine sichere Bestätigung der einzelnen Triterpenmonoester wurden von den jeweils getrennten Peaks während des LC-Laufes unter optimierten Bedingungen MS/MS-Spektren zum Nachweis der  $[M+H]^+$ -Quasimolekülonen aufgenommen. In Tab. 8 sind die entsprechenden Daten und die Retentionszeiten der Verbindungen gelistet. Die durchgeführte CID-MS-MS-Methode (collision induced dissociation) führt darüber hinaus zum Auftreten charakteristischer Fragmentationen. Exemplarisch sind in Abb. 83 die QTOF-MS/MS-Spektren von Faradiol 3-myristat (**11a**) bzw. Arnitriol A 3-myristat (**6a**) sowie die jeweils postulierten Fragmentierungsschemata (Abb. 84 und Abb. 85) dargestellt. Dabei werden mit der sensitiven APCI-QTOF-MS/MS-Methode schrittweise die OH-Gruppen als Wasser bzw. die Fettsäure abgespalten. Der Triterpengrundkörper wird im Gegensatz zum EI-MS nicht fragmentiert.

Tab. 8: Übersicht über Retentionszeiten und  $[M+H]^+$ -Quasimolekülonen nach RP-C18-UHPLC-QTOF-MS/MS-Analyse der Triterpenmonoester aus *Calendula*-Blüten.

Verb.	Name	Formel	$t_R$ (min)	$m/z$ (berechnet)	$m/z$ (gefunden)
5a	Dammarendiol II 3-myristat	$C_{44}H_{79}O_3^+$	6,20	655,6024	655,5677*
5b	Dammarendiol II 3-palmitat	$C_{46}H_{83}O_3^+$	7,52	683,6337	683,5972*
6a	Arnitriol A 3-myristat	$C_{44}H_{77}O_4^+$	5,80	669,5816	669,5918
6b	Arnitriol A 3-palmitat	$C_{46}H_{81}O_4^+$	6,64	697,6129	697,6268
7a	Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-myristat	$C_{44}H_{79}O_4^+$	4,97	671,5973	671,5955
7b	Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-palmitat	$C_{46}H_{83}O_4^+$	5,83	699,6286	699,6293
8a	Maniladiol 3-myristat	$C_{44}H_{77}O_3^+$	6,52	653,5867	653,5948
8b	Maniladiol 3-palmitat	$C_{46}H_{81}O_3^+$	7,80	681,6180	681,6218
10	Faradiol	$C_{30}H_{51}O_2^+$	2,36	443,3884	443,3863
11a	Faradiol 3-myristat	$C_{44}H_{77}O_3^+$	6,74	653,5867	653,5912
11b	Faradiol 3-palmitat	$C_{46}H_{81}O_3^+$	8,02	681,6180	681,6252
12a	Arnidiol 3-myristat	$C_{44}H_{77}O_3^+$	6,52	653,5867	653,5922
12b	Arnidiol 3-palmitat	$C_{46}H_{81}O_3^+$	7,77	681,6180	681,6153

\*:  $[M+H]^+$ -Quasimolekülonen nur im „direct infusion“ Modus ohne vorherige UHPLC-Trennung

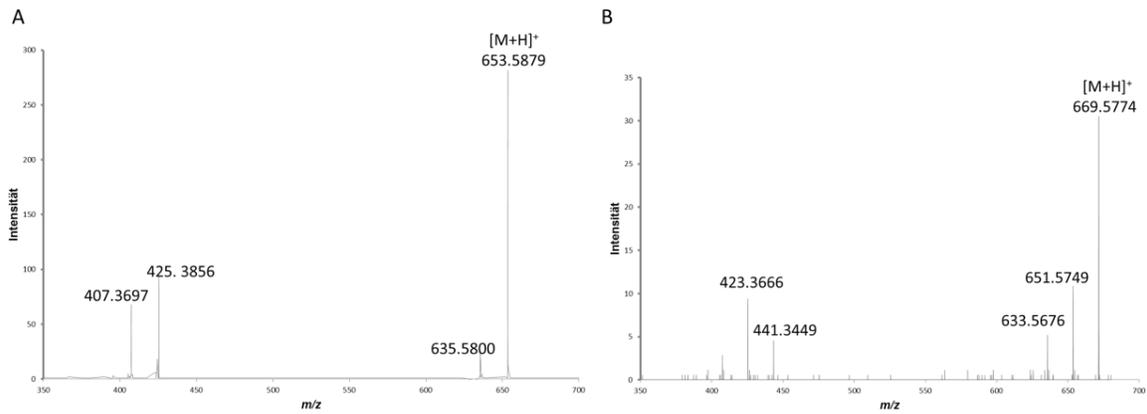


Abb. 83: QTOF-MS/MS-Spektren nach Kinetex-C18-UHPLC-Trennung von A) Faradiol 3-myristat (11a) und B) Arnitriol A 3-myristat (6a) mit charakteristischer Fragmentierung.

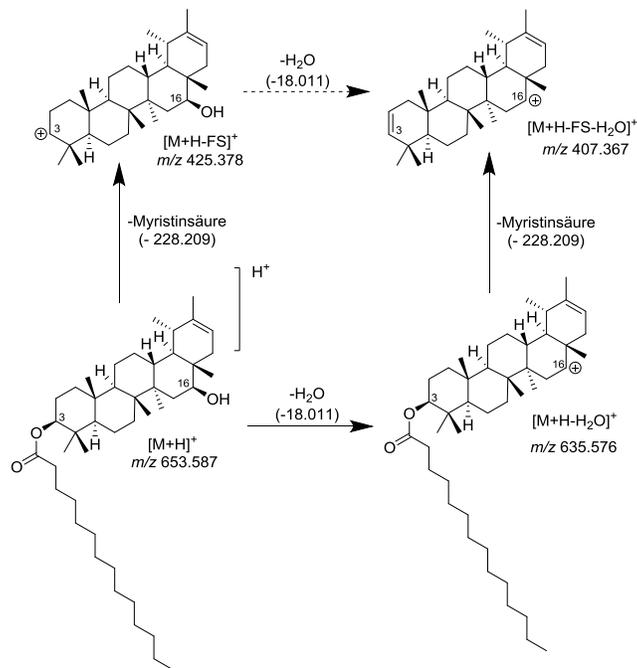


Abb. 84: Postuliertes Fragmentierungsschema von Faradiol 3-myristat (11a) aufgrund der MS/MS-Analyse.

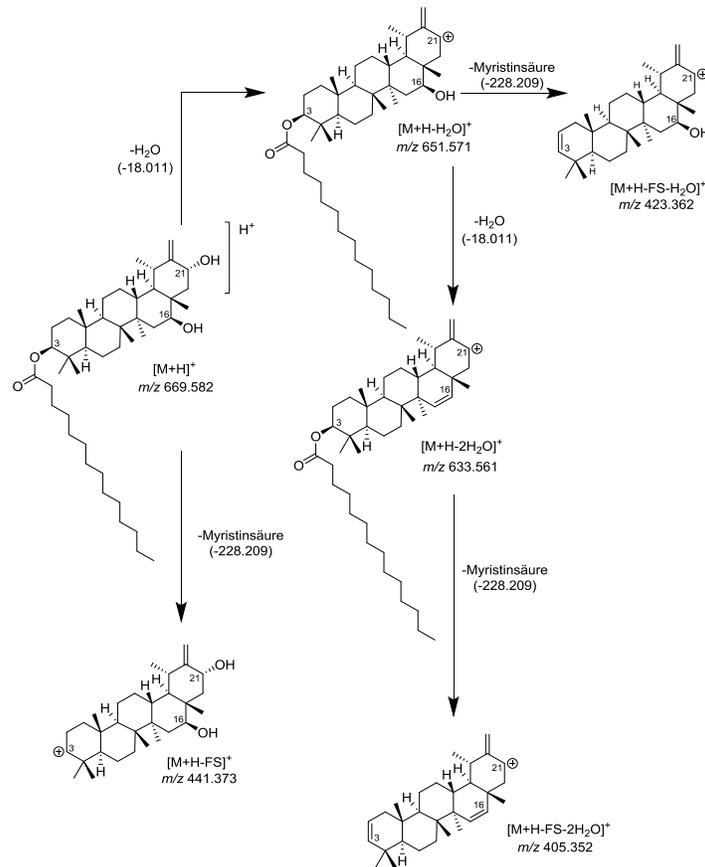


Abb. 85: Postuliertes Fragmentierungsschema von Arnitriol A 3-myristat (6a) aufgrund der MS/MS-Analyse.

Bei den Dammarendiol II 3-monoestern (**5a+b**) waren die  $[M+H]^+$ -Ionen aufgrund der Seitenkette mit der gebundenen OH-Gruppe an C-20 wesentlich instabiler als bei den pentazyklischen Triterpendiolmonoestern, sodass die  $[M+H]^+$ -Quasimolekülonen nur im „direct infusion“-Modus ohne vorherige C18-UHPLC-Trennung nachweisbar waren (Abb. 86).

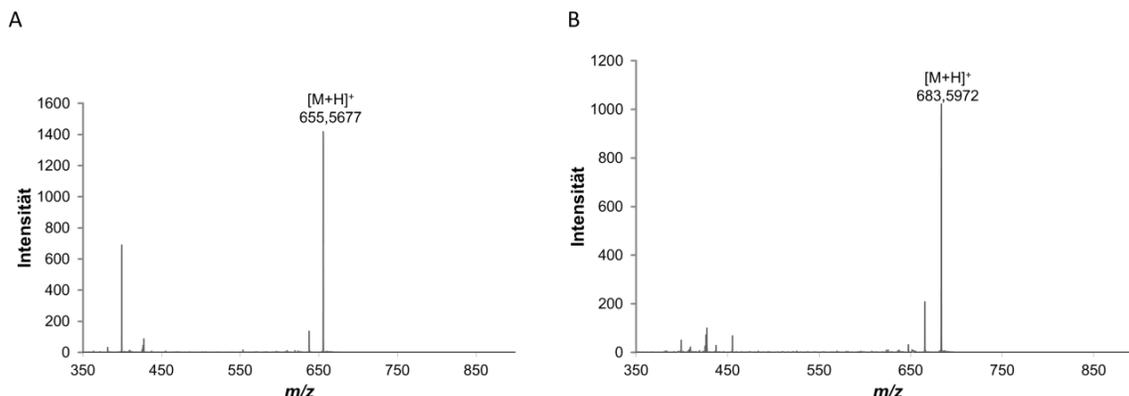


Abb. 86: Direkteinlass MS/MS-Spektren von Verbindung 5a (A) und Verbindung 5b (B) zum Nachweis der  $[M+H]^+$ -Quasimolekülonen.

### 3.1.11.2 Trennung und Charakterisierung der Faradiol 3,16-diester mittels HPLC-APCI-QTOF-MS

Für die Identifizierung der Faradiol 3,16-diester (**1 - 4**) konnten zwar mit der „direct infusion“ QTOF-MS/MS-Analyse im MCA-Modus (multichannel averaging acquisition) die intakten  $[M+H]^+$ -Ionen nachgewiesen werden (siehe Tab. 9), aber eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen **2** und **3** war anhand der MS/MS-Fragmentierung und des  $[M+H]^+$ -Ions aufgrund der gleichen Molekülmasse nicht möglich. Daher wurden Faradiol 3,16-diester-Standards mittels der Steglich Reaktion aus Faradiol bzw. Faradiol 3-myristat und -palmitat hergestellt. Das so erhaltene Faradiol 3,16-dimyristat (FMM), Faradiol 3-myristat,16-palmitat (FMP), Faradiol 3-palmitat,16-myristat (FPM) und Faradiol 3,16-dipalmitat (FPP) wurde jeweils mittels HPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Methode und Verwendung eines eigens synthetisierten RP-C30-Säulenmaterials und eines Methanol / 2-Propanol-Gradienten analysiert. Eine chromatographische Trennung mit einem gewöhnlichen

RP-C18-Säulenmaterial war aufgrund einer größenausschlussbedingten Elution der Diester nicht möglich. Die HPLC-Trennung (siehe Abb. 87) zeigte eine vollständige Trennung von FMM und FPP, die beiden isomeren FMP und FPM konnten leicht angetrennt werden (siehe Abb. 87, punktierte Linie). Hierbei wurden die XICs übereinandergelegt. Aufgrund der Instabilität der  $[M+H]^+$ -Ionen wurde die extrahierte TOF-MS-Ionenspur (XIC) für das Ion  $[M+H-FS]^+$  ausgewählt, und zwar  $m/z$  635,5761 (Myristat an C-3) und  $m/z$  663,6074 (Palmitat an C-3). Die Entstehung der Fragmente ist exemplarisch für Faradiolmono- und diester mit Palmitat an C-3 in Abb. 90. dargestellt.

Das Vorliegen von Faradiol 3,16-dimyristat (**1**) und Faradiol 3,16-dipalmitat (**4**) konnte danach leicht anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums erfolgen. Schwieriger war es bei den beiden gemischten Faradioldiestern **2** und **3**. Die im „direct infusion“-Modus aufgenommenen Massenspektren der beiden Standardverbindungen FMP und FPM (siehe Abb. 88) zeigten zwar eine bevorzugte Abspaltung der an C-16 veresterten Fettsäure, was an den unterschiedlichen Intensitäten für  $m/z$  663,6035 und  $m/z$  635,5785 ersichtlich war. Aus dem Massenspektrum der Verbindungen **2** und **3** (siehe Abb. 89) war aber keine Aussage möglich, ob beide gemischten Faradioldiester vorlagen. Erst die RP-C30-HPLC-APCI-QTOF-MS-Analyse der Verbindungen **1** - **4** zeigte, dass bei der Retentionszeit von ca. 18 min Ionen sowohl bei  $m/z$  635,5761 (rot) als auch bei  $m/z$  663,6074 (blau) auftraten, was das Vorliegen von Faradiol 3-myristat,16-palmitat (**2**) sowie von Faradiol 3-palmitat,16-myristat (**3**) eindeutig belegte. Mengenmäßig dominierte Faradiol 3-myristat,16-palmitat (**2**).

Tab. 9: Übersicht über Retentionszeiten und  $[M+H]^+$ -Ionen nach RP-C30-HPLC-QTOF-MS/MS-Analyse der Verbindungen **1** - **4** aus *Calendula*-Blüten.

Verb.	Name	Formel	$t_R$ (min)	$m/z$ (berechnet)	$m/z$ (gefunden)
1	Faradiol 3,16-dimyristat	$C_{58}H_{103}O_4^+$	15,68	863,78510	863,7815
2	Faradiol 3-myristat,16-palmitat	$C_{60}H_{107}O_4^+$	18,10	891,81639	891,8181
3	Faradiol 3-palmitat,16-myristat	$C_{60}H_{107}O_4^+$	18,54	891,81639	891,8181
4	Faradiol 3,16-dipalmitat	$C_{62}H_{111}O_4^+$	20,84	919,84769	919,8358

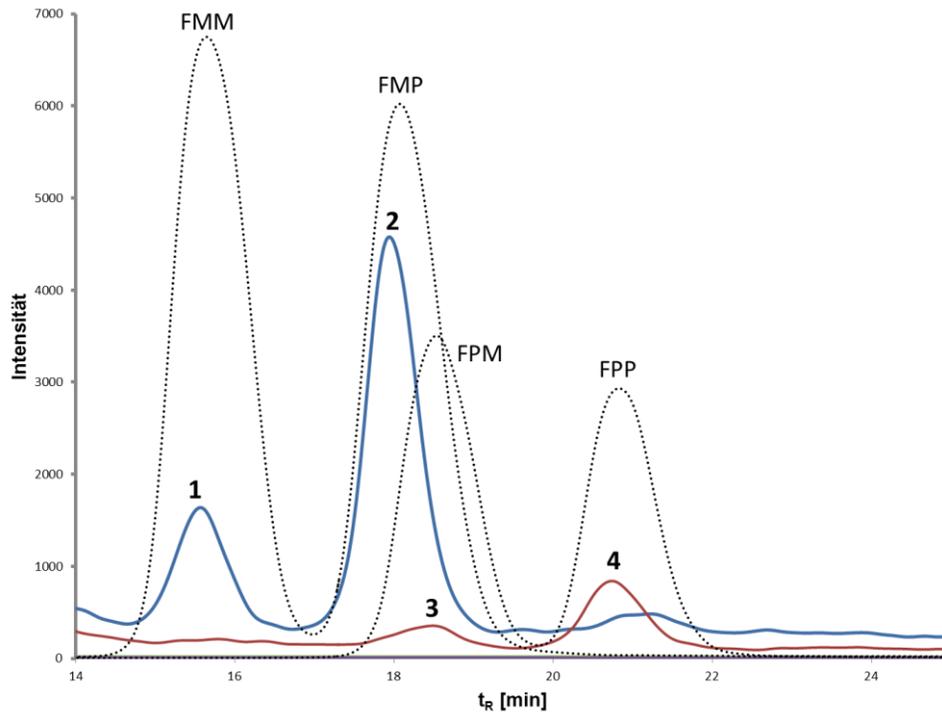


Abb. 87: HPLC-APCI-QTOF MS-Analyse der Verbindungen 1 – 4 und Überlagerung mit den Standardsubstanzen. Extrahierte TOF-MS-Ionenspuren (XICs) für  $m/z$  635,5761 (blau) und  $m/z$  663,6074 (rot). Synthetisierte Faradiol 3,16-diester-Standards (punktiert): Faradiol 3,16-dimyristat (FMM), Faradiol 3-myristat,16-palmitat (FMP), Faradiol 3-palmitat,16-myristat (FPM), Faradiol-3,16-dipalmitat (FPP).

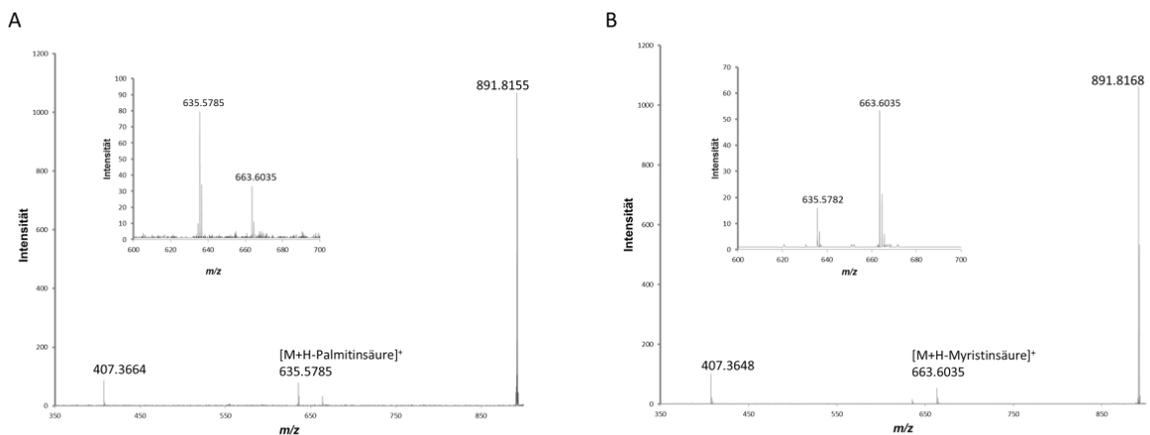
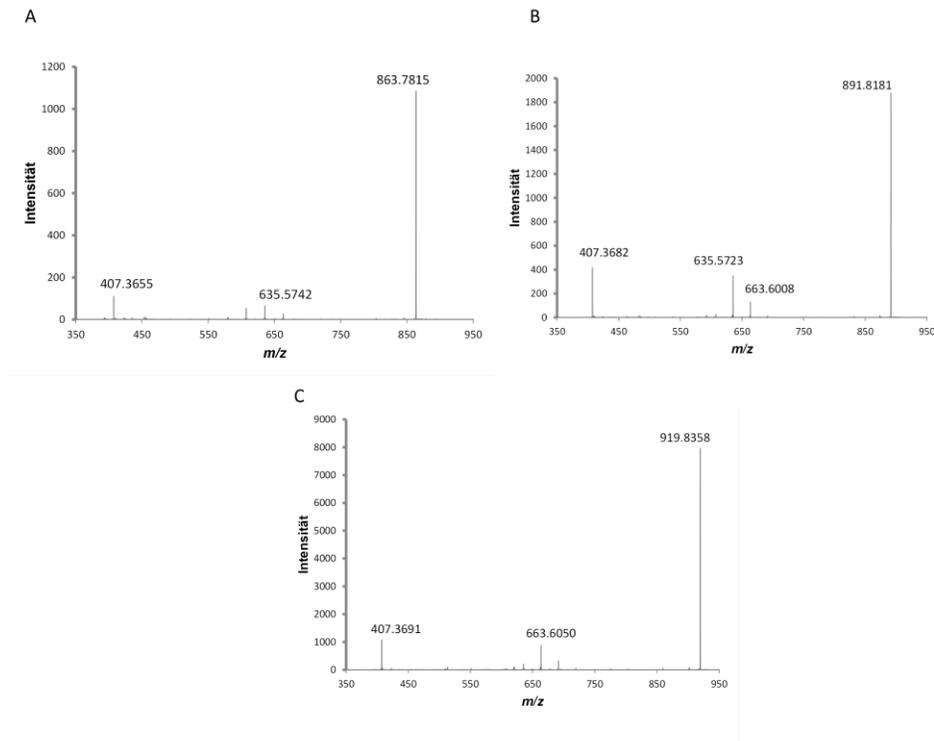
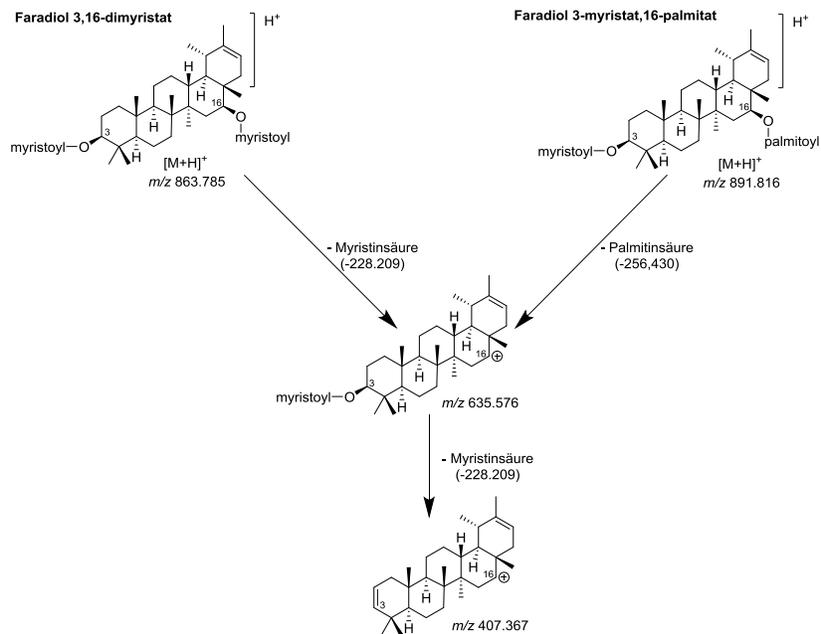


Abb. 88: „Direct infusion“-MS-Spektren der synthetischen Standards der gemischten Diester, Faradiol 3-myristat,16-palmitat (FMP) (A) und Faradiol 3-palmitat,16-myristat (FPM) (B).



**Abb. 89:** „Direct infusion“-MS/MS-Spektren der Verbindungen 1 - 4. TOF-MS/MS-Spektren im MCA-Modus von Verbindung 1 (A), Verbindungen 2 und 3 (B) Verbindung 4 (C).



**Abb. 90:** Postuliertes Fragmentierungsschema der Faradiol 3,16-diester mit einem Myristoylrest an C-3 aufgrund der MS/MS-Analyse. Für einen Palmitoylrest an C-3 entstehen entsprechend  $m/z$  663,6074 und  $m/z$  407,3672.

3.1.12  **$\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat (17) und Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat) (18)**

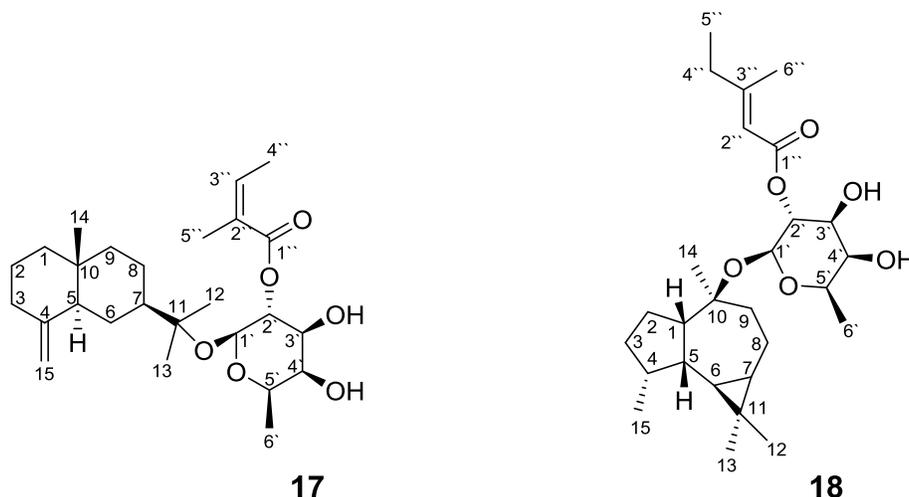


Abb. 91: Strukturen der Verbindungen 17 und 18.

Die Verbindungen **17+18** wurden in einer Fraktion nach SC-Trennung der Fraktion I.13.II.5 zu 16,2 mg isoliert. Auf einem analytischen DC mit FM 2 erschien diese Fraktion als violette Bande mit sehr niedrigem  $R_f$  von 0,21.

Das HR-APCI-Massenspektrum im negativen Modus (Abb. 92) gab einen Hinweis auf 2 Hauptverbindungen mit den Summenformeln  $C_{26}H_{42}O_6Cl$  ( $m/z$  485,2674) und  $C_{27}H_{44}O_6Cl$  ( $m/z$  499,2831), die das Vorliegen von Sesquiterpenglycosiden, die an der Zuckereinheit mit einer kurzkettigen organischen Säure verestert waren, vermuten ließen (Jakupovic et al., 1988). Die Fraktion wurde zunächst sauer hydrolysiert, um den Zuckerrest mit der Estergruppe abzuspalten, die Sesquiterpengrundkörper mit Petrolether ausgeschüttelt und diese mittels GC-MS analysiert. Die Massenspektren zu den 2 Hauptpeaks  $t_R = 6,193$  min und  $7,664$  min wurden mit der NIST11-Datenbank abgeglichen. Zum einen wurde Viridifloren ( $t_R = 6,193$  min) und zum anderen  $\beta$ -Eudesmol (Peaks bei  $t_R = 7.668$  min) als mögliche Strukturen vorgeschlagen (Abb. 93 und Abb. 94). Der Peak bei  $m/z$  204 des Viridiflorens könnte aufgrund der Instabilität des Viridiflorols durch bevorzugte Abspaltung der OH-Gruppe an C-10 als Wasser  $[M-H_2O]^+$  entstanden sein.

Für die weitere Strukturaufklärung wurden 1D- und 2D-NMR-Spektren von der Fraktion aufgenommen. Das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Abb. 96) zeigte eine Reihe von Signalen mit höherer Intensität, die demnach der Hauptverbindung dieser Fraktion zugeordnet werden konnten. Die Signale bei  $\delta_{\text{C}}$  150,9 (C-4) und  $\delta_{\text{C}}$  105,4 (C-15) sowie bei  $\delta_{\text{H}}$  4,40 (H-15a) und  $\delta_{\text{H}}$  4,49 (H-15b) waren charakteristisch für die Exomethylen-Gruppe am 6-Ring des  $\beta$ -Eudesmols. Gestützt wurde die Lage der Exomethylen-Gruppe durch die Fernkopplung von H-15a ( $\delta_{\text{H}}$  4,40) und H-15b ( $\delta_{\text{H}}$  4,69) mit C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  36,9) und C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  49,8) im HMBC-Spektrum (Abb. 99). Durch die Fernkopplungen von C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  48,5) und von C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  80,0) mit H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  1,17) und H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1,23) wurde das Vorliegen des Isopropanoyl-Rests des  $\beta$ -Eudesmols bestätigt. Aus dem  $^{13}\text{C}$ -Spektrum konnten 15 weitere Signale dem Viridiflorol als zweiten Sesquiterpengrundkörper zugeordnet werden. Der Dimethylcyclopropan-Ring wurde durch die im  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Abb. 97) auftretenden Kopplungen von H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  0,05) mit H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  0,57) sowie von H-6 mit H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1,69) und H-7 mit H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  1,52) bestätigt. Die Position der acetalischen O-Gruppe an C-10 wurde durch die Fernkopplung von C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  81,7) mit H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1,20) bestätigt. Eine Reihe von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signalen, die nicht zu den Sesquiterpengrundkörpern gehörten, konnten dem  $\beta$ -D-Fucopyranosid-Rest als Zuckereinheit der Sesquiterpenglycoside zugeordnet werden. Dabei gab es bei  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signalen eines C-Atoms leichte Unterschiede (z.B. für C-1 94,6 und 95,1 ppm), die aus den unterschiedlichen Sesquiterpengrundkörper und den gebundenen Säureresten resultierten. Da es aber bei den  $^1\text{H}$ -NMR-Signalen keine Unterschiede gab, konnte davon ausgegangen werden, dass an beiden Sesquiterpenen ein  $\beta$ -D-Fucopyranosid-Rest mit einer Estergruppe an C-2' gebunden war. Der Vergleich der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte (siehe Tab. 10 und Tab. 11) mit Literaturangaben bestätigte das Vorliegen von  $\beta$ -Eudesmol- und Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid mit einer am Zucker gebundenen Säure (D'Ambrosio et al., 2015).

Die restlichen  $^{13}\text{C}$ -Signale konnten einer kurzkettigen organischen Säure zugeordnet werden. Anhand der Summenformeln aus dem APCI-MS im Negativ-Modus war ersichtlich, dass eine  $\text{C}_5$ -Säure (Angelica-, Tiglin- oder Seneciosäure) und

eine C<sub>6</sub>-Säure (3-Methyl-2-Pentensäure) vorlagen (Jakupovic et al., 1988). Die <sup>13</sup>C-Signale [ $\delta_C$  168,0 (C-1''), [ $\delta_C$  127,2 (C-2'')] und [ $\delta_C$  139,4 (C-3'')] konnten Angelica- oder Tiglinsäure zugeordnet werden. Anhand des <sup>1</sup>H-Signals von H-3'' ( $\delta_H$  6,12) konnte der Angelicoyl-Rest als vorliegende C<sub>5</sub>-Säure belegt werden (siehe Abb. 95). Die verbleibenden <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Signale konnten dem 3-Methyl-2-Pentenoyl-Rest zugeordnet werden (D'Ambrosio et al., 2015). Allerdings konnte anhand der NMR-Analysen nicht bestimmt werden, welcher Säurerest an der  $\beta$ -D-Fucopyranose welches Sesquiterpengrundkörpers gebunden war. Erst die von Dr. Michele D'Ambrosio durchgeführte HPLC-DAD-ELS (Evaporative Light Scattering)- und LC-MS-Analyse mit einer Kinetex RP-C18-Säule und Acetonitril (A) und Acetonitril / Wasser 1:1 (B) als mobile Phase in einer Gradientenelution (10 – 60 % A von 0 – 45 min, 60 – 10 % A von 45 – 47 min) der vorliegenden Fraktion mit einem Vergleich der Retentionszeiten der 2 Hauptpeaks (siehe Abb. 100) mit den aus *C. officinalis* isolierten Vergleichssubstanzen bewiesen die Strukturen von  $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2''-O-angelat (**17**) als Hauptverbindung und Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2''-O-(3''-methyl-pentenoat) (**18**) (siehe auch (D'Ambrosio et al., 2015)).

In der Literatur sind bereits für *Calendula persica*, *Calendula arvensis* und *Calendula officinalis* Viridiflorol- und  $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid mit verschiedenen kurzkettigen gesättigten und ungesättigten, organischen Säuren, darunter auch Angelica- und 3-Methyl-2-Pentensäure, die an der 2''-Position des Zuckers gebunden sind (siehe Abb. 91), beschrieben worden (D'Ambrosio et al., 2015; Jakupovic et al., 1988; Pizza and De Tommasi, 1988).

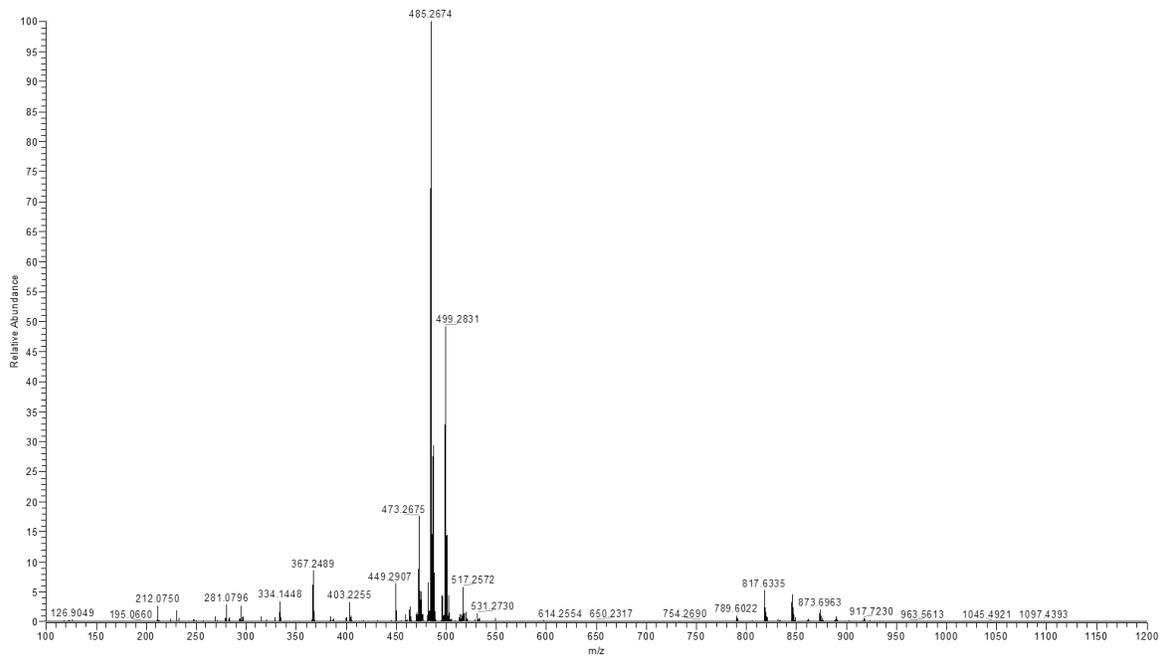


Abb. 92: HR-APCI-Massenspektrum im negativen Modus der Verbindungen 17+18.

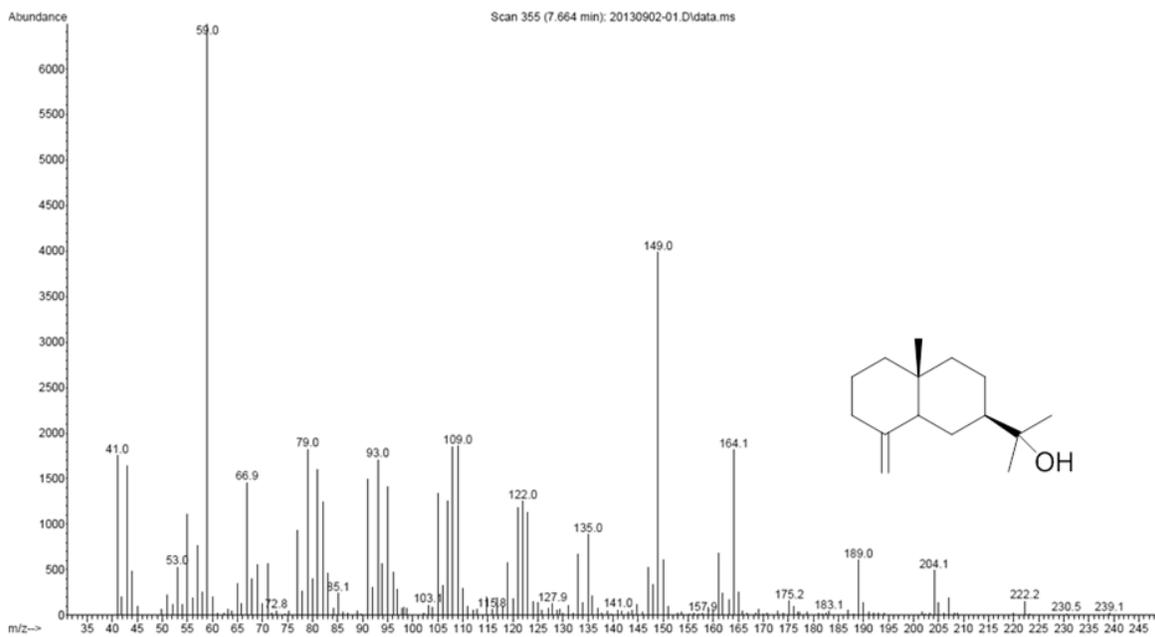


Abb. 93: EI-Massenspektrum der Verbindung 17 nach saurer Hydrolyse.

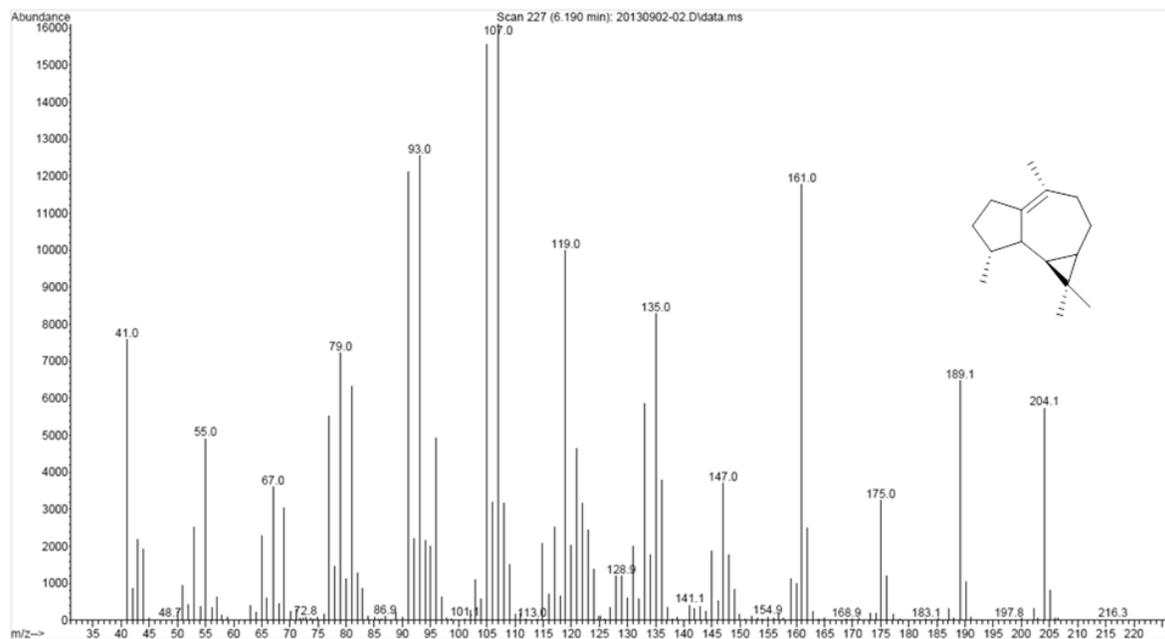


Abb. 94: EI-Massenspektrum der Verbindung 18 nach saurer Hydrolyse.

Tab. 10:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindung 17 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Werte zu  $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat (nach (D'Ambrosio et al., 2015)).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ [Lit.]	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) [Lit.]
1	41,2	41,0	1,20 m	1,18 dd (13,0, 3,6)
			1,45 m	1,44 m
2	24,5	23,4	1,60 m	1,58
3	36,9	36,7	1,99 m	1,96 brq (11,0)
			2,30 m	2,27 brd (13,3)
4	150,9	150,8		
5	49,8	49,6	1,70 m	1,69 brd (12,2)
6	24,4	24,4	1,07 m	1,07 q (12,1)
			1,63 m	1,64 dq (12,8, 2,7)
7	48,5	48,4	1,44 m	1,43 tt
8	22,2	22,0	1,27 m	1,23 m
			1,55 m	1,53 m
9	41,9	41,7	1,24 m	1,24 m
			1,41 m	1,40 brd (13,0)
10	36,0	35,8		
11	80,0	79,7		
12	22,6	22,7	1,17 s	1,15 s
13	24,9	24,8	1,23 s	1,21 s
14	16,3	16,2	0,68 s	0,66 s

Fortsetzung Tab. 10.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
15	105,4	105,2	4,40 s	4,39 brs
			4,69 s	4,66 brs
Zucker				
1`	95,1	94,8	4,63 d (8)	4,60 d (7.5)
2`	73,3	73,2	4,97 dd (9.6, 8)	4,94 dd (9.6, 7.5)
3`	73,7	73,6	3,68 m	3,67 dd (9.6, 3.4)
4`	72,1	71,8	3,70 m	3,71 dd (3.4, 0.7)
5`	69,9	69,8	3,62 m	3,63 qd (6.6, 0.7)
6`	16,5	16,4	1,33 d (6,4)	1,32 d (6.6)
Acyl				
1``	168,0	167,8		
2``	127,0	126,9		
3``	139,6	139,6	6,13 qq (8, 1.6)	6,11 qq (7.3, 1.4)
4``	15,9	16,0	2,03 dq (7.3, 1.5)	2,00 dq (7.3, 1.5)
5``	20,6	20,5	1,92 brs	1,90 m (1.5, 1.4)

Tab. 11:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindung 18 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Werte zu Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat) (nach (D'Ambrosio et al., 2015)).

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
1	53,9	53,8	1,89 m	1,88 m
2	25,5	25,5	1,50 m	1,60 m
3	28,8	28,7	1,20 m	1,25 m
			1,80 m	1,79 m
4	38,3	38,1	1,94 m	1,91 m
5	39,5	39,4	1,69 m	1,67 m
6	22,1	22,0	0,05 dd (9.6, 9.6)	0,03 t (9.5)
7	28,9	28,8	0,57 ddd (9.6, 9.6, 7.2)	0,55 ddd (9.5, 9.5, 7.6)
8	18,1	18,0	1,52 m	1,50 m
9	38,3	38,1	1,10 m	1,55 m
			1,75 m	1,74 m
10	81,7	81,5		
11	18,7	18,4		
12	16,1	16,0	0,86 s	0,84 s
13	29,4	28,6	0,99 s	0,96 s
14	26,6	26,6	1,20 s	1,18 s

Fortsetzung Tab. 11.

Position	$\delta_C$	$\delta_C$ [Lit.]	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_H$ (J in Hz) [Lit.]
15	16,5	16,1	0,88 d (6.8)	0,86 d (6.7)
Zucker				
1`	94,6	94,4	4,64 d (7.6)	4,61 d (7.9)
2`	72,6	72,4	4,92 dd (9.6, 8)	4,90 dd (9.5, 7.5)
3`	74,1	74,0	3,63 m	3,62 dd (9.5, 4.0)
4`	72,1	71,9	3,70 m	3,68 dd (4.0, 1.0)
5`	69,8	69,6	3,64 m	3,58 qd (6.5, 1.0)
6`	16,5	16,4	1,34 d (6.4)	1,31 d (6.5)
Acyl				
1``	166,9	166,7		
2``	113,7	113,6	5,65 m	5,67 m (1.3)
3``	163,8	163,5		
4``	34,0	33,9	2,19 m	2,18 qd (7.4, 1.2)
5``	11,5	11,7	1,01 t (9.6)	1,07 t (7.4)
6``	18,9	18,8	2,18 brs	2,17 d (1.2)

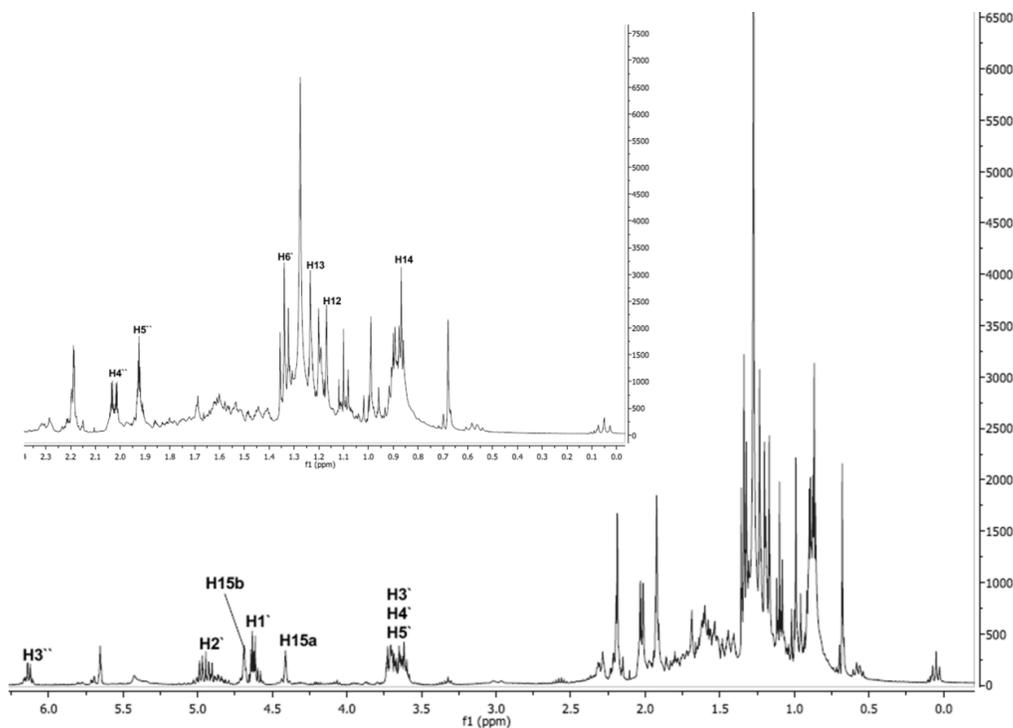


Abb. 95:  $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Zuordnung einiger  $^1\text{H}$ -Signale von Verbindung 17.

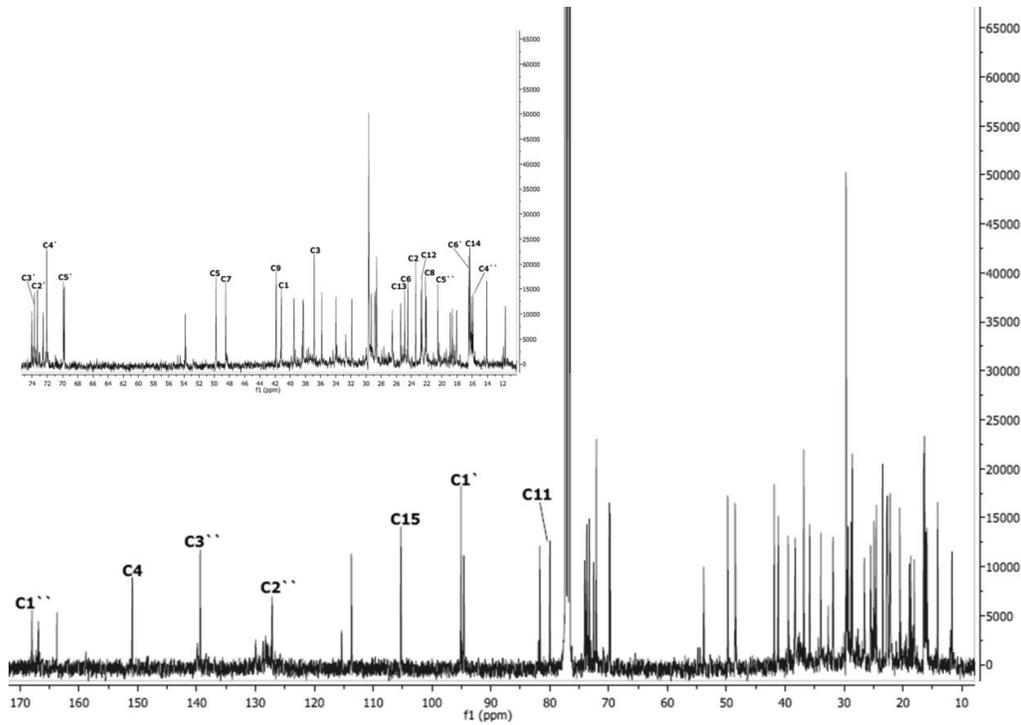


Abb. 96:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Signale von Verbindung 17.

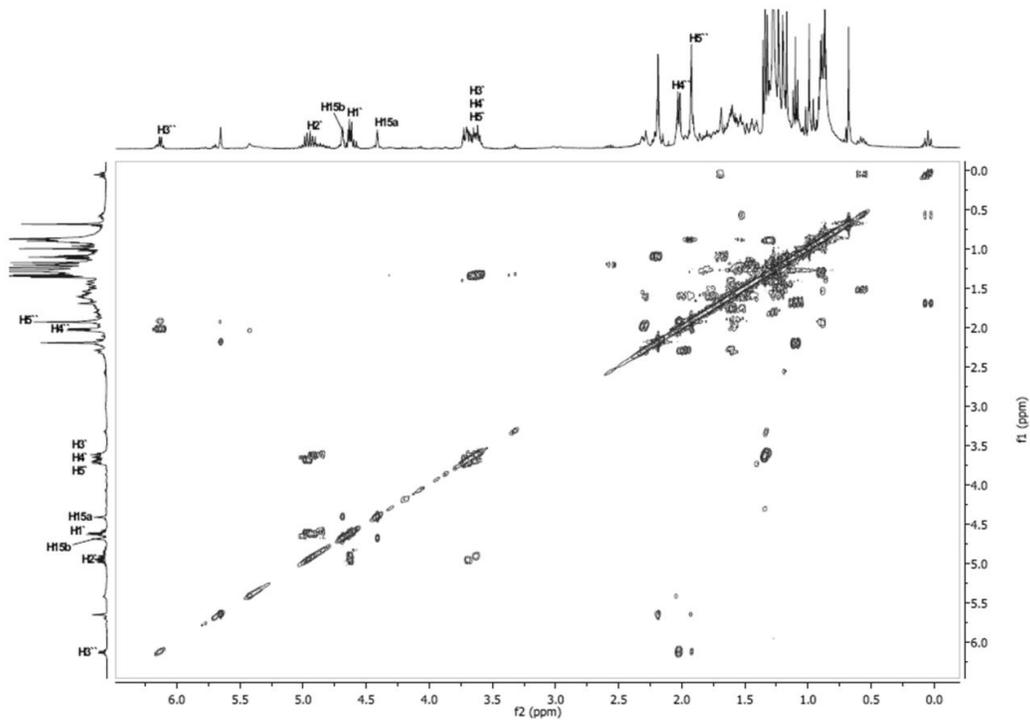


Abb. 97:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Zuordnung einiger  $^1\text{H}$ -Signale von Verbindung 17.

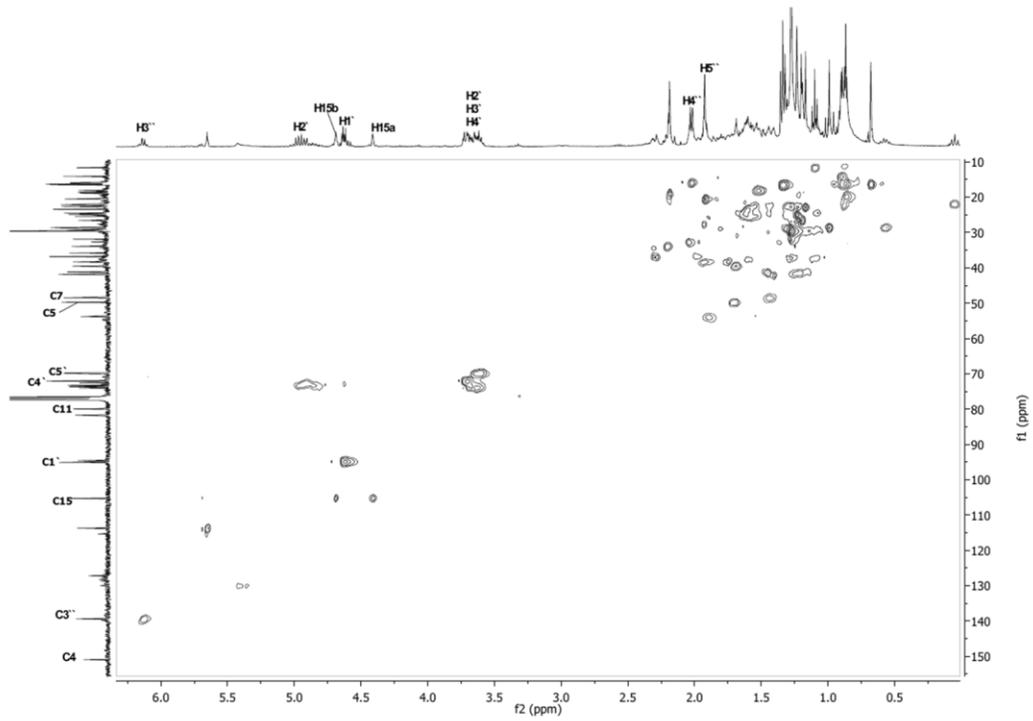


Abb. 98: HSQC-Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Zuordnung einiger  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale von Verbindung 17.

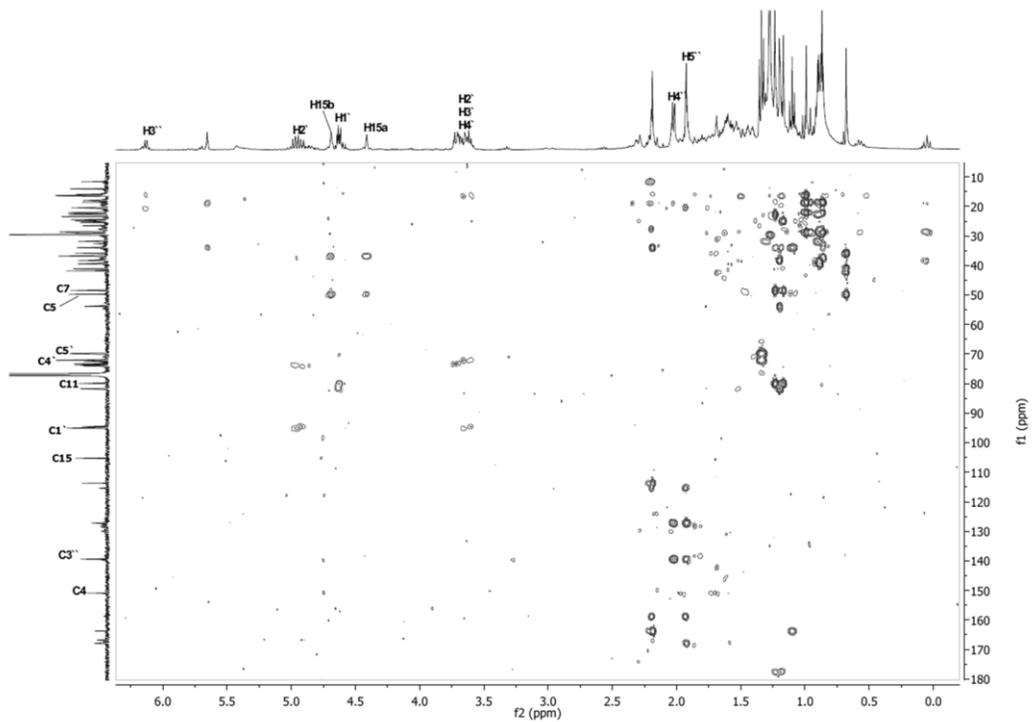


Abb. 99: HMBC-Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Zuordnung einiger  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale von Verbindung 17.

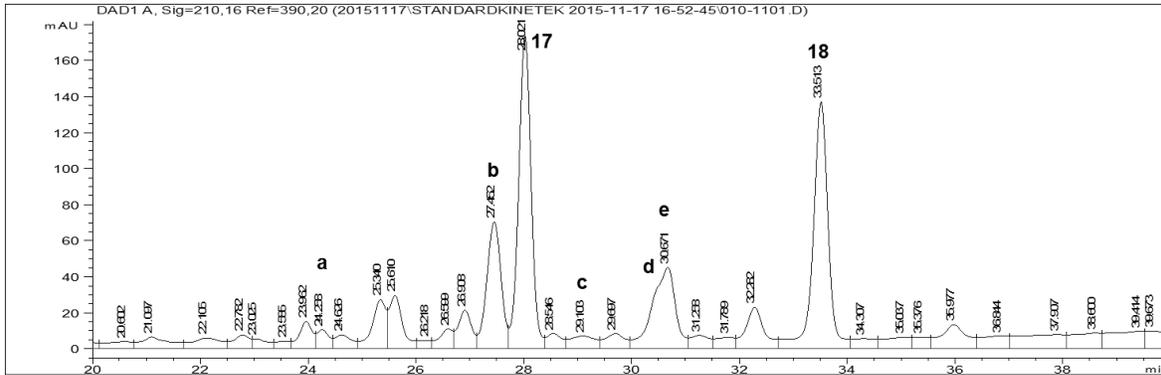


Abb. 100: Chromatogramm der HPLC-DAD-ELS-Analyse der Fraktion, in der die Verbindungen 17+18 angereichert waren (erstellt von Dr. M. D'Ambrosio).

### 3.1.12.1 Identifizierung weiterer Sesquiterpenglycoside

Mit Hilfe der HPLC-DAD-ELS-Analyse der vorliegenden Fraktion konnten neben den Hauptverbindungen 17+18 weitere Sesquiterpenglycoside über den Vergleich der Retentionszeiten der von Dr. M. D'Ambrosio isolierten Standards identifiziert werden. Die weiteren Sesquiterpenglycoside sind, bis auf Verbindung **a**, Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid (**b** - **d**) und  $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid (**e**), die mit anderen kurzkettigen organischen Säuren verestert sind (siehe Tab. 12). Verbindung **a** wurde als  $\alpha$ -Elemol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat (siehe Abb. 101) von ihm als neuer Naturstoff identifiziert (siehe (D'Ambrosio et al., 2015)).

Tab. 12: Weitere identifizierte Sesquiterpenglycoside nach HPLC-DAD-ELS-Analyse der Fraktion, in der die Verbindungen 17+18 angereichert waren.

Verb.	Name	$t_R$ (min)
a	$\alpha$ -Elemol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat	24,3
b	Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-senecionat / -tiglinat	27,4
c	Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-isobutyrat	29,1
d	Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat	30,5
e	$\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(2''-methyl)-butyrat	30,7
	$\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat)	31,2

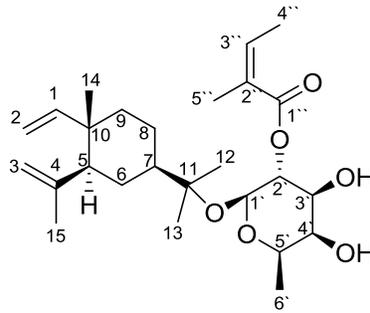


Abb. 101: Struktur von  $\alpha$ -Elemol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat.

## 3.2 Biologische Untersuchungen

### 3.2.1 *In vitro* Untersuchung verschiedener *Calendula*-Extrakte auf den Wundheilungsprozess

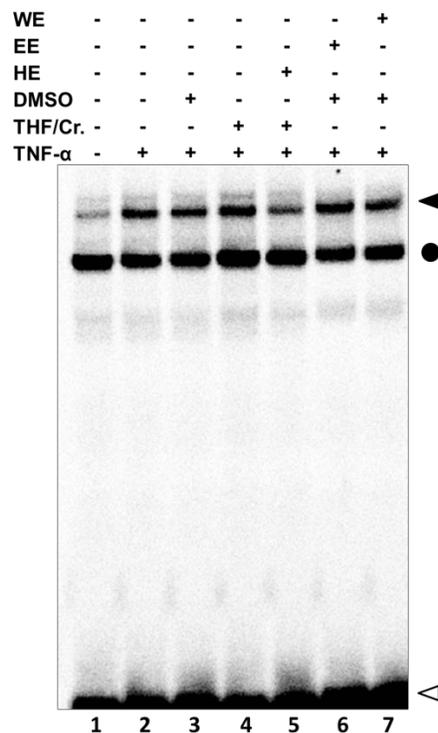
#### 3.2.1.1 Einfluss der *Calendula*-Extrakte auf die Inflammationsphase

Eine kurzzeitige und vorübergehende Inflammation ist für den Ablauf des Wundheilungsprozesses und den Übergang in die Gewebeneubildungsphase von entscheidender Bedeutung, wohingegen eine lang andauernde Entzündung zu chronischen Wunden führen kann (Gurtner et al., 2008). Ein zentraler Mediator im Entzündungsgeschehen ist hierbei der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der die Transkription verschiedener pro- und inflammatorischer Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren reguliert (Pahl, 1999).

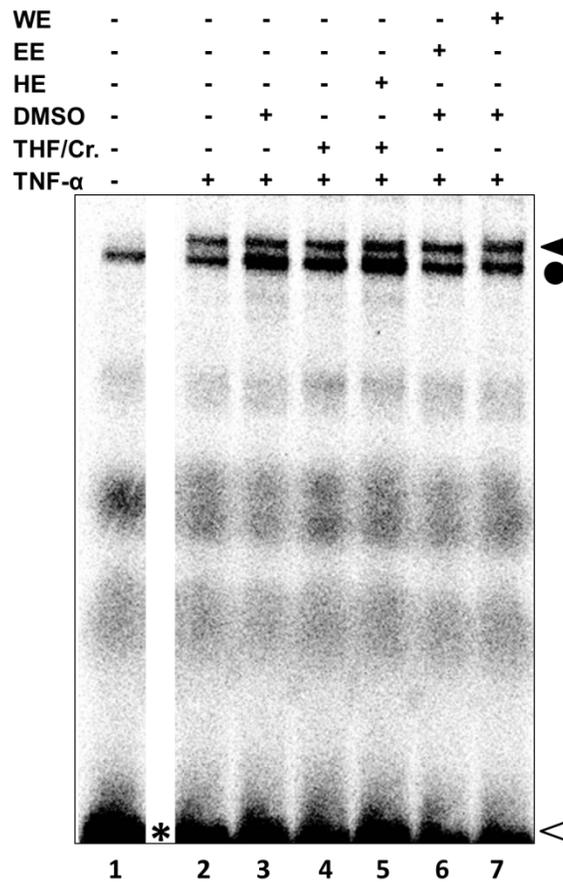
#### Untersuchung der *Calendula*-Extrakte auf Beeinflussung von NF- $\kappa$ B in humanen immortalisierten Keratinocyten und Fibroblasten

Um den Einfluss der *Calendula*-Extrakte auf die Inflammationsphase zu untersuchen, wurden humane immortalisierte Keratinocyten und primäre humane Fibroblasten für 7 h direkt oder für 6 h mit HE, EE oder WE verschiedener Konzentrationen behandelt, bevor die Zellen anschließend mit TNF- $\alpha$  für 1 h stimuliert wurden. Nach der Gewinnung der Proteingesamtextrakte wurde mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität untersucht. Sowohl in humanen immortalisierten Keratinocyten (siehe Abb. 102) als

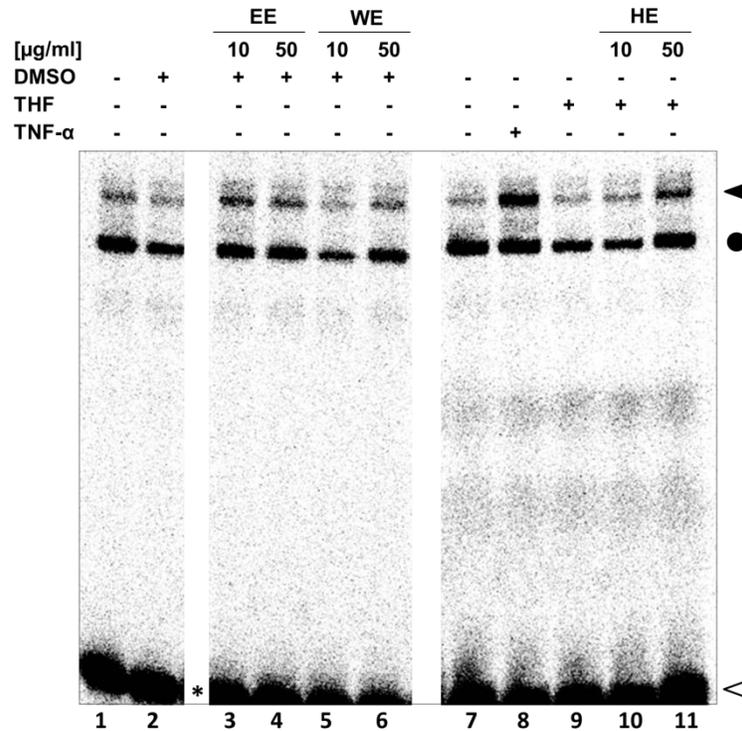
auch in humanen primären Fibroblasten (siehe Abb. 103) führte eine Behandlung der Zellen mit den *Calendula*-Extrakten in einer Konzentration von 50 µg/ml für 6 h nicht zu einer Reduktion der durch TNF-α induzierten NF-κB-DNA-Bindungsaktivität. Interessanterweise führte bei den humanen immortalisierten Keratinocyten die alleinige Stimulation mit 50 µg/ml HE bzw. EE für 7 h zu einer Steigerung der NF-κB-DNA-Bindungsaktivität (siehe Abb. 104) Dagegen blieb bei den humanen primären Fibroblasten die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität nach Inkubation der Zellen mit den *Calendula*-Extrakten in einer Konzentration von 50 µg/ml unbeeinflusst (siehe Abb. 105).



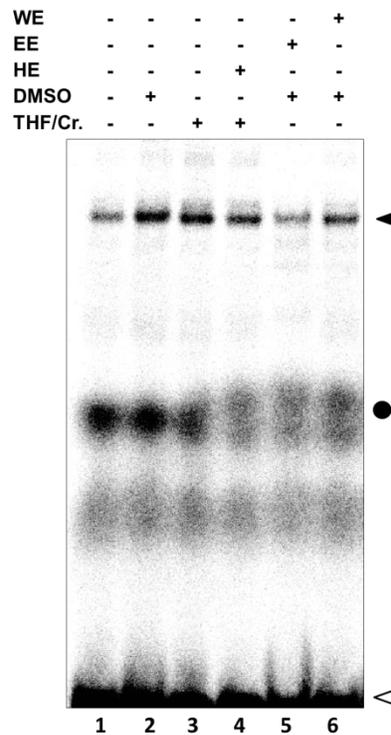
**Abb. 102: Untersuchung der *Calendula*-Extrakte auf die durch TNF-α induzierte NF-κB-DNA-Bindungsaktivität in humanen immortalisierten Keratinocyten.** Die Zellen wurden entweder mit DMSO 0,1 % (Bahn 3) oder THF/Cremophor-EtOH (THF/Cr.) 0,1 % (Bahn 4) als LM-Kontrollen, HE (Bahn 5), EE (Bahn 6) oder WE (Bahn 7) in einer Konzentration von 50 µg/ml für 6 h behandelt und anschließend mit TNF-α 4 ng/ml für 1 h stimuliert. Bahn 1 zeigt die unbehandelten Kontrollzellen. In Bahn 2 wurden die Zellen nur mit TNF-α 4 ng/ml für 1 h stimuliert. Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF-κB-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. Ein repräsentativer EMSA von 2 unabhängigen Versuchen ist abgebildet.



**Abb. 103: Untersuchung der *Calendula*-Extrakte auf die durch TNF- $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen primären Fibroblasten.** Die Zellen wurden entweder mit DMSO 0,1 % (Bahn 3) oder THF/Cremophor-EtOH (THF/Cr.) 0,1 % (Bahn 4) als LM-Kontrollen, HE (Bahn 5), EE (Bahn 6) oder WE (Bahn 7) in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml für 6 h behandelt und anschließend mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml für 1 h stimuliert. Bahn 1 zeigt die unbehandelten Kontrollzellen. In Bahn 2 wurden die Zellen nur mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml für 1h stimuliert. Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. \*: Ein Teil dieses EMSA-Bildes wurde ausgeschnitten. Ein repräsentativer EMSA von 2 unabhängigen Versuchen ist abgebildet.



**Abb. 104: Untersuchung der *Calendula*-Extrakte auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität in humanen immortalisierten Keratinocyten.** Die Zellen wurden entweder mit DMSO 0,1 % (Bahn 2), THF 0,1 % (Bahn 9) als LM-Kontrollen, EE (Bahnen 3 und 4), WE (Bahnen 5 und 6), HE (Bahnen 10 und 11) in einer Konzentration von 10 und 50 µg/ml für 7 h stimuliert oder nicht behandelt (Bahnen 1 und 7). In Bahn 8 wurden die Zellen mit TNF-α (4 ng/ml) als Positivkontrolle für 1h stimuliert. Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF-κB-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. \*: Ein Teil dieses EMSA-Bildes wurde ausgeschnitten. Die Banden 7 – 11 gehören zu einem eigenständigen EMSA. Ein repräsentativer EMSA von 3 unabhängigen Experimenten ist abgebildet.



**Abb. 105: Untersuchung der *Calendula-Extrakte* auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität in humanen primären Fibroblasten.** Die Zellen wurden entweder mit DMSO 0,1 % (Bahn 2) oder THF/Cremophor-Ethanol (THF/Cr.) 0,1 % (Bahn 3) als-LM Kontrollen, HE (Bahn 4), EE (Bahn 5) oder WE (Bahn 6) in einer Konzentration von 50 µg/ml für 7 h stimuliert oder nicht behandelt (Bahn 1). Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF-κB-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. Ein repräsentativer EMSA von 3 unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

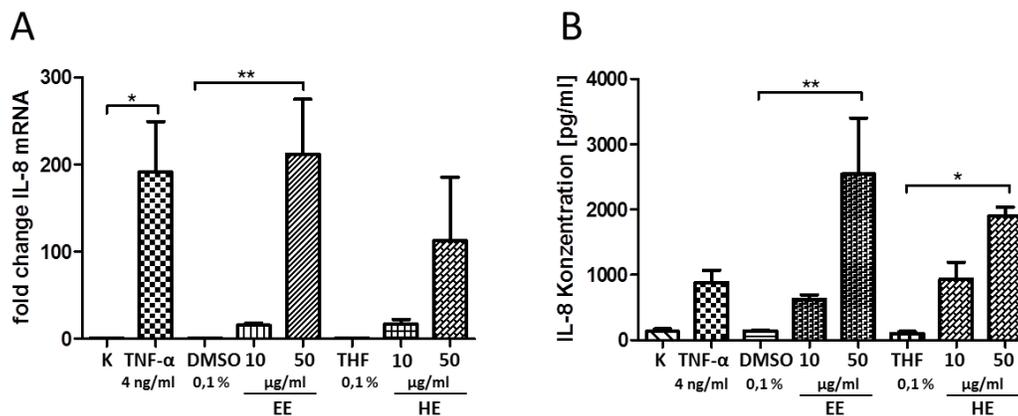
*Untersuchung von Calendula-Extrakten (HE, EE) auf die Beeinflussung von IL-8 auf mRNA- und Proteinebene*

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von NF-κB durch HE und EE nachfolgend zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität führt. Hierbei wurde das Chemokin Interleukin-8 (IL-8), das u.a. während der Inflammationsphase von Keratinocyten sezerniert wird, ausgewählt (Gröne, 2002; Kondo et al., 1993). Da bei den primären humanen Fibroblasten keine Beeinflussung der NF-κB-DNA-Bindungsaktivität durch die *Calendula-Extrakte* gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss von HE und EE auf IL-8 nur in humanen immortalisierten Keratinocyten untersucht.

Die Zellen wurden mit 10 oder 50  $\mu\text{g/ml}$  HE oder EE für 7 h stimuliert und die IL-8-mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Stimulation der Zellen mit 50  $\mu\text{g/ml}$  EE führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA von IL-8 (211,5-fach  $\pm$  SEM 63,4) während mit 50  $\mu\text{g/ml}$  HE nur eine tendenzielle Erhöhung der mRNA von IL-8 (112,6-fach  $\pm$  SEM 72,8) zu beobachten war (siehe Abb. 106 A).

Anschließend wurde mittels ELISA untersucht, ob es durch die beiden *Calendula*-Extrakte ebenfalls zu einem erhöhten Proteinspiegel von IL-8 kam. Hierzu wurden die humanen immortalisierten Keratinozyten 24 h mit 50  $\mu\text{g/ml}$  HE bzw. EE behandelt und IL-8 im Zellüberstand bestimmt. In beiden Fällen kam es zu einer signifikant erhöhten Konzentration an IL-8 (EE: 2540,2  $\text{pg/ml}$   $\pm$  SEM 861,9; HE: 1897,9  $\text{pg/ml}$   $\pm$  SEM 135,7) (siehe Abb. 106 B).

Unter den für den jeweiligen Versuch gewählten Stimulationsbedingungen wurde die Zellviabilität nicht beeinflusst (siehe Abb. 115 bis Abb. 118).



**Abb. 106: Beeinflussung von IL-8 auf die mRNA- (A) und Proteinebene (B) durch EE und HE in humanen immortalisierten Keratinozyten.** Die Zellen wurden entweder mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml als Positivkontrolle, EE oder HE in einer Konzentration von 10 und 50  $\mu\text{g/ml}$ , mit DMSO 0,1 % bzw. THF 0,1 % als LM-Kontrollen inkubiert oder wurden als Kontrolle nicht behandelt. A) Die mRNA wurde nach 7 h isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Daten sind als fold change der IL-8-mRNA in Bezug auf die entsprechende LM-Kontrolle angegeben. B) Die IL-8 Sekretion in den Zellüberstand wurde nach 24 h mittels ELISA bestimmt und ist in  $\text{pg/ml}$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

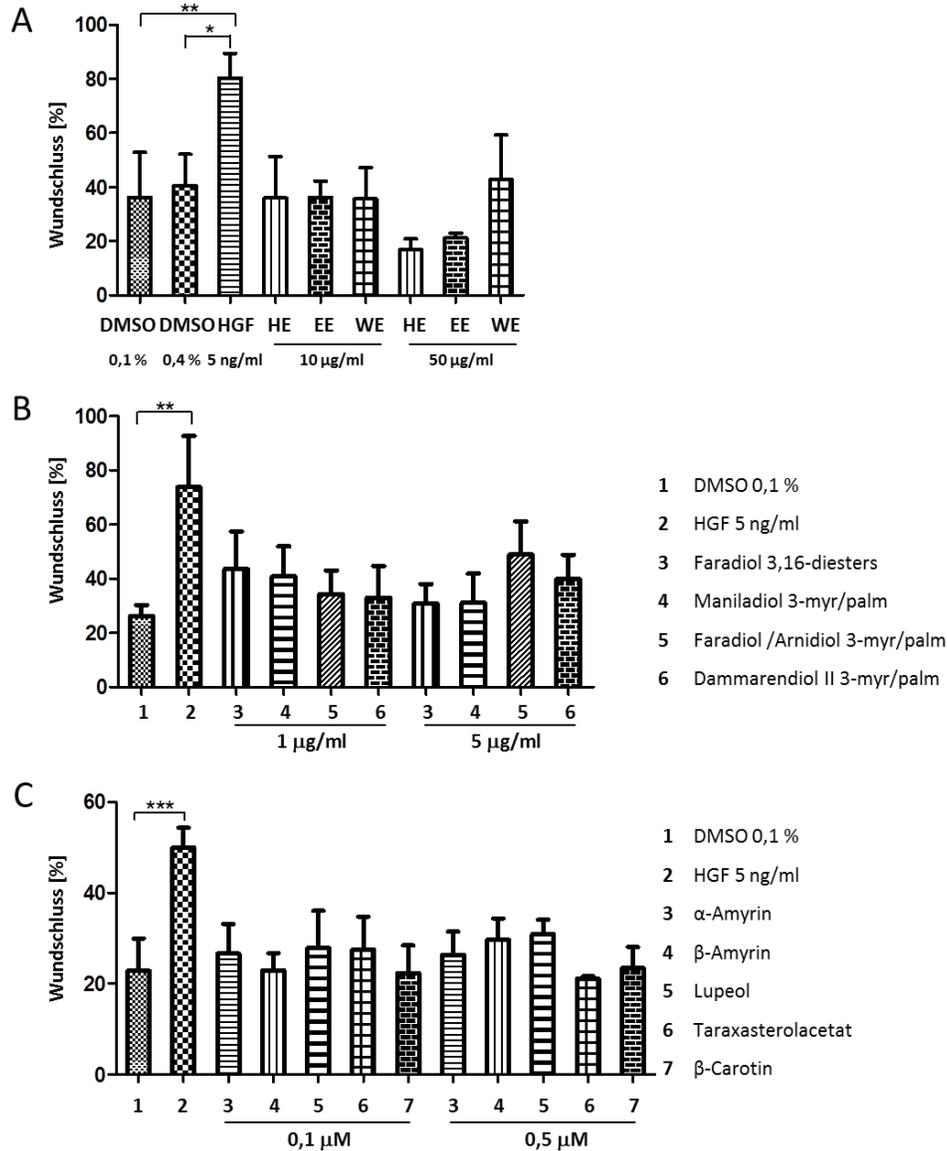
### 3.2.1.2 Einfluss der *Calendula*-Extrakten sowie einzelner Fraktionen und Einzelsubstanzen auf die Reepithelialisierung

Eine Beschleunigung der Reepithelialisierung durch Extrakte aus *Calendula-Blüten* konnte bereits *in vivo* an Ratten und Menschen nachgewiesen werden (Duran et al., 2005; Rao et al., 1991). Um diesen Vorgang, der durch die Migration und Proliferation von Keratinocyten in den Wundspalt gekennzeichnet ist, zu simulieren wird häufig der Scratch Assay herangezogen. Hierbei wird eine artifizielle Wunde in eine konfluente Zellschicht eingebracht und nach Behandlung der Zellen mit entsprechenden Stimuli die geschlossenen Zellflächen oder die Erhöhung der Zellzahl bestimmt. Die unten aufgeführten Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Susanne Junghanns durchgeführt.

Nach Generierung der artifiziellen Wunde in einer konfluenten Zellschicht wurden die humanen immortalisierten Keratinocyten mit den *Calendula*-Extrakten, aus HE isolierten Gemischen von Triterpenestern oder Triterpen-Standards bzw.  $\beta$ -Carotin in verschiedenen Konzentrationen stimuliert und nach 12 h die geschlossene Fläche in der artifiziellen Wunde bestimmt. Die Behandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{g/ml}$  der *Calendula-Extrakte* führte im Vergleich zur LM-Kontrolle zu keinem Effekt. Die Behandlung mit 50  $\mu\text{g/ml}$  WE zeigte keinen Effekt auf den Wundschluss, 50  $\mu\text{g/ml}$  EE bzw. HE führten aber zu einer Verringerung des Wundschlusses (siehe Abb. 107 A). Nach Stimulation mit den Triterpenen (Gemische der Ester und Standards) war zum Teil eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung des Wundschlusses nach 12 h zu beobachten (siehe Abb. 107 B und C). Insgesamt kann aber keine Aussage getroffen werden, welches der getesteten Triterpene den größten Effekt aufweist.  $\beta$ -Carotin hingegen hatte keinen Einfluss auf den Wundschluss nach 12 h (siehe Abb. 107 C).

Die Abnahme des Wundschlusses durch HE und EE bei 50  $\mu\text{g/ml}$  im Scratch-Assay dürfte auf zytotoxische Effekte zurückzuführen sein, weil es unter diesen Stimulationsbedingungen durch HE zu einer signifikanten (35,25 %  $\pm$  32,25) und

durch EE zu einer leichten Reduktion ( $82,07 \% \pm 8,54$ ) der Zellviabilität im MTT-Assay kam (siehe Abb. 116).



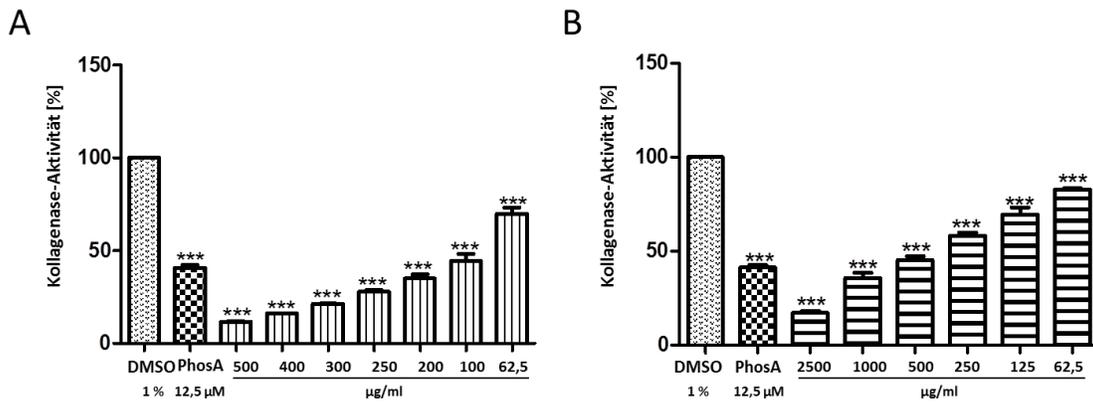
**Abb. 107: Untersuchung der *Calendula*-Extrakte, einiger seiner Triterpene und  $\beta$ -Carotins im Scratch Assay und Verwendung von humanen immortalisierten Keratinocyten und Stimulation von 12 h.** Die Zellen wurden entweder mit 5 ng/ml HGF als Positivkontrolle oder DMSO 0,1 % (im Fall von 50 µg/ml HE DMSO 0,4 %) als LM-Kontrolle inkubiert. A) Stimulation der Zellen mit den *Calendula*-Extrakten in Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml. B) Stimulation der Zellen mit Gemischen von Triterpenestern, die aus HE isoliert wurden, in Konzentrationen von 1 und 5 µg/ml. C) Stimulation der Zellen mit Triterpen-Standards (3 – 6) und  $\beta$ -Carotin in Konzentrationen von 0,1 und 0,5 µM. Die Daten sind als Wundschluss nach 12 h in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.2.1.3 Einfluss der *Calendula*-Extrakte auf den Kollagengehalt

Die HMPC und die Kommission E empfehlen den Einsatz von *Calendula*-Zubereitungen auch bei schlecht heilenden Wunden, die durch eine gestörte Bildung des Granulationsgewebes charakterisiert sind. Während der Bildung des Granulationsgewebes steht die Synthese und Sekretion der Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM), insbesondere des Kollagens als Hauptkomponente, im Vordergrund. Für lipophile und hydrophile Extrakte aus *Calendula*-Blüten konnte bereits in mehreren *in vivo* Studien eine Erhöhung des Kollagengehalts nachgewiesen werden (Aro et al., 2015; Naeini et al., 2012; Okuma et al., 2015). Diese Erhöhung kann zum einen durch eine gesteigerte Kollagensynthese in Fibroblasten oder durch Hemmung der für den Abbau des Kollagens verantwortlichen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bedingt sein.

#### *in vitro* Kollagenase-Inhibitions-Assay

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu humanen MMPs sollten die *Calendula*-Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf eine Reduktion der Aktivität einer aus *Clostridium histolyticum* isolierten Kollagenase untersucht werden. Der *in vitro* Kollagenase-Inhibitions-Assay wurde im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. M. Ganzera und Dr. A. Hartmann, Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck, wie in (Hartmann et al., 2015) beschrieben, durchgeführt. Sowohl EE als auch WE reduzierten signifikant die Aktivität der bakteriellen Kollagenase in einer konzentrationsabhängigen Weise (siehe Abb. 108 A und B). Allerdings war der Effekt von WE eher moderat. Bei einer Testkonzentration von 500 µg/ml wurde die Kollagenase-Aktivität auf 45,34 % ± SEM 1,96 gesenkt, wohingegen eine ähnliche Aktivitätssenkung mit EE bei einer Konzentration von 100 µg/ml erreicht werden konnte. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnte HE nicht in diesem Test untersucht werden.



**Abb. 108: Effekt von EE und WE aus *Calendula*-Blüten auf die bakterielle Kollagenase.** EE in Konzentrationen von 62,5 – 500 µg/ml (A) und WE in Konzentrationen von 62,5 – 2500 µg/ml (B) wurden im *in vitro* Kollagenase-Inhibitions-Assay unter Verwendung der aus *Clostridium histolyticum* isolierten Kollagenase untersucht. DMSO 1 % wurde als LM-Kontrolle und Phosphoramidon (PhosA) 12,5 µM als Positivkontrolle verwendet. Die Daten sind als Kollagenase-Aktivität in Bezug zur LM-Kontrolle (100 %) in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten ± SEM. \*\*\*p<0,001.

### Bestimmung des Kollagengehalts im Zellüberstand

Für die Bestimmung des löslichen Kollagens im Zellüberstand wurde der Sircol Collagen Assay, der bereits mehrfach in der Literatur bei Zellkulturen im Zusammenhang mit dem Einfluss von pflanzlichen Extrakten und Naturstoffen auf die Kollagensynthese beschrieben wurde, eingesetzt (Balekar et al., 2012; Moon et al., 2013; Sudsai et al., 2013). Dieser Assay beruht auf der Komplexbildung des löslichen Kollagens mit dem Farbstoff Picro Sirius Red und einer anschließenden photometrischen Bestimmung nach Auflösen dieses Komplexes in einer basischen Lösung (Lareu et al., 2010).

### Etablierung des Sircol Collagen Assays

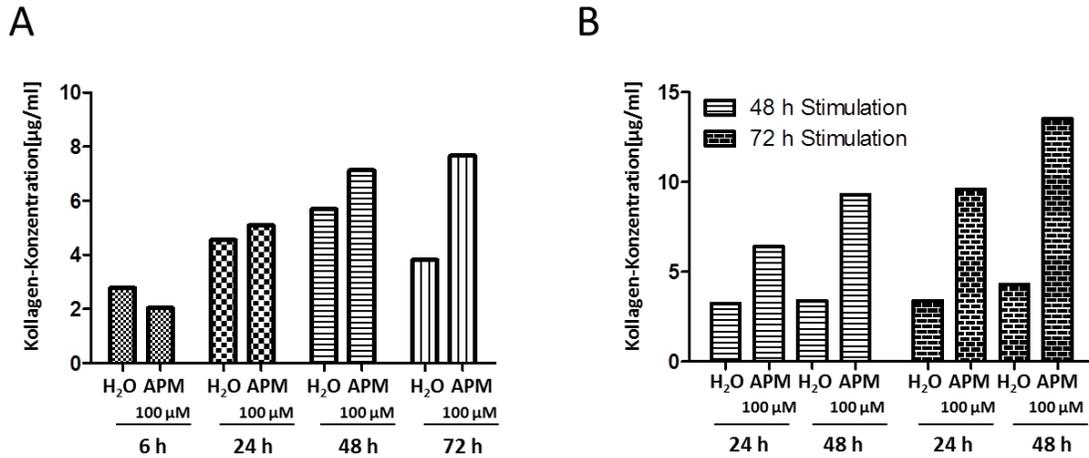
Zunächst wurden die optimalen Bedingungen (Positivkontrolle, Zellzahl, Konzentration des fetalen Kälberserums (FCS) im Kulturmedium, Hunger- und Stimulationszeit) in der verwendeten humanen primären Fibroblasten-Zellkultur ermittelt. In der Literatur waren sehr unterschiedliche Ansätze für die Zellkultur beschrieben, d.h. verschiedene Zelltypen, Formate der Kultur und Anzahl der ausgesäten Zellen. In Anlehnung an die Erfahrungen in unserem Labor mit primären humanen Fibroblasten wurden 200000 Zellen pro 6-Well ausplattiert.

Ascorbinsäure, die einen entscheidenden Cofaktor bei der Kollagensynthese darstellt, ist neben TGF- $\beta$  als Positivkontrolle in der Literatur beschrieben (Tsuji-Naito et al., 2010). Da das Phosphatderivat der Ascorbinsäure (APM) eine größere Stabilität aufweist als Natriumascorbat und daraus eine gesteigerte Kollagenproduktion in humanen gingivalen Fibroblasten resultiert (Tsutsumi et al., 2012), wurde APM in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  als Positivkontrolle gewählt. Seitens des Herstellers wurde der Hinweis gegeben, dass Bestandteile des FCS im Medium mit dem Farbstoff interagieren können und FCS im Medium bis maximal 5 % verwendet werden sollte. In der Literatur wurde bereits für einen FCS-Gehalt von 1 % im Kulturmedium eine Steigerung der gemessenen Absorptionen beschrieben (Lareu et al., 2010). Aus diesem Grund erfolgten zunächst die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen und die Bestimmung des löslichen Kollagens im Hungermedium, d.h. ohne Zusatz von FCS. Für Versuche, die im Hungermedium durchgeführt werden, empfiehlt es sich, die Zellen mindestens 12 h im Hungermedium zu kultivieren, um eine Stress bedingte Grundstimulation der Zellen aufgrund des Fehlens von FCS zu verhindern. Um diese Grundstimulation weiter zu minimieren, wurden die Fibroblasten sowohl 24 h als auch 48 h gehungert und mit APM 100  $\mu\text{M}$  unterschiedlich lang stimuliert.

Nach einer Hungerzeit von 24 h führte die Stimulation der Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  APM nach 72 h zur höchsten Kollagen-Konzentrationen (7,67  $\mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 109 A) Da trotzdem die ermittelten Kollagen-Konzentrationen sehr gering waren, wurden im Folgeversuch 200  $\mu\text{l}$  Überstand (laut Assayprotokoll 100  $\mu\text{l}$ ) für die Durchführung des Sircol Collagen Assays verwendet (siehe Abb. 109 B).

Um den Einfluss der Hungerzeit auf die Kollagen-Konzentration zu testen, wurden in einem weiteren Versuch die Fibroblasten 24 und 48 h im Hungermedium kultiviert und anschließend 48 oder 72 h mit APM stimuliert. Es zeigte sich, dass bei einer Stimulationszeit von 72 h und einer Hungerzeit von 48 h die höchste

Kollagen-Konzentration für 100  $\mu\text{M}$  APM nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 109 B).



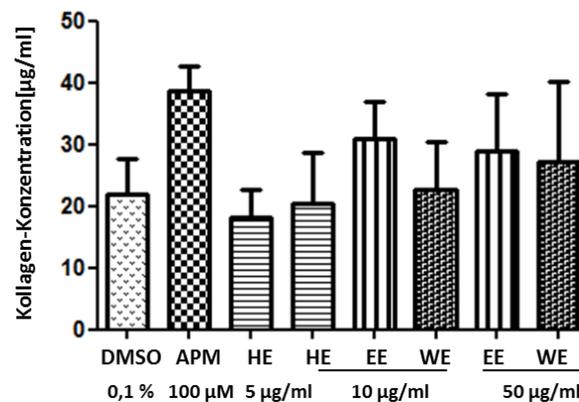
**Abb. 109: Einfluss der Hunger- und Stimulationszeit auf den Kollagengehalt im Überstand von primären humanen Fibroblasten nach Stimulation mit APM.** Die Zellen wurden mit 100  $\mu\text{M}$  APM stimuliert. Wasser diente als LM-Kontrolle A) Nach einer Hungerzeit von 24 h und verschiedenen Stimulationszeitpunkten wurde der Kollagengehalt in 100  $\mu\text{l}$  Überstand bestimmt. B) Nach 24 und 48 h Hungern und Stimulationen von 48 bzw. 72 h wurde der Kollagengehalt in 200  $\mu\text{l}$  Überstand bestimmt. Die Versuche wurden jeweils einmal durchgeführt.

Da die Kollagen-Konzentrationen auch bei Entnahme von 200  $\mu\text{l}$  Überstand sehr gering waren, wurde für die Folgeversuche 1,0 ml Überstand entnommen und der Kollagen-Konzentrierungsschritt durchgeführt. Für die Experimente wurden zunächst 200000 Zellen ausgesät, diese für 24 h im DMEM-Vollmedium kultiviert, anschließend für 48 h gehungert und dann für 72 h im Hungermedium mit den jeweiligen Testsubstanzen stimuliert (Versuchsaufbau 1). Unter diesen Bedingungen wurden die in Abb. 110 bis Abb. 113 aufgeführten Ergebnisse erhalten.

Da im Verlauf der Experimente kein lösliches Kollagen in den Proben mehr bestimmt werden konnte, ohne dass dieses zu erklären war, wurden die Versuchsbedingungen erneut geändert. Es wurden 200000 Zellen ausgesät, für 24 h kultiviert und anschließend direkt ohne vorheriges Hungern in 1 % FCS-haltigem DMEM-Medium inkubiert. (Versuchsaufbau 2). Unter diesen Bedingungen wurden die in Abb. 114 aufgeführten Ergebnisse erzielt.

Untersuchung von Extrakten und Fraktionen von Calendula-Blüten sowie Carotinoiden und Retinoiden

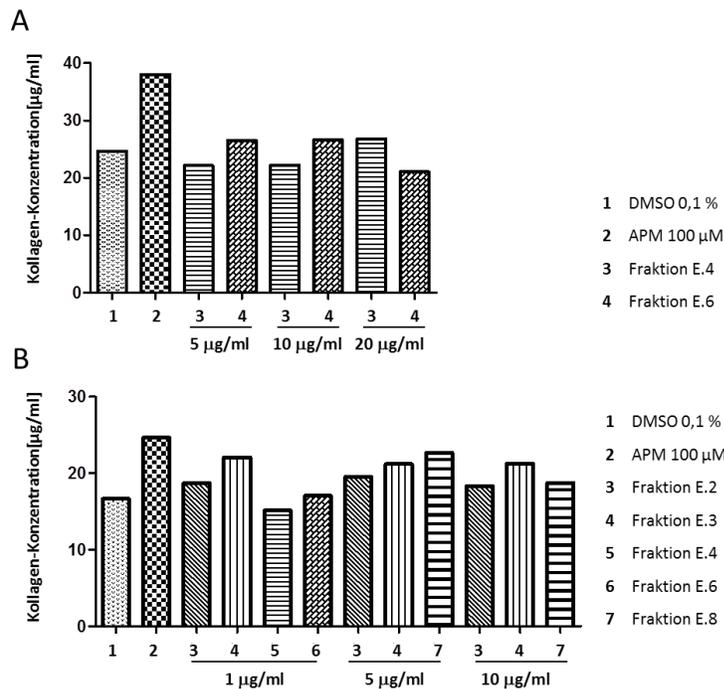
Die Behandlung der Fibroblasten (Versuchsaufbau 1) mit EE führte bei den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml zwar zu erhöhten Kollagenkonzentrationen (30,95 µg/ml ± 6,00 und 29,02 µg/ml ± 9,26), diese waren aber weder signifikant, noch konzentrationsabhängig (siehe Abb. 110). WE zeigte nur bei der höheren Konzentration von 50 µg/ml eine Tendenz zu einer erhöhten Kollagen-Konzentration (27,23 µg/ml ± 12,85). Von HE wurden wegen der deutlichen Reduktion der Zellviabilität im MTT-Assay bei 50 µg/ml (siehe Abb. 118) nur die Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml getestet. Diese zeigten keinen Einfluss auf den Kollagengehalt in Fibroblasten im Vergleich zur LM-Kontrolle (siehe Abb. 110). Die Effekte von EE und WE waren nicht durch eine Reduktion der Zellviabilität beeinflusst (siehe Abb. 118).



**Abb. 110: Effekt der *Calendula*-Extrakte auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten.** Die Zellen wurden nach einer Hungerzeit von 48 h entweder mit APM 100 µM als Positivkontrolle oder den *Calendula*-Extrakten (HE, EE, WE) in verschiedenen Konzentrationen für 72 h stimuliert und der Kollagengehalt im Überstand bestimmt (Versuchsaufbau 1). DMSO 0,1 % diente als LM-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten ± SD.

Da EE bei der Untersuchung der *Calendula*-Extrakte die besten Effekte gezeigt hatte, sollten einige Fraktionen, welche nach der chromatographischen Trennung eines Teils von EE über Sephadex-LH 20 erhalten wurden, untersucht werden. In den Fraktionen E.2 und E.4 konnten Triterpensaponine, in Fraktion E.6 Flavonoidglycoside und in Fraktion E.8 Kaffeesäurederivate angereichert werden.

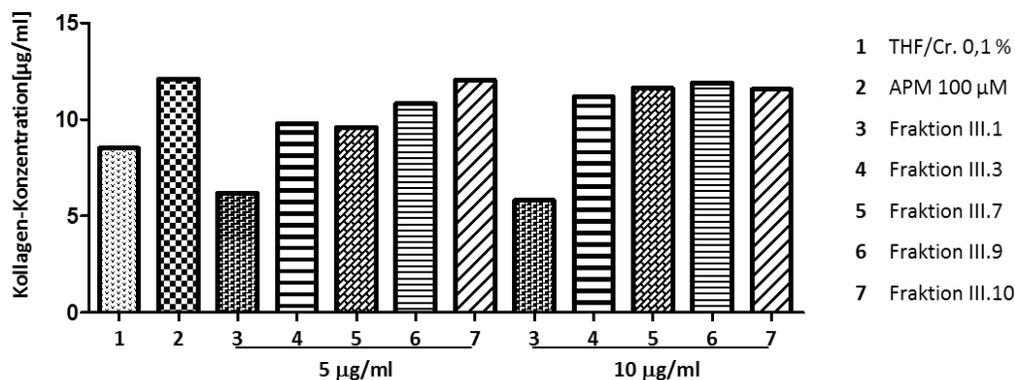
In Fraktion E.3 konnten Flavonoidglycoside und Triterpensaponine detektiert werden (siehe Abb. 128). Die untersuchten Fraktionen erhöhten den Kollagengehalt tendentiell, aber nicht signifikant gegenüber der LM-Kontrolle, wobei die Fraktionen E.4 mit 20 µg/ml, E.6 mit 10 und 20 µg/ml sowie E.8 mit 5 µg/ml den deutlichsten Effekt aufwiesen (siehe Abb. 111 A und B). Aufgrund der geringen Effekte, kann keine Aussage getroffen werden, welche der in den Fraktionen angereicherten Stoffgruppe für den Effekt von EE verantwortlich ist.



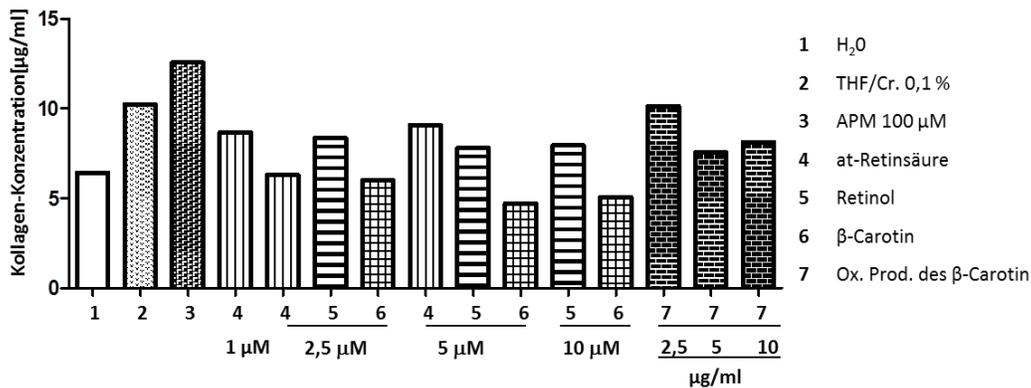
**Abb. 111: Effekt einiger Fraktionen von EE aus *Calendula*-Blüten auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten.** Die Zellen wurden nach einer Hungerzeit von 48 h entweder mit APM 100 µM als Positivkontrolle oder den Fraktionen, die nach SC-Trennung von EE über Sephadex LH-20 erhalten wurden, in verschiedenen Konzentrationen für 72 h stimuliert und der Kollagengehalt im Überstand bestimmt (Versuchsaufbau 1). DMSO 0,1 % diente als LM-Kontrolle. Die Versuche wurden jeweils einmal durchgeführt.

In Kapitel 2.3.4 ist der Einfluss der Retinoide und Carotinoide auf die Kollagensynthese beschrieben worden. Daher sollten zum einen einige Fraktionen, in denen Carotinoide bzw. Xanthophylle als mögliche Vorstufen von Retinoiden angereichert waren nach SC-Trennung von HE über neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und zum anderen all-*trans*-Retinsäure, Retinol, β-Carotin und Oxidationsprodukten des β-Carotins näher untersucht werden. Nach der SC-Trennung waren in Fraktion III.1

Carotine, in Fraktion III.3 vermutlich Carotine, Faradiol, 3,16-diester und Fette, in Fraktion III.7 hauptsächlich Triterpenmonole und -diolester und in den Fraktionen III.9 und III.10 hauptsächlich Xanthophylle angereichert (siehe Abb. 127). Von den untersuchten Fraktionen zeigten III.3, III.7, III.9 und III.10 in den Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml eine leichte Erhöhung der Kollagen-Konzentration im Vergleich zur LM-Kontrolle. Erstaunlicherweise war die Kollagen-Konzentration nach Stimulation der Zellen mit Fraktion III.1, die den höchsten Anteil an Carotinen enthielt, deutlich geringer als bei der LM-Kontrolle (siehe Abb. 112). Übereinstimmend damit führte β-Carotin in einer Konzentration von 5 und 10 µM zu einem reduzierten Kollagengehalt gegenüber der LM-Kontrolle (siehe Abb. 113) at-Retinsäure, Retinol und die Oxidationsprodukte des β-Carotins dagegen wiesen leicht erhöhte, nicht konzentrationsabhängige Effekte auf den Kollagengehalt auf. Der Einfluss der getesteten Fraktionen sowie der Retinoide bzw. Carotinoide auf die Zellviabilität unter den entsprechenden Bedingungen wurde nicht untersucht.



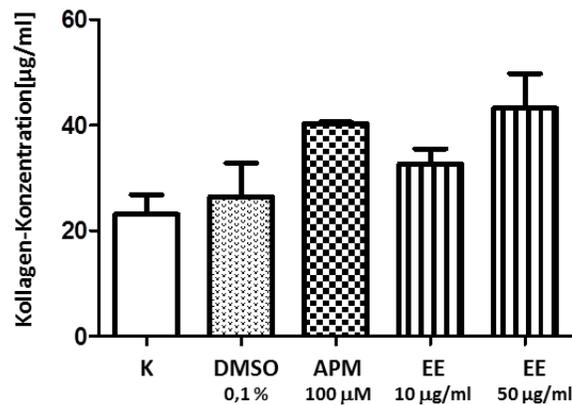
**Abb. 112: Effekt einiger Fraktionen von HE aus *Calendula*-Blüten auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten.** Die Zellen wurden nach einer Hungerzeit von 48 h entweder mit APM 100 µM als Positivkontrolle oder den Fraktionen nach SC-Trennung von HE über neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in verschiedenen Konzentrationen für 72 h stimuliert und der Kollagengehalt im Überstand bestimmt (Versuchsaufbau 1). THF/Cremophor-EtOH (THF/Cr.) 0,1 % diente als LM-Kontrolle. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.



**Abb. 113: Effekt von Retinoiden und Carotinoiden auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten.**

Die Zellen wurden nach einer Hungerzeit von 48 h entweder mit APM 100 µM als Positivkontrolle oder Retinoiden bzw. Carotinoiden in verschiedenen Konzentrationen für 72 h stimuliert und der Kollagengehalt im Überstand bestimmt (Versuchsaufbau 1). Wasser und THF/Cremophor-EtOH (THF/Cr.) 0,1 % dienten als LM-Kontrollen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Da nach einiger Zeit unter dem Versuchsaufbau 1 kein Kollagen im Überstand mit dem Sircol Collagen Assay mehr nachweisbar war, wurden die Versuchsbedingungen geändert und die Zellen ohne vorheriges Hungern mit den Testsubstanzen in 1 % FCS-haltigem DMEM-Medium für 72 h inkubiert (Versuchsaufbau 2). Da unter den alten Testbedingungen EE die größte Aktivität zeigte und auch die größte Inhibierung der bakteriellen Kollagenase aufwies, wurde nur dieser Extrakt unter den neuen Bedingungen getestet. Die Stimulation der Zellen mit EE in beiden Testkonzentration resultierte in einer nicht signifikanten Erhöhung des Kollagengehalts im Überstand, wobei die Konzentration von 50 µg/ml zu einem fast gleichen Kollagengehalt wie die Positivkontrolle APM 100 µM führte (siehe Abb. 114).

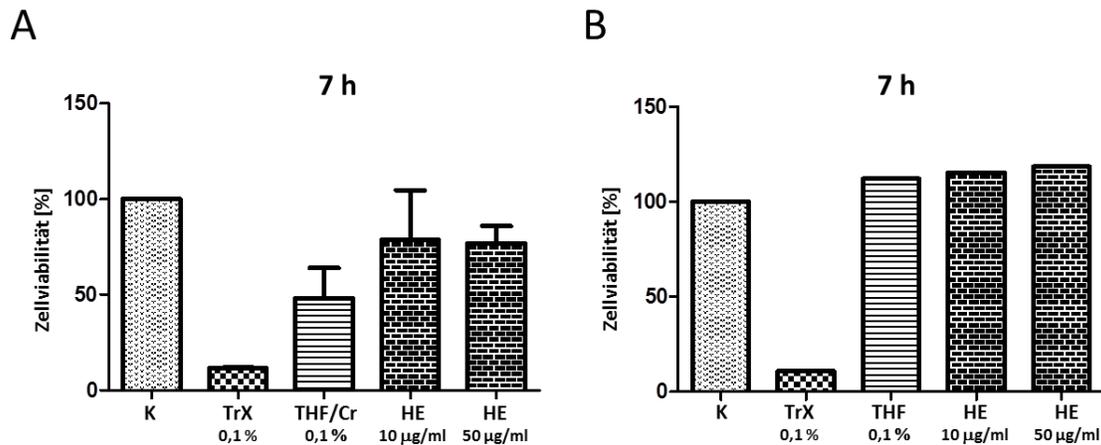


**Abb. 114: Effekt von EE auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten.** Die Zellen wurden entweder mit APM 100 µM als Positivkontrolle oder den EE in Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml für 72 h in 1% FCS haltigem DMEM-Medium stimuliert und der Kollagengehalt im Überstand bestimmt (Versuchsaufbau 2). H<sub>2</sub>O (K) und DMSO 0,1 % dienten als LM-Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten ± SEM.

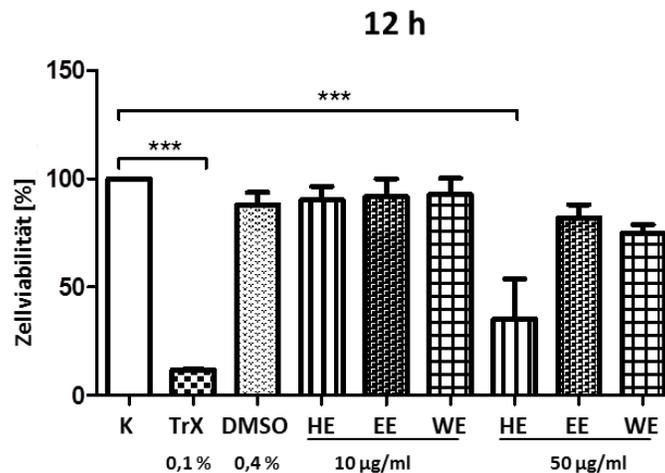
### 3.2.1.4 Einfluss von *Calendula*-Extrakten auf die Zellviabilität

Um zu untersuchen, ob die oben aufgeführten Experimente durch einen möglichen Effekt der Extrakte auf die Zellviabilität beeinflusst werden, wurden sowohl humane immortalisierte Keratinocyten als auch humane primäre Fibroblasten im MTT-Assay unter den jeweiligen Bedingungen mit den *Calendula*-Extrakten analysiert.

Nach 12 h Stimulation wiesen EE und WE in der Konzentration von 10 µg/ml keinen Einfluss und in der Konzentration von 50 µg/ml eine leichte Reduktion der Zellviabilität bei humanen immortalisierten Keratinozyten auf. Hingegen wurde die Zellviabilität durch HE (gelöst in DMSO) bei einer Konzentration von 50 µg/ml signifikant reduziert (35,25 % ± 32,25) (siehe Abb. 116). HE, gelöst in THF/Cremophor-EtOH, führte nach einer Stimulation von 7 h zu einer geringen Reduktion der Zellviabilität (siehe Abb. 115 A). In THF gelöst, war dagegen für HE in beiden Testkonzentrationen keine Reduktion der Zellviabilität nach 7 h nachweisbar (siehe Abb. 115 B).



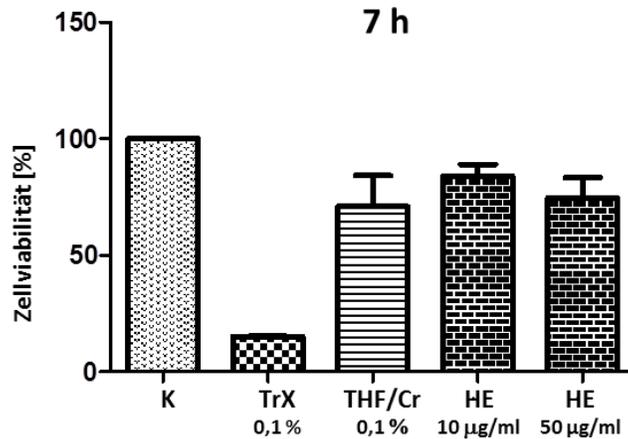
**Abb. 115: Effekt von HE auf die Viabilität von humanen immortalisierten Keratinocyten im MTT-Assay nach 7 h.** Die Zellen wurden mit Triton X-100 (TrX) 0,1 % als Positivkontrolle, HE (10 oder 50 µg/ml) oder mit THF/Cremophor-EtOH (THF/Cr) 0,1 % bzw. THF 0,1 % als LM-Kontrollen für 7 h inkubiert. A) HE in THF/Cremophor-EtOH gelöst. B) HE in THF gelöst. Die Daten sind als Zellviabilität in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. A: n = 2, ± SD. B: Der Versuch wurde einmal durchgeführt.



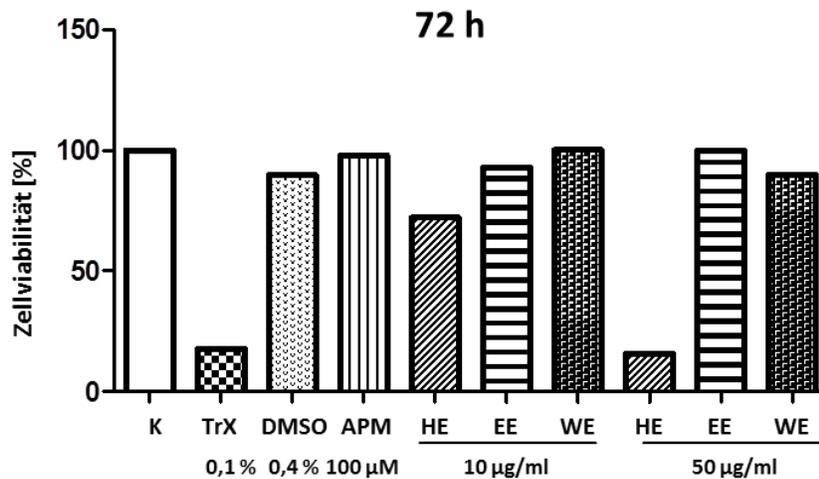
**Abb. 116: Effekt der *Calendula*-Extrakte auf die Viabilität von humanen immortalisierten Keratinocyten im MTT-Assay nach 12 h.** Die Zellen wurden mit Triton X-100 (TrX) 0,1 % als Positivkontrolle, den *Calendula*-Extrakten (10 oder 50 µg/ml) oder mit DMSO 0,4 % als LM-Kontrolle für 12 h inkubiert. Die Daten sind als Zellviabilität in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten ± SD.\*\*\*p<0,001.

Die Stimulation der humanen primären Fibroblasten über 7 h mit HE, der in THF/Cremophor-EtOH gelöst war, führte nur bei einer Konzentration von 50 µg/ml zu einer leichten Reduktion der Zellviabilität (siehe Abb. 117). Nach der Stimulation der Zellen mit HE (gelöst in DMSO) über 72 h waren bereits bei 10 µg/ml eine leichte und bei 50 µg/ml eine starke Reduktion der Zellviabilität nachweisbar. EE

und WE führten in beiden Testkonzentrationen zu keiner reduzierten Viabilität der Zellen (siehe Abb. 118).



**Abb. 117: Effekt von HE auf die Viabilität von humanen primären Fibroblasten im MTT-Assay nach 7 h.** Die Zellen wurden mit Triton X-100 (TrX) 0,1 % als Positivkontrolle, HE (10 oder 50 µg/ml) oder mit THF/Cremophor-EtOH (THF/Cr) 0,1 % als LM-Kontrolle für 7 h inkubiert. Die Daten sind als Zellviabilität in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten ± SD.



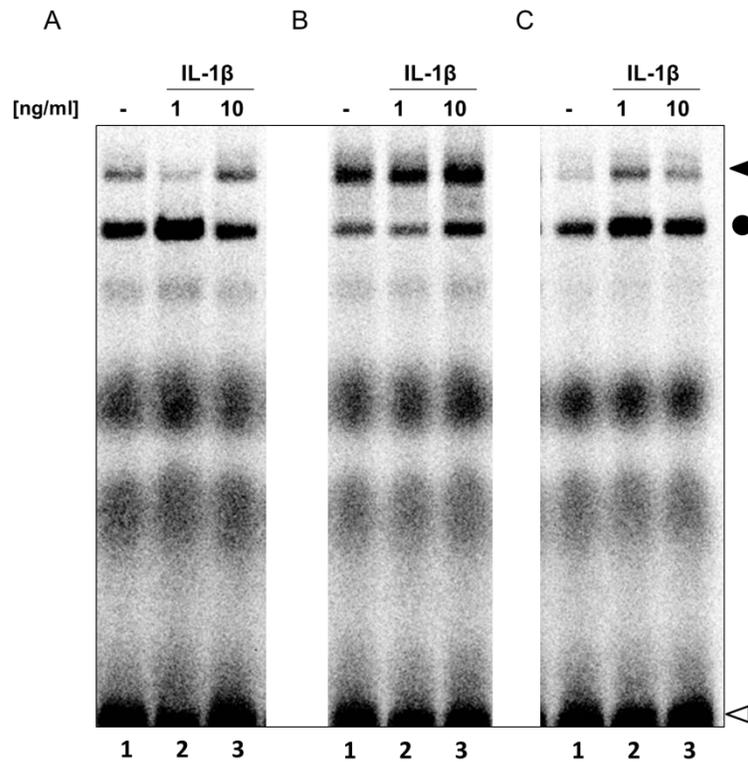
**Abb. 118: Effekt der *Calendula*-Extrakte auf die Viabilität von humanen primären Fibroblasten im MTT-Assay nach 72 h.** Die Zellen wurden mit Triton X-100 (TrX) 0,1 % als Positivkontrolle, den *Calendula*-Extrakten (10 oder 50 µg/ml) oder mit DMSO 0,4 % als LM-Kontrolle für 72 h inkubiert. Die Daten sind als Zellviabilität in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

### 3.2.2 Untersuchungen zum Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Hemmung von Matricin

#### 3.2.2.1 Untersuchungen zur NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität im EMSA

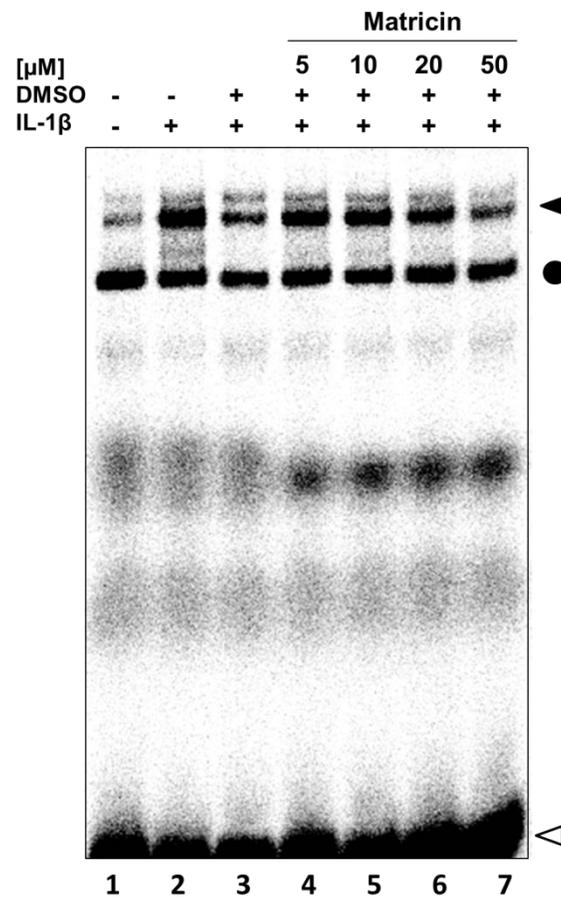
Im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Heilmann, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg konnte gezeigt werden, dass Matricin den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B beeinflusst und die Expression von ICAM-1 hemmt (Flemming et al., 2015). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Matricin den IL-1-Rezeptor hemmt, da *in silico* Untersuchungen von Prof. Dr. G. Schneider, ETH Zürich, den IL-1-Rezeptor als potentiell Target von Matricin identifiziert hatten.

Vor diesem Hintergrund sollte im EMSA untersucht werden, ob Matricin an den IL-1-Rezeptor bindet und so zu einer Reduktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  führt. Dazu wurden zunächst verschiedene Zelltypen auf die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität durch IL-1 $\beta$  untersucht. Bei den Jurkat-Zellen führte die Stimulation weder mit 1 ng/ml noch mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  für 1 h zu einer erhöhten NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 119 A). Die THP-1-Zellen erwiesen sich durch die starke Basisaktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung als ungeeignet (siehe Abb. 119 B). Bei den humanen immortalisierten Keratinocyten führte die Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 $\beta$  für 1 h zu einer stärkeren Aktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität als mit 10 ng/ml (siehe Abb. 119 C). Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche humane immortalisierte Keratinocyten verwendet und diese mit 5 ng/ml IL-1 $\beta$  für 1 h stimuliert.



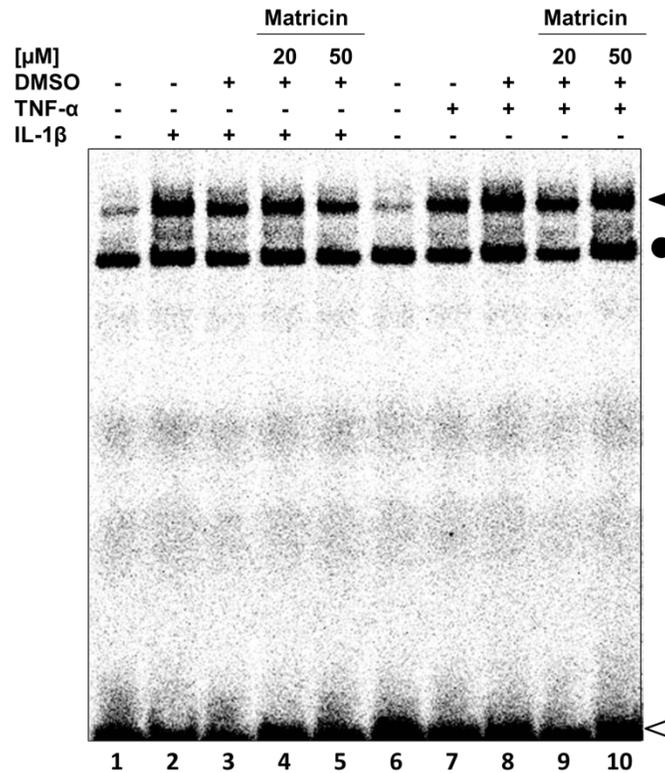
**Abb. 119: Effekt von IL-1β auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität in verschiedenen Zellen.** Jurkat-Zellen (A), THP-1-Zellen (B) und immortalisierte humane Keratinocyten (C) wurden für 1 h mit IL-1β 1 ng/ml (Bahn 2) oder 10 ng/ml (Bahn 3) stimuliert. Bahn 1 zeigt die unbehandelten Kontrollzellen. Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF-κB-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. n = 1.

Um den Einfluss von Matricin auf den IL-1-Rezeptor zu untersuchen, wurden die humanen immortalisierten Keratinocyten mit Matricin in verschiedenen Konzentrationen für 1 h vorstimuliert und danach 1 h mit 5 ng/ml IL-1β inkubiert. In Konzentrationen von 5, 10 und 20 μM war für Matricin keine Reduktion der NF-κB-DNA-Bindungsaktivität nachweisbar. Nur Matricin 50 μM führte zu einer leichten Reduktion der NF-κB-DNA-Bindungsaktivität im Vergleich zur Positivkontrolle (siehe Abb. 120). Dieser Effekt konnte allerdings nicht reproduziert werden.



**Abb. 120: Effekt von Matricin auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen, immortalisierten Keratinocyten.** Die Zellen wurden für 1 h mit Matricin in verschiedenen Konzentrationen vorstimuliert und mit 5 ng/ml IL-1 $\beta$  für 1 h inkubiert (Bahnen 4 – 7). Bahn 1 zeigt die unbehandelten Kontrollzellen. In Bahn 2 wurden die Zellen nur mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml für 1h und in Bahn 3 nur mit DMSO 0,1 % als LM-Kontrolle für 1 h und anschließend mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml für 1h stimuliert. Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. n = 1.

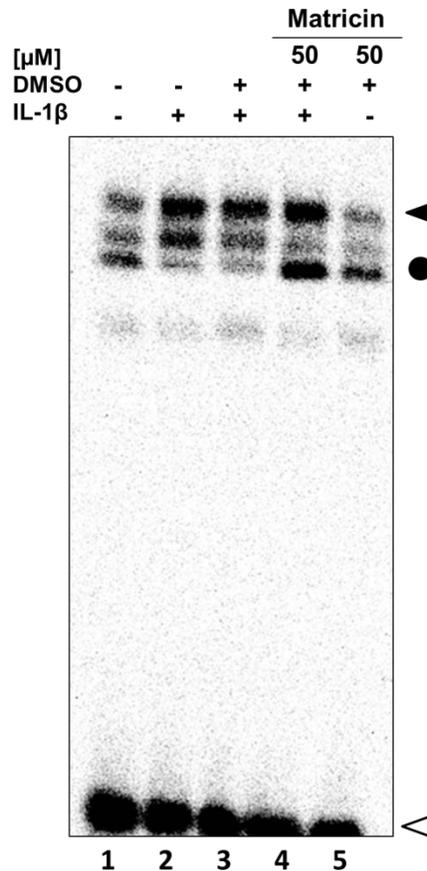
Da sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF- $\alpha$  zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führen (Grabbe et al., 2011), wurden die Zellen nach Vorbehandlung von Matricin (20 und 50  $\mu$ M) ebenfalls mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml für 1 h stimuliert und mit der IL-1 $\beta$ -Stimulation verglichen. Es kam weder nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  noch mit TNF- $\alpha$  zu einer Reduktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität durch Matricin (siehe Abb. 121).



**Abb. 121: Effekt von Matricin auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen, immortalisierten Keratinocyten und Vergleich der Stimulationen mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ .** Die Zellen wurden für 1 h mit Matricin in verschiedenen Konzentrationen vorstimuliert und entweder mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml (Bahnen 4 und 5) oder TNF- $\alpha$  4 ng/ml (Bahnen 9 und 10) für 1 h inkubiert. Bahn 1 zeigt die unbehandelten Kontrollzellen. In Bahn 2 wurden die Zellen nur mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml und in Bahn 7 nur mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml für 1h stimuliert. In den Bahnen 3 und 8 wurden die Zellen nur mit DMSO 0,1 % als LM-Kontrolle für 1 h und anschließend mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml bzw. TNF- $\alpha$  4 ng/ml für 1h stimuliert. Die Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. 1 repräsentativer EMSA von 2 ist abgebildet.

Da Flemming et al. in ihren Untersuchungen für HMEC-1 Zellen (human microvascular endothelial cells) eine Hemmung der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen haben (Flemming et al., 2015), sollte auch für humane immortalisierte Keratinocyten der Einfluss auf die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit Matricin 50  $\mu$ M für 1h und nachfolgend mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml für 1 h stimuliert, ein Kernextrakt hergestellt und im EMSA auf NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität untersucht. Weder die Vorstimulation mit Matricin 50  $\mu$ M für 1 h noch die alleinige Stimulation mit Matricin 50  $\mu$ M für 2 h führten zu einer

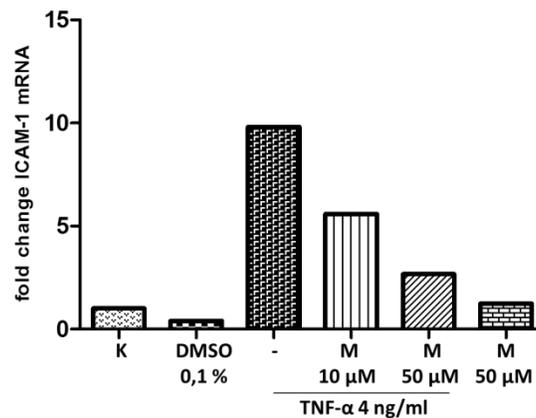
Reduktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität und damit folglich zu einer Verringerung der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern (siehe Abb. 122).



**Abb. 122: Effekt von Matricin auf die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern in humanen immortalisierten Keratinocyten.** Die Zellen wurden für 1 h mit Matricin 50  $\mu$ M vorstimuliert und anschließend mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml für 1 h inkubiert (Bahn 4) bzw. für 2 h mit Matricin 50  $\mu$ M stimuliert (Bahn 5). Bahn 1 zeigt die unbehandelten Kontrollzellen. In Bahn 2 wurden die Zellen nur mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml für 1h und in Bahn 3 nur mit DMSO 0,1 % als LM-Kontrolle für 1 h und anschließend mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml für 1h stimuliert. Die Kernextrakte wurden gewonnen und auf NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität im EMSA untersucht. Das schwarze Dreieck gibt die Position des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Kreis zeigt eine unspezifische Bindung und das offene Dreieck ungebundene Oligonukleotide an. n = 1.

3.2.2.2 Untersuchungen von Matricin auf die mRNA-Expression von ICAM-1 in humanen immortalisierten Keratinocyten

Von Flemming et al. wurde in HMEC-1 Zellen für Matricin eine Reduktion der durch TNF- $\alpha$  induzierten mRNA-Expression von ICAM-1 gezeigt (Flemming et al., 2015). Um zu untersuchen, ob der gleiche Effekt auch bei humanen immortalisierten Keratinocyten nachweisbar ist, wurden die Zellen mit Matricin 10 und 50  $\mu$ M für 1 h vorstimuliert, für 1 h mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml inkubiert, anschließend die mRNA isoliert und die ICAM-1 mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Matricin konnte in einer konzentrationsabhängigen Weise die durch TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1 mRNA-Expression reduzieren (siehe Abb. 123). Die alleinige Stimulation der Zellen mit Matricin 50  $\mu$ M für 2 h hatte keinen Einfluss auf die ICAM-1 mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 123: Effekt von Matricin auf die mRNA-Expression von ICAM-1 in humanen immortalisierten Keratinocyten.** Die Zellen wurden entweder nur mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml als Positivkontrolle, DMSO 0,1 % als LM-Kontrolle, Matricin (M) 50  $\mu$ M für 2 h oder mit Matricin (10 und 50  $\mu$ M) für 1 h vorstimuliert und anschließend mit TNF- $\alpha$  (4 ng/ml) für 1 h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (K). Die mRNA wurde nach 2 h isoliert und die ICAM-1 mRNA mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert. Die Daten sind als fold change der ICAM-1 mRNA in Bezug auf die entsprechende LM-Kontrolle angegeben. n = 1.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zu den wundheilungsfördernden Eigenschaften von *Calendula*-Extrakten

Wundheilungsstörungen und chronische Wunden verursachen hohe Therapiekosten, sind für den behandelten Arzt eine große Herausforderung und sorgen bei den betroffenen Patienten für psychische und physische Einschränkungen. Neben konventionellen Therapieansätzen werden insbesondere pflanzliche Zubereitungen und Naturstoffe genutzt, um die Wundheilung zu beschleunigen. (Reddy et al., 2013; Reuter et al., 2009). Lipophile und hydrophile Extrakte aus der seit dem Mittelalter bekannten Arzneipflanze *Calendula officinalis* L. werden von der HMPC, einem Expertengremium für Phytotherapie in der EMA für die Behandlung kleiner Wunden empfohlen. Diese Arbeit hatte das Ziel, durch Testung von 3 verschiedenen Extrakten in verschiedenen *in vitro* und zellbasierten Testsystemen in Kombination mit der phytochemischen Untersuchung des *n*-Hexan- und Ethanol-Extrakts einen Beitrag zur Erklärung des Wirkprinzips der *Calendula*-Blüten bei der Wundheilung und der Identifizierung potentieller Wirkstoffe zu leisten.

#### 4.1.1 Phytochemische Untersuchungen des *n*-Hexan-Extrakts

Bei der phytochemischen Untersuchung des *n*-Hexan-Extrakts (HE) aus *Calendula*-Blüten mittels MPLC und offener SC konnten neben Gemischen von Triterpenalkoholen und -estern vom Oleanan-, Ursan-, Taraxastan-,  $\psi$ -Taraxastan-, Lupan- und Dammaran-Typ ein Gemisch von 2 Sesquiterpenglycosiden vom Eudesman- und Alloarmodendran-Typ isoliert werden (siehe Abb. 124). Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC), GC-MS-, HR-MS-, HPLC-DAD-ELS- und (U)HPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Analysen. Die Identifizierung bekannter Verbindungen erfolgte über den Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturangaben.



*Chrysanthemum macrocarpum* isoliert und strukturell beschrieben (Boutaghane et al., 2013). Die Gemische der 3-Myristoyl- und 3-Palmitoylmonoester von Dammarendiol II (**5a+b**), Arnitriol A (**6a+b**) und Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol (**7a+b**) konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals aus *Calendula*-Blüten isoliert werden. Die Arnitriol A- und Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-monoester wurden bereits in *Arnica lonchophylla* (Schmidt et al., 2004), die Dammarendiol II 3-monoester in *Chrysanthemum moriflorum* (Ukiya et al., 2001) nachgewiesen. Vom Dammaran-Typ konnte in *C. officinalis* bisher nur das nicht veresterte Dammara-20,24-dien 3 $\beta$ -ol mittels GC-MS-Analyse nachgewiesen werden (Akihisa et al., 1996). Die 3-Monoester von Maniladiol (**8a+b**), Calenduladiol (**9a+b**), Faradiol und Arnidiol (**11a+b / 12a+b**) sowie Faradiol (**10**) und das Gemisch von  $\beta$ -Amyrin,  $\alpha$ -Amyrin,  $\psi$ -Taraxasterol und Taraxasterol (**13 – 16**) sind bereits aus *C. officinalis* bekannt. Triterpendiole und -triole bzw. deren Ester kommen, wie bei *C. officinalis*, in größeren Mengen auch in anderen Asteraceae-Arten, wie *Chrysanthemum moriflorum*, *Chrysanthemum macrocarpum*, *Arnica lonchophylla*, *Helianthus annuus* und *Taraxacum platycarpum*, vor (Yasukawa et al., 1996).

Bisher wurden isolierte Triterpendiol- und triolmonoester mittels NMR-Analysen in Kombination mit verschiedenen MS-Methoden identifiziert. EI-MS-Analysen, auch in Kombination mit GC, sind insbesondere geeignet, um Triterpengrundkörper zu identifizieren. Verschiedene Publikationen befassen sich mit der charakteristischen Fragmentierung tetra- und pentazyklischer Triterpene mittels (GC)-EI-MS (Assimopoulou and Papageorgiou, 2005; Budzikiewicz et al., 1963; Karliner and Djerassi, 1966; Pyrek and Baranowska, 1978). Die Bildung charakteristischer Fragmente ist, wie im Fall der isolierten Verbindungen **5a+b** und **8a+b** nach basischer Hydrolyse geeignet, unterstützend zu NMR-Analysen, den Triterpengrundkörper des Maniladiols bzw. Dammarendiols II zu identifizieren. Für den Nachweis von  $M^+$  bzw. Quasimolekülen als Ammonium- bzw. Natriumaddukte von Triterpenmono- und diestern sind bisher HR-EI-, HR-ESI- und DCI-MS mit Direkteinlass beschrieben worden (Boutaghane et al., 2013; Schmidt et al., 2004; Ukiya et al., 2001). Gemische verschiedener Triterpene wurden mittels

LC-MS untersucht. Dabei wurden für polare Triterpene, wie Triterpensaponine, ESI-MS (Ji et al., 2014; Wang et al., 2015) und für eher lipophile Triterpene APCI- (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) und APPI-MS (Atmospheric Pressure Photoionization) (Rhourri-Frih et al., 2009; van der Doelen et al., 1998) für die Ionisierung verwendet. Vahur et al. zeigten bei der Analyse eines Damarharzes, dass nur die Kombination von MALDI-FT-ICR-MS und APCI-FT-ICR-MS eine optimale Analyse dieses komplexen Gemisches verschiedener Triterpene ermöglichte (Vahur et al., 2012). Bisher ist aber noch keine Analyse komplexerer Gemische aus Triterpenmono- und diestern beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils Gemische von Myristin- und Palmitinsäuremonoestern verschiedener Triterpene mittels NMR-Analyse und verschiedener MS-Methoden untersucht. Erste HR-MS-Analysen mit APCI im Positivmodus lieferten aufgrund der Instabilitäten der Triterpenester  $[M+H-H_2O]^+$ -Ionen, die darauf schließen ließen, dass Myristin- und Palmitinsäure als Esterkomponenten vorlagen. Mit der im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Lämmerhofer entwickelten UHPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Methode, bei der die Trennung der einzelnen Ester über eine core-shell Kinetex C18-Säule erfolgte, war es möglich die  $[M+H]^+$ -Ionen mit einer hohen Massengenauigkeit (mit Ausnahme der Verbindungen **5a+b**) nachzuweisen und durch die entstehenden Fragmentationen nach stufenweiser Abspaltung der OH- und Estergruppen in der MS/MS-Analyse das Vorliegen des jeweiligen Monoesters zu belegen. Diese Methode kann sowohl für präparative Zwecke als auch für die Analytik komplexer Gemische von Triterpenmonoestern genutzt werden. Bei den Verbindungen **1 – 4** stellte die fehlende Trennbarkeit mit dem RP-C18-Material sowie die höhere Instabilität der  $[M+H]^+$ -Ionen bei der APCI-MS-Analyse eine besondere Herausforderung dar. Mit der im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Lämmerhofer entwickelten HPLC-Methode basierend auf einem eigens synthetisierten RP-C30-Material als stationäre Phase und einem wasserfreien Elutionsmittel war es sogar möglich, die gemischten Faradiol 3,16-diester FMP und FPM zu trennen. RP-C30-Säulenmaterial ist bereits für eine chromatographische Trennung eines Gemisches von Carotinoiden und Carotinoidestern (Mono- und

Diester), die sich ebenfalls wie Triterpendiester durch eine hohe Lipophilie und ähnliche Strukturen auszeichnen, verwendet worden (Dugo et al., 2008). Der Nachweis der  $[M+H]^+$ -Ionen in der vorliegenden Arbeit konnte allerdings im Gegensatz zu den Monoestern nur mit einer „direct infusion“ QTOF-MS/MS-Analyse im MCA-Modus (multichannel averaging acquisition) nachgewiesen werden. Der eindeutige Nachweis der Verbindungen **2** als FMP und **3** als FPM konnte erst mit der RP-C30-HPLC-APCI-QTOF-MS/MS-Analyse im Vergleich zu synthetisierten Standards und durch die bevorzugte Abspaltung der Fettsäure an C-16 erfolgen. Die entwickelte Methode könnte zukünftig dazu genutzt werden, andere Triterpendiol und -triole als Diester mit langkettigen Fettsäuren im *n*-Hexan-Extrakt zu identifizieren. Das Vorliegen entsprechender Laurinsäure- und Stearinsäuremonoester, wie sie auch in *A. lonchophylla* identifiziert wurden (Schmidt et al., 2004), ist hier wahrscheinlich.

Für lipophile Extrakte aus *Calendula*-Blüten und die darin enthaltenen Triterpenalkohole bzw. -monoester konnten mit Hilfe des Crotonöltests antiinflammatorische und antiödematöse Wirkungen nachgewiesen werden (Della Loggia et al., 1994). Weitere Untersuchungen an durch Phorbolster induzierten Mausohrödemen zeigten, dass freie Triterpenalkohole wirksamer sind als die entsprechenden Monoester (Zitterl-Eglseer et al., 1997) und dass im Fall des  $\psi$ -Taraxastengrundkörpers Heliantriol C im Vergleich zu Faradiol eine größere Aktivität zeigte (Yasukawa et al., 1996). Außerdem konnte durch semisynthetische Veränderung des Faradiolgrundkörpers gezeigt werden, dass die freie OH-Gruppe an C-3 essentiell für die antiinflammatorische Wirkung ist und diese durch eine Benzyletherfunktion an C-16 und eine OH- bzw. CHO-Gruppe an C-30 erheblich gesteigert werden konnte (Neukirch et al., 2005). In weiteren Untersuchungen könnten die in der vorliegenden Arbeit für *Calendula*-Blüten neu beschriebenen Triterpenmonoester (**5a+b**, **6a+b** und **7a+b**) untersucht werden, ob sie ebenfalls antiinflammatorische Effekte aufweisen. Hierbei ist zu erwarten, dass die freien Triterpenalkohole wirksamer sind. Die antiinflammatorische Wirkung der Faradiol 3,16-diester ist nach den Untersuchungen von (Neukirch et al., 2005) als eher gering

einzuschätzen. Die antiinflammatorische Wirkung der Triterpene aus *C. officinalis* könnte durch eine Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels zu erklären sein, was aber noch nicht nachgewiesen worden ist.

Die in einer angereicherten Fraktion und als  $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat (17) und Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat) (18) identifizierten Sesquiterpenglycoside sind bereits bei einer phytochemischen Untersuchung eines  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakts aus *C. officinalis*-Blüten isoliert worden (D'Ambrosio et al., 2015). Bis dahin waren aus *C. officinalis*-Blüten nur die als Officinosid C und D bezeichneten Diglycoside von Sesquiterpenen des Eudesman- und Alloaromadendrangrundkörpers isoliert worden (Marukami et al., 2001).  $\beta$ -D-Fucopyranoside, die an C-2' mit kurzkettigen organischen Säuren verestert sind von Sesquiterpenen des Alloaromadendran-, Eudesman-, Cubebol- und Germacran-Typs sind bis dato nur aus Blüten von *Calendula arvensis* und *Calendula persica* isoliert worden (Ahmed et al., 1993; Jakupovic et al., 1988; Pizza and De Tommasi, 1988, 1987). Für verschiedene Sesquiterpenglycoside sind antivirale und zytotoxische Wirkungen beschrieben (D'Ambrosio et al., 2015; De Tommasi and Pizza, 1990; Lv et al., 2015). Im Zusammenhang mit Gastritis wurde ein möglicher antiinflammatorischer Effekt über eine leichte Translokationshemmung von NF- $\kappa$ B durch verschiedene Sesquiterpenglycoside aus *C. officinalis* diskutiert (Colombo et al., 2015). In Zukunft sollten Sesquiterpenglycoside aufgrund ihres relativ hohen Vorkommens in *Calendula*-Blüten (D'Ambrosio et al., 2015), und hier im *n*-Hexan-Extrakt, auf ihre zytotoxische Wirkung hin untersucht werden, da der *n*-Hexan-Extrakt in der vorliegenden Arbeit in höheren Konzentrationen zytotoxisch auf primäre Keratinocyten wirkte. Inwieweit diese Naturstoffe an der im Crotonöl aufgezeigten entzündungshemmenden Wirkung beteiligt sind, müssen ebenfalls zukünftige Untersuchungen klären.

#### 4.1.2 **Beeinflussung von NF- $\kappa$ B in humanen immortalisierten Keratinocyten und humanen primären Fibroblasten durch die *Calendula*-Extrakte**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der *Calendula*-Extrakte (HE, EE und WE) auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, einem Schlüsselmediator im Immunsystem und damit ebenfalls in Entzündungsprozessen (Oeckinghaus et al., 2011), untersucht. Die fehlende Reduktion der durch TNF- $\alpha$  induzierten NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität im EMSA nach Vorstimulierung mit den *Calendula*-Extrakten spricht dafür, dass die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA nicht durch die *Calendula*-Extrakte und die darin enthaltenen Substanzen direkt inhibiert wird. Folglich kann damit auch die nachgewiesene antiinflammatorische Wirkung von *Calendula*-Extrakten und den darin enthaltenen Triterpenen nicht durch eine NF- $\kappa$ B-Inhibierung erklärt werden. Damit übereinstimmend konnte auch M. Toffolon im Rahmen seiner Masterarbeit in unserem Arbeitskreis für Faradiol keine Hemmung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung im EMSA nachweisen (Toffolon, 2014). Colombo et al. konnten dagegen für 3 Triterpendiole und ihre 3-Myristinsäureester in AGS-Zellen (Human Caucasian gastric adenocarcinoma) eine Hemmung der durch TNF- $\alpha$  induzierten transkriptionellen Aktivität in einem Luciferase Reporter-Gen-Assay nachweisen. Es wurden IC<sub>50</sub>-Werte, z.B. mit  $10 \pm 2,6 \mu\text{M}$  für Faradiol und  $30 \pm 7,3 \mu\text{M}$  für Faradiol 3-myristat erhalten (Colombo et al., 2015). Die Frage ist, ob hier eine Zellspezifität vorliegt oder ob diese Unterschiede durch die unterschiedliche experimentelle Durchführung und damit einhergehend durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten zu erklären sind. Bei Colombo et al. wurden Zellen 24 h in Gegenwart von TNF- $\alpha$  und den Substanzen inkubiert. Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass diese Triterpendiole und -ester NF- $\kappa$ B, ähnlich wie Glucocorticoide, so verändern, dass eine Bindung an die DNA zwar erfolgen kann, die transkriptionelle Aktivität aber gehemmt wird. Wünschenswert wäre deshalb zukünftig die Durchführung eines Reporter-Gen-Assays auf Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität mit den *Calendula*-Extrakten in primären immortalisierten Keratinocyten unter den bei Colombo et al. aufgeführten Bedingungen.

Erstaunlicher Weise führte bei primären immortalisierten Keratinocyten, nicht aber bei primären humanen Fibroblasten, die alleinige Stimulation der Zellen mit EE bzw. HE zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Wie es in den Keratinocyten zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch EE und HE kommt, wurde nicht geklärt. Für den Triterpenextrakt (TE) aus dem Birkenkork und dessen Hauptinhaltsstoff Betulin, einem pentazyklischen Triterpen vom Lupan-Typ, konnte aufgrund eines mRNA stabilisierenden Effekts in humanen primären Keratinocyten eine signifikante Steigerung auf mRNA- und Proteinebene von proinflammatorischen Mediatoren, wie IL-6, COX-II und TNF- $\alpha$ , nachgewiesen werden, ohne dass NF- $\kappa$ B beeinflusst wurde (Ebeling et al., 2014; Wardecki et al., 2016). Derzeit kann ebenfalls keine Aussage getroffen werden, welche Inhaltsstoffe aus HE und EE für die nachgewiesene Aktivierung von NF- $\kappa$ B verantwortlich sind.

#### 4.1.3 **Beeinflussung von IL-8 durch die *Calendula*-Extrakten HE und EE**

In der Folge konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch EE und HE (jeweils 50  $\mu$ g/ml) auch zu einer erhöhten Transkription und Translation des Chemokins IL-8 führte. Dieses Targetgen wurde ausgewählt, da es in der Inflammationsphase vermehrt von Keratinocyten sezerniert wird (Kondo et al., 1993; Rennekampff et al., 2000). IL-8 ist besonders für die Rekrutierung von Neutrophilen Granulocyten und Lymphocyten, die an der Sekretion zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren und der Phagozytose von Mikroorganismen beteiligt sind, in das Wundbett verantwortlich. Außerdem gibt es Belege, dass IL-8 auch die Reepithelialisierung durch eine Steigerung der Proliferation und Migration von Keratinocyten beschleunigt (Gillitzer and Goebeler, 2001; Jiang et al., 2011; Rennekampff et al., 2000). Somit liegt es nahe, dass HE und EE über die Steigerung von IL-8 eine Intensivierung der inflammatorischen Reaktion nach der Verwundung, einen schnelleren Übergang in die Gewebeneubildungsphase und eine Beschleunigung der Reepithelialisierung bewirken. In *in vivo* Wundmodellen, die auch das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen mit einbeziehen, konnte sowohl für ein *Calendula*-Öl in einer speziellen Formulierung eine erhöhte Anzahl von

eingewanderten Leukocyten, als auch für eine *Calendula*-Tinktur eine gesteigerte Reepithelialisierung nachgewiesen werden (Okuma et al., 2015; Rao et al., 1991). *In vivo* konnte für ein Gemisch eines wässrigen und ethanolischen (70 %) Extrakts aus *Calendula*-Blüten und Allantoin nach histochemischen Analysen eine Zunahme von differenzierten Makrophagen im Wundsekret nachgewiesen werden (Kloucek-Popova et al., 1982). Diese Effekte könnten im Zusammenhang mit der gesteigerten Expression von IL-8 stehen. Da NF- $\kappa$ B eine Reihe weiterer Gene, die in der Entzündungsphase der Wundheilung eine Rolle spielen, reguliert (Pahl, 1999), ist es wahrscheinlich, dass nicht nur IL-8 vermehrt gebildet wird. Zu nennen wären hier neben den Chemokinen z.B. auch Adhäsionsmoleküle (Shi and Pamer, 2011).

#### 4.1.4 **Untersuchung des Einflusses von *Calendula*-Extrakten sowie Triterpenen auf die Reepithelialisierung**

*In vivo* zeigten verschiedene *Calendula*-Extrakte eine Steigerung der Reepithelialisierung. Dabei stehen insbesondere die Migration und Proliferation der Keratinocyten in den Wundspalt im Vordergrund. Der Scratch Assay bietet neben anderen *in vitro* Methoden eine Möglichkeit, diese Prozesse zu simulieren und somit den Einfluss der *Calendula*-Extrakte darauf zu untersuchen. Fronza et al. konnten bereits im Scratch Assay unter Verwendung von NIH-3T3-Mausfibroblasten für einen *n*-Hexan- und Ethanol-Extrakt eine Steigerung der Zellzahl im artifiziellen Wundspalt nachweisen (Fronza et al., 2009). Für die 3 *Calendula*-Extrakte (HE, EE, WE) konnte kein Einfluss auf den künstlichen Spalt im Scratch Assay mit humanen immortalisierten Keratinocyten nachgewiesen werden. Die Abnahme der geschlossenen Wundfläche nach Stimulation mit 50  $\mu$ g/ml HE bzw. EE kann durch eine Reduktion der Zellviabilität der beiden Extrakte in dieser Testkonzentration erklärt werden. Hierfür könnte das Vorkommen von Sesquiterpenglycosiden in HE bzw. Triterpensaponinen in EE verantwortlich sein. Für eine Reihe von aus *C. officinalis* isolierten Sesquiterpenglycosiden und einigen Triterpensaponinen aus *C. officinalis* bzw. *C. arvensis* konnten bei verschiedenen Zelllinien eine Hemmung der Zellviabilität gezeigt werden (D'Ambrosio et al., 2015; Quetin-Leclercq et al., 1992).

Fronza et al. konnten ebenfalls für Faradiol 3-myristat und –palmitat im Scratch Assay mit NIH-3T3-Mausfibroblasten eine signifikante Zunahme der Zellen im Wundspalt zeigen (Fronza et al., 2009). Aus diesem Grund wurden unter Verwendung von immortalisierten Keratinocyten eine Reihe verschiedener Triterpene, darunter Monole, Monoester und Diester, im Scratch Assay untersucht. Es wurden aber keine signifikanten Effekte, höchstens Tendenzen zu einem erhöhten Wundschluss beobachtet, sodass keine Aussage zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen getroffen werden können. Da aber letztlich der Scratch Assay nur eine beschränkte Aussagekraft hat (Werner, 2016), kann keine endgültige Aussage getroffen werden, ob Triterpene aus *C. officinalis* bei der Reepithelialisierung eine Rolle spielen.

Interessant wäre es, die Triterpene, vor allem Calenduladiol, zu untersuchen, inwieweit das bei der Migration sich verändernde Aktincytoskelett beeinflusst wird. Für Betulin, dem Hauptbestandteil des Birkenkork-Extrakts sowie Lupeol konnte eine Beeinflussung des Aktincytoskeletts nachgewiesen werden. Calenduladiol, ebenfalls ein Triterpen vom Lupan-Typ, das im Gegensatz zu Betulin die 2. OH-Gruppe an C-16 und nicht an C-28 trägt, könnte einen ähnlichen Effekt zeigen. Auch das in dieser Arbeit erstmals beschriebene Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol könnte in diesem Zusammenhang mit untersucht werden. Allerdings ist anzumerken, dass beide Triterpene im Vergleich zu anderen Triterpenen, wie Faradiol nur in geringer Konzentration und in Form ihrer 3-Monoester in *Calendula*-Blüten vorkommen und damit eine Korrelation zu Betulin und dem Triterpenextrakt (TE) aus dem Birkenkork schwer möglich ist.

#### 4.1.5 **Beeinflussung des Kollagengehaltes durch *Calendula*-Extrakte, Carotinoide und Retinoide**

Nach offiziellen Monografien, wie von der ESCOP und Kommission E stellen auch schlecht heilende Wunden, die durch eine gestörte Gewebeneubildungsphase charakterisiert sind, eine Indikation für *Calendula*-Zubereitungen dar. In dieser Phase wird Kollagen als Hauptkomponente der EZM, insbesondere Kollagen des

Typs I in Fibroblasten neu synthetisiert und in das Wundbett sezerniert. In der Gewebeumbauphase wird Kollagen des Typs I in den Typ III durch das Mitwirken von MMPs umgewandelt. Chronische Wunden sind u.a. aufgrund einer prolongierten Inflammation durch eine verminderte Kollagensynthese sowie einen gesteigerten Kollagenabbau gekennzeichnet (Blakytyn and Jude, 2006). Die verstärkte Proteolyse lässt sich durch eine erhöhte Expression und Aktivität der MMPs und einer verringerten Expression der physiologischen TIMPs erklären. Somit stellt die Inhibierung einer überschießenden Aktivität der MMPs einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von chronischen Wunden dar (Toriseva and Kähäri, 2009). Allerdings ist nicht eine generelle Inhibierung aller MMPs wundheilungsfördernd. So führte in einem diabetischen *in vivo* Wundmodell ein MMP-9-Inhibitor zu einer Beschleunigung der Wundheilung und Reepithelialisierung, während ein MMP-8-Inhibitor die Wundheilung verzögerte (Gooyit et al., 2014). In verschiedenen *in vivo* Wundmodellen wurde nach Behandlung mit *Calendula*-Extrakten eine Steigerung des Kollagengehalts beobachtet (Aro et al., 2015; Naeini et al., 2012; Okuma et al., 2015). Untersuchungen, wodurch der erhöhte Kollagengehalt erklärt werden kann, fehlten bisher.

Es wurde deshalb zum einen der Einfluss auf die Kollagenase getestet. Aufgrund der Ähnlichkeit zu humanen MMPs wurde der Effekt der 3 *Calendula*-Extrakte auf eine isolierte, bakterielle Kollagenase in einem *in vitro* Inhibitions-Assay untersucht (Hartmann et al., 2015). Für EE konnte eine signifikante Inhibierung der Kollagenase-Aktivität um ca. 50 % bei 100 µg/ml erreicht werden, während für WE dieser Effekt erst bei der hohen Konzentration von 500 µg/ml nachweisbar war. HE konnte wegen Schwierigkeiten bei der Löslichkeit nicht auf eine Inhibierung der bakteriellen Kollagenase untersucht werden. An dem nachgewiesenen Effekt von EE könnten die enthaltenen Flavonoide und Kaffeesäurederivate verantwortlich sein. Für Vertreter beider Stoffgruppen konnte bereits eine Inhibierung der Aktivität von verschiedenen humanen MMPs nachgewiesen werden (Ende and Gebhardt, 2004; Wang et al., 2012). Anzumerken ist, dass der Effekt von EE auch

noch auf humane MMPs untersucht werden müsste, da die bisherigen Ergebnisse nur als erste Hinweise auf eine MMP-Inhibierung angesehen werden können. Für *Calendula*-Tinkturen verschiedener Konzentrationen (1 – 3 %) konnten mit Hilfe der Zymographie bereits eine Hemmung von MMP-2 sowie der Kollagendegradierung bei Verwendung von gingivalen Fibroblasten nachgewiesen werden (Saini et al., 2012). Die Autoren machten für diese Effekte u.a. das in der Tinktur enthaltene Flavonoid Quercetin verantwortlich. Festzuhalten ist bei diesen Versuchen aber, dass das Versuchsdesign nicht ganz unstrittig ist. So ist nicht ganz eindeutig, ob wirklich MMP-2 vorliegt. Weiterhin wurde Quercetin als wichtige Komponente in *Calendula*-Blüten genannt, was nicht zutreffend ist. Zukünftig könnten isolierte, hauptsächlich vorkommende Flavonoidglycoside oder Kaffeesäurederivate aus *Calendula*-Blüten getestet werden, um Erkenntnisse zu gewinnen, welche Inhaltsstoffe für eine Inhibierung der Kollagenase verantwortlich sind.

Allerdings stellt die Inhibierung der aktiven MMPs nur einen Angriffspunkt dar. Weitere potentielle Möglichkeiten einer Beeinflussung durch *Calendula*-Extrakte und deren Inhaltsstoffe wären die Transkription der MMP-Gene sowie deren aktivierende Signalwege, die Aktivierung der MMPs aus den pro-MMPs oder die Expression von TIMPs, was in der Folge zu einem verringerten Kollagenabbau führen könnte (Khokha et al., 2013).

Eine weitere Möglichkeit den Kollagengehalt in chronischen Wunden zu erhöhen, ist eine Steigerung der Kollagensynthese. Der Sircol Collagen Assay ist geeignet, das lösliche Kollagen im Überstand einer Zellkultur mit dem Farbstoff Picro Sirius Red zu komplexieren und nach Auflösen photometrisch zu bestimmen. Diese Methode wurde daher für die Verwendung bei humanen primären Fibroblasten im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Von den 3 *Calendula*-Extrakten führte nur EE in beiden Testkonzentrationen (10 und 50 µg/ml) zu einer leichten Erhöhung des Kollagengehalts im Überstand. Hierbei zeigte sich, dass die Menge an Kollagen, das von den Fibroblasten gebildet wird, durch das „Hungern“ der Zellen und den FCS-

Gehalt im Medium beeinflusst wird. Letztlich konnten reproduzierbare Ergebnisse nur ohne vorheriges „Hungern“ nach 24-stündiger Kultivierung in 1 % FCS-haltigem Medium erreicht werden. Möglicherweise sind die in EE enthaltenen Flavonoide und Triterpensaponine für die Erhöhung des Kollagengehalts verantwortlich. Sowohl für Triterpensaponine vom Oleanan-Typ als auch verschiedenen Flavonoide konnte eine gesteigerte Kollagensynthese in einer Fibroblastenzellkultur nachgewiesen werden (Morikawa et al., 2015; Nazaruk and Galicka, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte aber, trotz Verwendung angereicherter Flavonoid- und Triterpensaponinfraktionen, keine signifikant erhöhte Kollagenbildung erzielt werden. Somit kann auch in diesem Punkt die Frage nach den Wirkstoffen nicht beantwortet werden.

Da Carotinoide zu den Hauptinhaltsstoffen der *Calendula*-Blüten zählen, stellte sich die Frage, inwieweit die Carotinoide und deren Abbauprodukte aus *Calendula*-Blüten über eine Steigerung der Kollagensynthese und / oder Hemmung des Kollagenabbaus die Bildung des Granulationsgewebes und damit die Wundheilung beschleunigen. Dr. E. Schneider untersuchte in ihrer Doktorarbeit verschiedene aus *Calendula*-Blüten isolierte Carotinoidfraktionen auf die Proliferation von Fibroblasten und die Kontraktion von Kollagengelen. Sie konnte keine Effekte in den ihr zur Verfügung stehenden biologischen Testsystemen beobachten. Die Frage, zu welchem Maße Carotinoide aus *Calendula*-Blüten den Wundheilungsprozess beeinflussen, konnte nicht beantwortet werden (Schneider, 1993). Gründe hierfür könnten in der großen Instabilität der Carotinoide und dem notwendigen Metabolismus liegen. Trotzdem sollten die Carotinoide als potentielle Wirkstoffe nicht außer Acht gelassen werden.

Carotinoide mit einer  $\beta$ -Iononeinheit, wie  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin, könnten enzymatisch über die BCO1 in Retinol (Vitamin A) gespalten und dann zu *at*-Retinsäure und 9-*cis*-Retinsäure als aktive Metaboliten umgewandelt werden. Die BCO1 ist bereits in der humanen Epidermis nachgewiesen worden (Lindqvist and Andersson, 2004). Außerdem konnte in einer Fibroblastenzellkultur auch die

Umwandlung von  $\beta$ -Carotin zu Retinol gezeigt werden (Wei et al., 1998). Die topische Anwendung von *at*-Retinsäure und anderen Retinoiden soll insbesondere bei chronischen Wunden zu einer Beschleunigung der Heilung führen (Abdelmalek and Spencer, 2006). In einer randomisierten, doppel-verblindeten, Placebo-kontrollierten Studie führte die topische Behandlung von Fußulzera bei Diabetikern mit einer 0,05 %igen Tretioninlösung zu einer signifikanten Verkleinerung der Größe und Tiefe der Ulzera (Tom et al., 2005). In humanen primären Fibroblasten führte die Stimulation mit *at*-Retinsäure bzw. ihres Tocopherylestern zu einer Erhöhung von Kollagen auf mRNA- und Proteinebene (Kim et al., 2008; Mori et al., 1994). Weitere potentielle Wirkstoffe mit Ähnlichkeit zu den Retinoiden könnten kürzerkettige Spaltprodukte der Xanthophylle und Carotine, die auf physikochemischen Weg durch Einwirkung von Luftsauerstoff, Temperatur und UV-Licht entstanden sind, darstellen (Boon et al., 2010). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Fraktionen nach SC-Trennung von HE, in denen Carotine bzw. Xanthophylle angereichert waren sowie  $\beta$ -Carotin, *at*-Retinsäure, Retinol und Oxidationsprodukte des  $\beta$ -Carotins auf eine mögliche Beeinflussung des Kollagengehalts mittels des Sircol Collagen Assays untersucht. Die getesteten Fraktionen wiesen nur sehr schwache Effekte auf den Kollagengehalt auf, wohingegen Retinol und *at*-Retinsäure zu keiner Erhöhung des Kollagengehalts gegenüber der LM-Kontrolle führten und  $\beta$ -Carotin sogar eine Abnahme des löslichen Kollagens bewirkte. Auch in der Literatur konnte bei Verwendung von normalen Nierenfibroblasten von Ratten (NRK-49F) für *at*-Retinsäure 5  $\mu$ M nur eine Steigerung an Kollagen um ca. das 1,3-fache gegenüber der Kontrolle beobachtet werden, wobei hier nur die gemessenen Absorptionen ins Verhältnis gesetzt worden sind (Rankin et al., 2013). Aus diesem Grund wäre es sehr interessant, den Einfluss der Carotinoide aus *Calendula*-Blüten auf die MMPs genauer zu untersuchen. Für Astaxanthin, ein in Algen vorkommendes Xanthophyll wurde bereits in Chondrocyten eine Abnahme der mRNA verschiedener MMPs gezeigt und eine nicht kovalente Bindung an MMP-13 mittels *in silico* Analyse vorhergesagt (Bikádi et al., 2006; Chen et al., 2014). Somit könnten auch die

intakten Xanthophylle und Carotine aus *Calendula officinalis* einen Einfluss auf die Expression und Aktivität der MMPs besitzen. Allerdings stellt die biologische Testung von Carotinoiden aufgrund der hohen Instabilität eine große Herausforderung dar. Daher müssten *in vitro* Versuche stets mit Stabilitätsuntersuchungen und geeigneten analytischen Verfahren zur Identifizierung von möglichen Abbauprodukten, die als potentielle Wirkstoffe in Frage kommen könnten, kombiniert werden.

#### 4.1.6 **Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation liefern neue Erkenntnisse über die mögliche Wirkungsweise von *Calendula*-Zubereitungen bei der Wundheilung: Zum einen eine Beeinflussung der Inflammationsphase durch HE und EE; zum anderen eine Beeinflussung der Bildung des Granulationsgewebes über eine Erhöhung des Kollagengehalts durch EE. Abschließend bleibt aber die Frage nach den Wirkstoffen offen. Neben dem Einfluss von Triterpenen, Triterpensaponinen, Flavonoidglycosiden und Kaffeesäurederivaten kann insbesondere eine mögliche Steigerung der Bildung des Granulationsgewebes durch die Carotinoide diskutiert werden. Zukünftig sind weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen notwendig, um den wundheilungsfördernden Mechanismus und die Wirkstofffrage von *Calendula*-Zubereitungen zu klären. Auch die Polysaccharide sollten aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung in Zukunft insbesondere auf einen möglichen Einfluss auf die Inflammationsphase näher untersucht werden.

## 4.2 Untersuchungen zu den entzündungshemmenden Eigenschaften von Matricin

*Matricaria recutita* L. hat eine lange Tradition als Arzneipflanze in Europa. Bei den Wirkungen ist besonders die *in vivo* nachgewiesene entzündungshemmende Wirksamkeit hervorzuheben (HMPC, 2011). Wie es für Arzneipflanzenzubereitungen oft der Fall ist, dürfte auch hier der Extrakt der Wirkstoff sein. Trotzdem stehen das Proazulen Matricin und seine Degradationsprodukte Chamazulencarbonsäure und das Azulen Chamazulen immer wieder im Mittelpunkt als potentielle Wirkstoffe. Matricin, ein Sesquiterpenlacton vom Guaianolid-Typ ohne eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketogruppe, zeigte in verschiedenen *in vivo* Modellen, z.B. im Mausohrödementest antiinflammatorische Wirkungen (Zidorn et al., 1999; Zitterl-Eglseer et al., 1991). In einer *in vitro* Untersuchung unter Verwendung von Endothelzellen führte Matricin zu einer Verringerung der durch TNF- $\alpha$  und LPS induzierten ICAM-1-Expression. Die nachgewiesenen Effekte wurden mit einer Beeinflussung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Matricin erklärt, wobei das molekulare Target von Matricin nicht geklärt werden konnte (Flemming et al., 2015).

Auf der Suche nach dem molekularen Target von Matricin identifizierte Prof. Dr. G. Schneider, ETH Zürich den IL-1-Rezeptor in einer *in silico* Analyse als ein mögliches Target. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die als Proformen exprimiert und noch vom IL-1-Konversionsenzym (ICE; entspricht der Caspase 1) in die aktiven Formen überführt werden müssen, können entweder an ihre Rezeptoren IL-1RI oder IL-1RII oder den IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) binden (Weber et al., 2010). IL-1 ist bei verschiedenen chronischen entzündlichen Erkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis, COPD und Morbus Crohn, überexprimiert. Daher ist IL-1 ein interessantes therapeutisches Target bei der Entwicklung von Antiphlogistika. Neben dem bekanntesten Wirkstoff Anakinra, einem humanen, rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten, wurden auch seitens der pharmazeutischen Industrie unterschiedliche kleine Moleküle auf die Beeinflussung des IL-1-Signalwegs

getestet. Interessanterweise war unter den kleinen Molekülen auch ein terpenoides Lacton (LL-Z1271a), welches aus einem Pilz isoliert wurde und die IL-1 $\beta$ -Produktion hemmen soll (Braddock and Quinn, 2004). Keines der in diesem Artikel aufgeführten kleinen Moleküle hatte den IL-1-Rezeptor als Target.

Neben dem TNF-Rezeptor greift auch der IL-1-Rezeptor in die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ein (Grabbe et al., 2011). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Matricin über eine Inhibierung des IL-1-Rezeptors zu einer Reduktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität führt, um damit das von Prof. Dr. G. Schneider vorhergesagte Target experimentell zu bestätigen.

Im EMSA führte die Stimulation von humanen immortalisierten Keratinocyten mit IL-1 $\beta$  5 ng/ml zu einer Steigerung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität, die jedoch durch Vorstimulation der Zellen mit Matricin nicht reduziert wurde. Gleiches war der Fall bei Verwendung von TNF- $\alpha$ . Diese Ergebnisse zeigen, dass Matricin nicht den IL-1-Rezeptor blockiert und somit die aktivierende Wirkung von IL-1 $\beta$  auf die NF- $\kappa$ B-Kaskade unterbindet. Außerdem kann auch eine direkte Inhibierung von NF- $\kappa$ B durch Matricin ausgeschlossen werden. Hierfür kann das Fehlen einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketogruppe bei Matricin als entscheidendes Strukturelement für die Bindung an die p65-Unterheiten des NF- $\kappa$ B verantwortlich gemacht werden (Siedle et al., 2004). Auch in Jurkat-Zellen zeigte Matricin neben Tigloyl- und Angelicoylartabsin, 2 Proazulenen aus *Achillea millefolium*, keine Hemmung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität (Lyss, 2000).

In einem weiteren Versuch, in dem Kernextrakte gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass 50  $\mu$ M Matricin nicht die durch TNF- $\alpha$  induzierte Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern inhibiert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit den Beobachtungen von (Flemming et al., 2015), die für Matricin in der gleichen Testkonzentration eine Reduktion der durch TNF- $\alpha$  induzierten Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern auf 74 % mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen haben. Ob diese Diskrepanz zelltypabhängig ist, dürfte unwahrscheinlich sein.

Da die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 über den NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert wird und auch in Keratinocyten erfolgt (Leung, 1999; Pahl, 1999), wurde der Einfluss von Matricin auf die mRNA-Expression von ICAM-1 untersucht. Dabei führte Matricin zu einer konzentrationsabhängigen Senkung der durch TNF- $\alpha$  induzierten mRNA-Expression von ICAM-1, wodurch das Ergebnis von (Flemming et al., 2015) in HMEC-1 bestätigt werden konnte. Da (Flemming et al., 2015) für Matricin in einem Luciferase Reporter-Gen-Assay eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch TNF- $\alpha$  induzierten transkriptionellen Aktivität nachgewiesen hatten, kann diskutiert werden, dass NF- $\kappa$ B zwar an die DNA bindet, aber die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B gehemmt wird. Eine Möglichkeit könnte sein, dass Matricin die für eine transkriptionelle Aktivität notwendige Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Komplexes, z.B. durch p38 MAPK, unterbindet oder ähnlich wie Glucocorticoide durch Bindung an p300 den NF- $\kappa$ B-Komplex so verändert, dass eine Transkription des Targetgens verhindert wird (Aktories et al., 2009). Hierfür sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig, um das molekulare Target von Matricin bei der antiinflammatorischen Wirkung zu finden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 13: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie / Reagenz	Anbieter
$\alpha$ -Amyrin	Roth (Karlsruhe)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30)	Roth (Karlsruhe)
all- <i>trans</i> -Retinsäure	Sigma (Steinheim)
Aluminiumoxid neutral Grad I	Merck (Darmstadt)
Ameisensäure	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Anisaldehyd	Sigma (Steinheim)
Aprotinin	Sigma (Steinheim)
$\beta$ -Amyrin	Roth (Karlsruhe)
$\beta$ -Carotin	Sigma (Steinheim)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
BSA (Bovine Serum Albumine)	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	VWR (Darmstadt)
Chloroform-d1	Deutero GmbH (Kastellaun)
Chlorogensäure	Roth (Karlsruhe)
Ciprobay® 400	Bayer (Leverkusen)
Cyclohexan	VWR (Darmstadt)
D <sub>2</sub> O	Deutero GmbH (Kastellaun)
Dichlormethan (Methylenchlorid)	VWR (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
DMSO-d6	Deutero GmbH (Kastellaun)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Diphenboryloxyethylamin (Naturstoffreagenz A)	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
DMEM, high Glucose (4,5 g/l)	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Ethanol, technisch	Chemikalienausgabe Makro-molekulare Chemie (Freiburg)

## Fortsetzung Tab. 13.

Chemikalie / Reagenz	Anbieter
Ethanol, p.a.	Merck (Darmstadt)
Ethylacetat	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Ficoll 400	Sigma (Steinheim)
Florisil®	Roth (Karlsruhe)
Gibco™ Antibiotic-Antimycotic Mix (100 x)	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Sigma (Steinheim)
HEPES ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethanosulfonsäure)	Sigma (Steinheim)
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Hyperosid	Roth (Karlsruhe)
IL-1 $\beta$ , rekombinant, human	Sigma (Steinheim)
Kaffeensäure	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Keratinocyten SFM (1x) mit L-Glutamin, Glukose 5,5 mM	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Kieselgel 60 (0,015 – 0,04 mm)	Roth (Karlsruhe)
Kieselgel 60 (0,063 – 0,02 mm)	Roth (Karlsruhe)
L-Ascorbinsäure-2-phosphat Sesquimagnesium	Sigma (Steinheim)
Leupeptin	Roche (Mannheim)
Macrogol 400 (PEG 400)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	VWR (Darmstadt)
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxyd	Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	Roth (Karlsruhe)
<i>n</i> -Butanol	VWR (Darmstadt)
<i>n</i> -Hexan	Fischer Scientific (Schwerte)
NF- $\kappa$ B Oligonucleotid	Promega (Mannheim)
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma (Steinheim)
Penicillin / Streptomycin Lyophilisat 500x	Roche (Mannheim)

Fortsetzung Tab. 13.

Chemikalie / Reagenz	Anbieter
Pepstatin	Roche (Mannheim)
Petrolether	VWR (Darmstadt)
PDGF-BB	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Steinheim)
Retinol	Sigma (Steinheim)
Rutosid	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 37 %	Roth (Karlsruhe)
Seesand	Roth (Karlsruhe)
Sephadex LH-20	Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure, konzentriert	VWR (Darmstadt)
Stigmasterol	Roth (Karlsruhe)
Supplement für Keratinocyte SFM (EGF und BPE)	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Taraxasterolacetat	PhytoLab (Vestenbergsreuth)
Thiazolblau	Roth (Karlsruhe)
TNF- $\alpha$ , rekombinant, human	R&D Systems (Minneapolis)
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Steinheim)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
T4 Polynucleotid Kinase	New England Biolabs (Frankfurt)

### 5.1.2 Kits, Primer und Sonden

Tab. 14: Verwendete Kits, Primer und Sonden.

Kit / Primer und Probes	Anbieter
Human IL-8 ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis)
KAPA PROBE FAST Universal	Peqlab (Erlangen)
LightCycler® 480 Probes Master Mix	Roche (Basel)
Primer und Sonden für den LightCycler® 480	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TaqMan® Reverse Transcription Reagenzien	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen (Venlo)
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen (Venlo)
Sircol Collagen Assay Kit	Biocolor Ltd. (Carrickfergus)

### 5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Anbieter
6-, 12-, 24 und 96-Well-Zellkulturplatten	Greiner (Frickenhausen)
Aluminiumfolie	Roth (Karlsruhe)
Atenschutzmaske FFP-1 und FFP-3	Roth (Karlsruhe)
Autoklavierbare Müllsäcke, versch. Größen	Roth (Karlsruhe)
Deckgläser Neubauer-Zählkammer	Menzel GmbH (Braunschweig)
Einmalpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Einmalhandschuhe Natural Latex PF 240	Eco-Schild (Malaysia)
Falcon-Tubes (15 und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Greiner (Frickenhausen)
Kryoröhrchen	Roth (Karlsruhe)
LightCycler® 480, 96-Well-Platte	Roche (Basel)
LightCycler® 480, Abdeckfolie	Roche (Basel)
Multi® Reaktionsgefäße, RNase-frei (0,2 und 1,5 ml)	Roth (Karlsruhe)
Nitrilhandschuhe rotiprotect-NITRIL puderfrei	Roth (Karlsruhe)
Omnifix® 10 ml Spritzen	Roth (Karlsruhe)
Omnifix®-F 1 ml Spritzen	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten 230 mm	Roth (Karlsruhe)
Pinzette	Roth (Karlsruhe)

Fortsetzung Tab. 15.

Verbrauchsmaterial	Anbieter
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Greiner (Frickenhäusen)
Reaktionsgefäße (0.2, 0.5, 1.5, 2.0 ml)	Roth (Karlsruhe)
Sterican® 20G Kanüle	Braun (Melsungen)
Zellschaber 30 cm	Biochrom, Berlin

#### 5.1.4 Geräte

Tab. 16: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav 5075 ELV	Systec (Wettenberg)
BÜCHI Sepacore® Chromatographie System	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen)
CAMAG Automatic TLC Sampler 4	CAMAG (Berlin)
CAMAG DC-Kammer	CAMAG (Berlin)
CAMAG Reprostar 3	CAMAG (Berlin)
Clean Air Sicherheitswerkbank	Clean Air Technik (Worden)
Fluorostar Optima	BNG LaborTech (Offenburg)
Hera cell 150	Kendro (Haunau)
IKA HB 4 digital	IKA Werke (Staufen i. Br.)
LightCycler® 480	Roche (Basel)
Maxisafe 2020	Thermo Scientific (Langenselbold)
Membranpumpe KNF Laboport	KNF Neuberger (Freiburg)
Membran-Vacuumpumpe	Vacuubrand (Wertheim)
Model 680 Microplatereader	Bio-Rad (Japan)
Multipipetten	Eppendorf (Hamburg)
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Nicon Eclipse TS100-F LED	Nicon Instruments Inc. (Tokyo)
pH-Elektrode Inlab® Micro	Mettler Toledo (Greifensee)
pH-Meter CG 825	Schott (Hofheim a. TS.)
Phosphoimager Fla 3000	Fujifilm (Tokyo)
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences (Chur)
Pipetten (versch. Größen)	Eppendorf (Hamburg)
Rozina 35R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Stickstofftank Arpege 110 AirLiquide	KGW Isotherm (Karlsruhe)

Fortsetzung Tab. 16.

Gerät	Hersteller
Tiefkühlschrank VIP series -86°C	Sanyo (San Diego)
Trockenschrank T6060	Heraeus (Hanau)
Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin (Berlin)
Vortexer Genie-2	Scientific Industries (Bohemia)
Vortexer Lab dancer	Roth (Karlsruhe)

## 5.2 Phytochemische Untersuchungen

### 5.2.1 Spektroskopische Methoden

#### 5.2.1.1 Massenspektrometrie (MS)

Die HR-APCI- und HR-ESI-Massenspektren wurden im Positiv- und Negativmodus mit einem Exactive™ Massenspektrometer (Thermo Scientific) nach Direkteinlass in Methanol mit einer Flussrate von 100 µl/min aufgenommen.

#### 5.2.1.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}} = 7,28$ ;  $\delta_{\text{C}} = 77,02$ ), D<sub>2</sub>O ( $\delta_{\text{H}} = 4,97$ ) und DMSO-d<sub>6</sub> ( $\delta_{\text{H}} = 2,50$ ;  $\delta_{\text{C}} = 39,52$ ) mit dem Spektrometer Bruker DRX 400 MHz (Bruker, Bremen) mit den Messfrequenzen 400 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) und 100 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) gemessen. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) wird in ppm, auf den Standard Trimethylsilan (TMS) bezogen, angegeben. Die Angabe der Kopplungskonstanten erfolgt mit den J-Werten in Hz.

## 5.2.2 Chromatographische Methoden

### 5.2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische DC wurden Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-DC-Alufohlen der Größen 20 x 20, 20 x 10, 10 x 20 und 10 x 10 cm verwendet. Die Untersuchungs- und Referenzlösungen (zwischen 5 und 20 µl) wurden bandenförmig mit Hilfe des Automatic TLC Samplers-4 (AST-4, CAMAG) aufgetragen. In Abhängigkeit der zu trennenden Substanzen wurden die DC-Platten in einer Glaskammer mit Kammersättigung mit verschiedenen Fließmittelsystemen über eine Laufstrecke von 8 bis 15 cm entwickelt und anschließend mit verschiedenen Detektionsreagenzien besprüht. In Tab. 17 sind die jeweiligen Fließmittelsysteme und Detektionsreagenzien für die DC-Analytik verschiedener Inhaltsstoffgruppen zusammengestellt. Vor und nach der Derivatisierung wurden die DC-Platten bei 254 nm, 366 nm und im vis mit dem Kamerasystem CAMAG Reprostar 3 fotografiert. Die R<sub>f</sub>-Werte einzelner Banden wurden mit der zugehörigen Software WinCats ermittelt.

Tab. 17: Übersicht über die verwendeten Fließmittel und Detektionsreagenzien.

Verb. aus <i>C. officinalis</i>	FM	Zusammensetzung	Detektionsreagenz
Triterpene	1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOAc 9:1 v/v	Anisaldehyd/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Sesquiterpenglycoside	2	<i>n</i> -Hexan/EtOAc 1:1 v/v	Anisaldehyd/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Triterpensaponine	3	Oberphase <i>n</i> - BuOH/H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> COOH 5:4:1 v/v/v	Anisaldehyd/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flavonoide/Kaffeesäuren	4	EtOAc/H <sub>2</sub> O/HCOOH 8:1:1 v/v/v	Naturstoffreagenz A/PEG 400

Detektionsreagenzien

Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:

Nach dem Erkalten der Mischung aus 85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure werden 0,5 ml Anisaldehyd R zugesetzt. Die DC-Platte wird gleichmäßig besprüht und bis zur Farbentwicklung für 5 min bei 120 °C auf die Heizplatte gelegt.

Naturstoffreagenz A/PEG 400:

Direkt nach dem Besprühen mit 1 %-iger Naturstoffreagenz A Lösung in Methanol wird die DC-Platte mit 5 %-iger PEG 400 Lösung in Methanol besprüht und für 10 min auf die Heizplatte bei 120 °C gelegt.

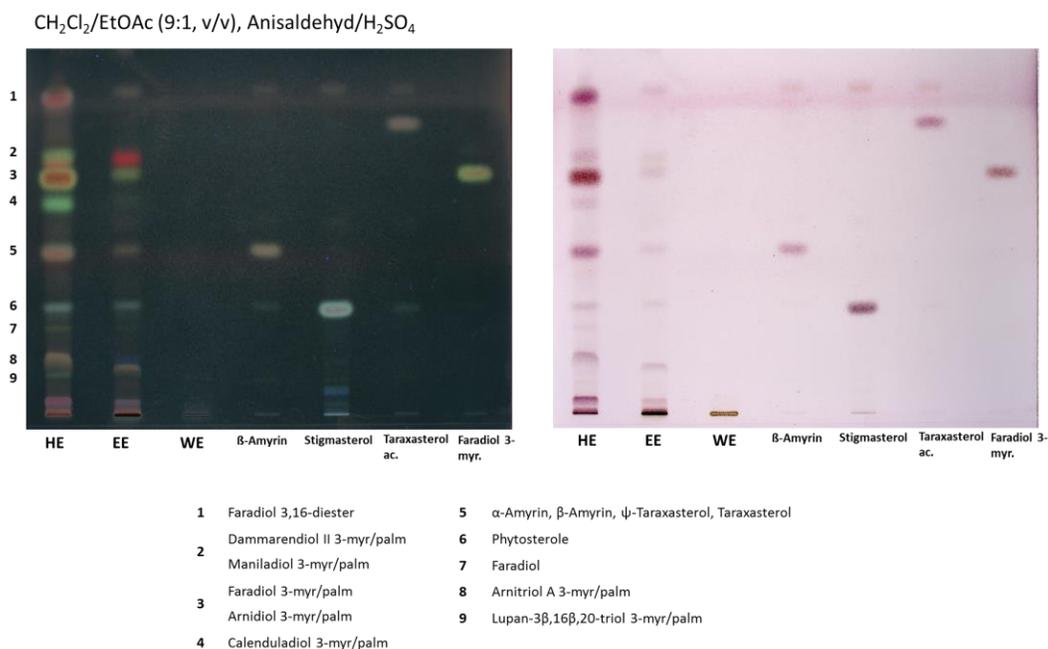
DC-Charakterisierung der Extrakte und Fraktionen aus Calendula-Blüten

Abb. 125: DC-Untersuchung der *Calendula*-Extrakte (HE, EE, WE) auf Triterpene und Zuordnung von Triterpenen und Sterolen in HE. Links: Detektion im UV bei 366 nm ohne Derivatisierung. Rechts: Detektion im vis nach Erhitzen bei 120 °C für 10 min.

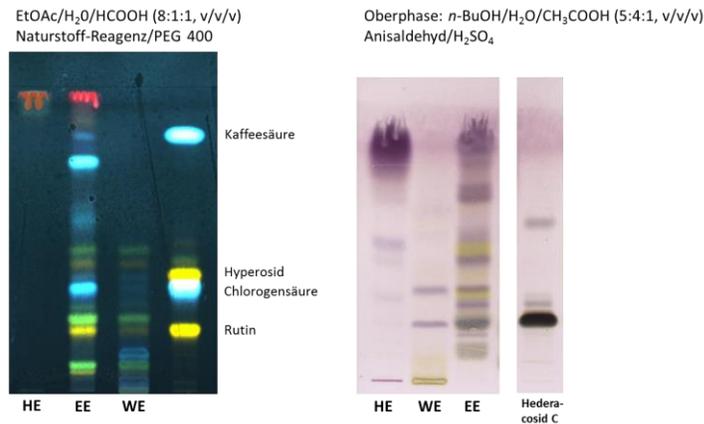


Abb. 126: DC-Untersuchung der *Calendula*-Extrakte (HE, EE, WE) auf Flavonoide, Kaffeesäurederivate und Triterpensaponine. Links: Untersuchung auf Flavonoide und Kaffeesäurederivate, Aufnahme im UV bei 366 nm. Rechts: Untersuchung auf Triterpensaponine, Aufnahme im vis nach Erhitzen bei 120 °C für 10 min.

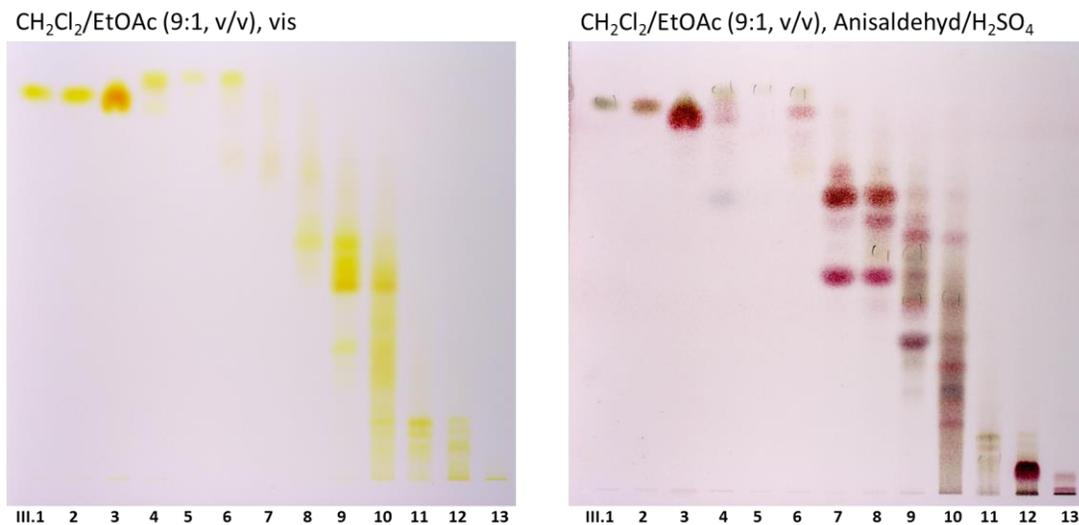
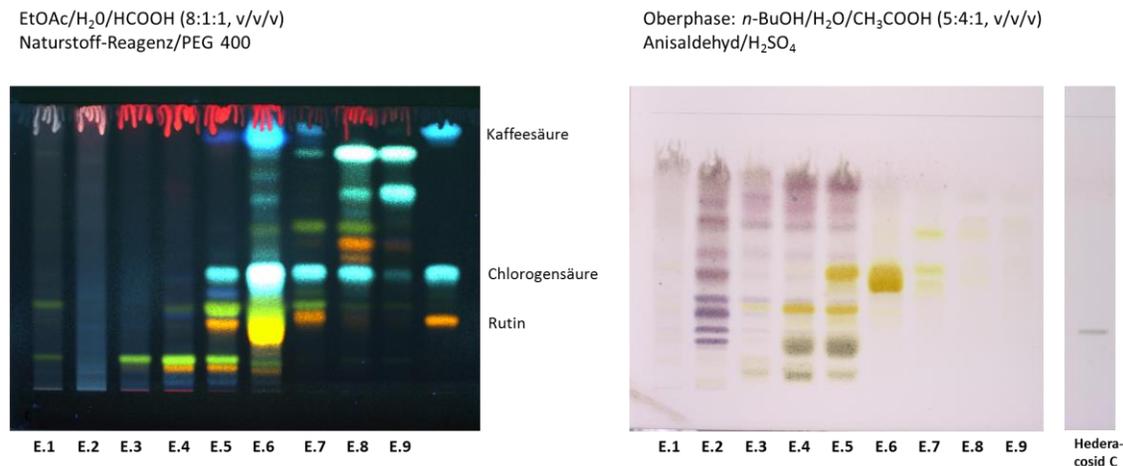


Abb. 127: DC-Untersuchung der Fraktionen nach SC-Trennung von HE über neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> auf Carotinoide und Triterpene. Links: Detektion im UV bei 366 nm ohne Derivatisierung. Rechts: Detektion im vis nach Derivatisierung und Erhitzen bei 120 °C für 10 min.



**Abb. 128:** DC-Untersuchung der Fraktionen nach SC-Trennung von EE über Sephadex LH-20 auf Flavonoide, Kaffeesäurederivate und Triterpensaponine. Links: Untersuchung auf Flavonoide und Kaffeesäurederivate, Aufnahme im UV bei 366 nm. Rechts: Untersuchung auf Triterpensaponinen Aufnahme im vis nach Erhitzen bei 120 °C für 10 min.

**Tab. 18:** R<sub>f</sub>-Werte der Verbindungen 1 - 18 aus *C. officinalis* sowie deren Anfärbung mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Angabe der R<sub>f</sub>-Werte in Bezug auf FM 1: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 9:1 v/v, \*FM 2: *n*-Hexan/EtOAc 1:1 v/v.

Verbindung	R <sub>f</sub> -Wert	Anfärbung nach Derivatisierung
1 – 4	0,93	rosaviolett
5a+b	0,86	rotviolett
6a+b	0,14	rotviolett
7a+b	0,11	rotviolett
8a+b	0,87	rotviolett
9a+b	0,71	rotviolett
10	0,24	rotviolett
11a+b / 12a+b	0,78	rotviolett
13 - 16	0,54	rotviolett
17+18	0,21*	violett

### 5.2.2.2 Offene Säulenchromatographie (SC)

Glassäulen verschiedener Größen wurden je nach Trennung mit Kieselgel 60 (0,063 – 0,2 mm), Florisil® (60 - 100 mesh), neutralem Aluminiumoxid Aktivitätsgrad III oder Sephadex LH-20 in Suspension mit dem jeweiligen Elutionsmittel nach einer Quelldauer von 1 h befüllt. Für die Herstellung von neutralem Aluminiumoxid Aktivitätsgrad III wurde eine Suspension der entsprechenden Menge neutralem Aluminiumoxids Aktivitätsgrad I in Methanol hergestellt und mit 6 % (m/m) Wasser versetzt und 1 h stehen gelassen, um die Aktivität zu verringern. Die Proben wurden im jeweiligen Elutionsmittel in einem geringen Volumen gelöst und mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig auf das Gelbett aufgetragen. In Ausnahmen wurde die Probe an die stationäre Phase adsorbiert auf das Gelbett aufgetragen.

### 5.2.2.3 Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC)

Die MPLC-Trennungen wurden mit dem Sepacore® Chromatographie System, welches aus dem C 605 Pumpenmodul, der C 620 Kontrolleinheit, einem C 635 UV Detektor, dem C 660 Fraktionssammler und der Kontrollsoftware Sepacore® Control 1.2 besteht, durchgeführt. Die Polypropylen-Säulen wurden trocken mit der Füllstation Cartridge® C-670 mit Kieselgel 60 (0,015 – 0,04 mm) befüllt.

### 5.2.2.4 GC-MS

Die GC-MS-Analysen wurden mit dem Agilent 6890 Series System, bestehend aus einem Agilent 5973 Network Mass Selective Detektor (Ionisierungsenergie: 70 eV) und einer RTX®-1 MS Kapillarsäule (30 m x 0.25 mm) durchgeführt. Helium stellte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min das Trägergas dar. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl.

Temperaturgradient 1 (für Analyse der Sesquiterpene):

120 °C – 270 °C, 10 °C/min für 15 min, danach isotherm bei 270 °C für 15 min;  
Injektionstemperatur: 250 °C; Säulendurchflussrate: 1,0 ml/min; Split: 10:1

Temperaturgradient 2 (für Analyse der Triterpene):

isotherm bei 270 °C für 50 min; Injektionstemperatur: 300 °C;  
Säulendurchflussrate: 1,3 ml/min; Split: 50:1

### 5.3 Aufarbeitung des Blütenstands von *C. officinalis* L.

#### 5.3.1 Herkunft der untersuchten Blüten von *C. officinalis* L.

*Calendula officinalis* L.-Blüten (Charge: 01200812) wurden von den Feldern der Dr. Junghanns GmbH, Aschersleben, Deutschland im September 2012 gesammelt und von Dr. Junghanns identifiziert. Die Blütenköpfe hatten nach Trocknung bei 45 °C ein Trockengewicht von 510 g.

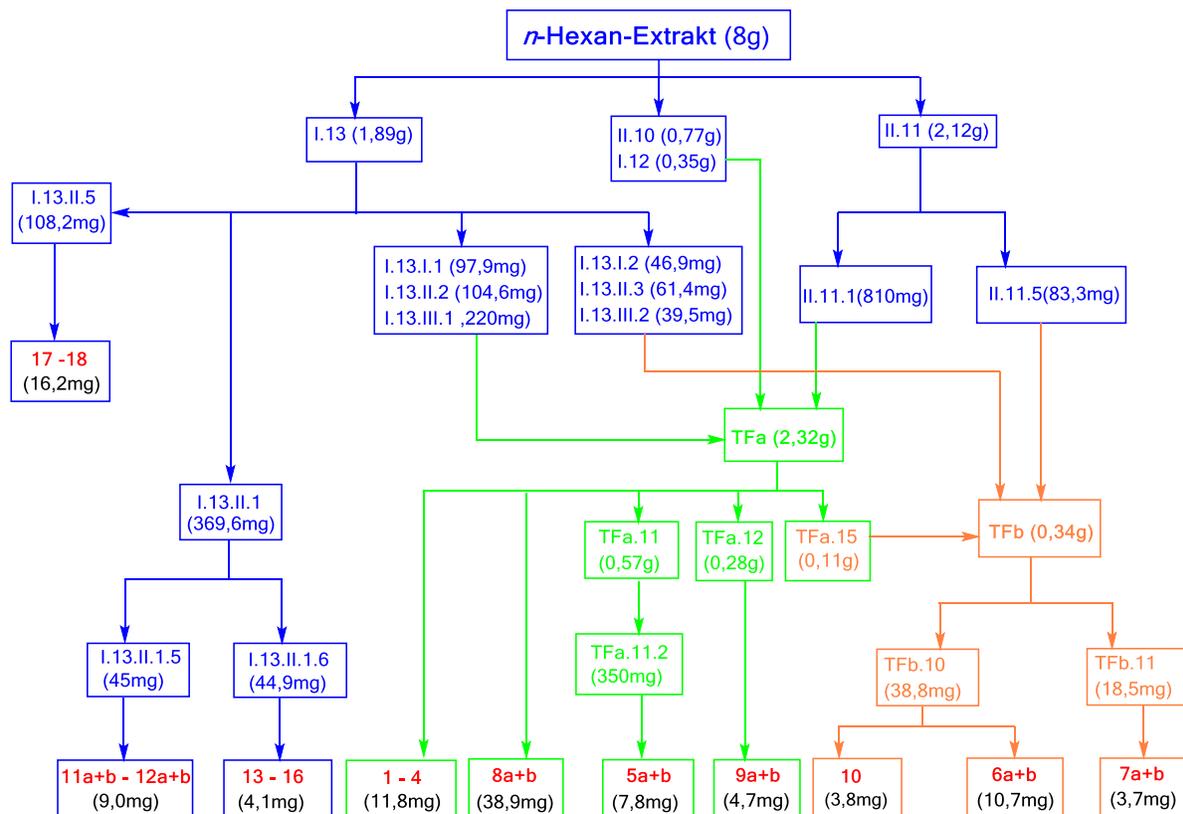
#### 5.3.2 Extraktion des Blütenstands

Für die phytochemischen und biologischen Untersuchungen wurde eine schrittweise Extraktion von 502 g der bei 45 °C getrockneten und pulverisierten Blütenkörbchen durchgeführt. Dabei wurde das Drogenmaterial erschöpfend mit *n*-Hexan und anschließend nach Trocknung des Drogenmaterials mit Ethanol in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Im letzten Schritt wurden 200 g des nach diesen beiden Extraktionen zurückgebliebenen Drogenmaterials kalt für 24 h mazeriert. Nach Entfernen des jeweiligen Lösungsmittels mittels Abrotieren bei 40 °C unter Vakuum und Gefriertrocknung wurden folgende Rückstände der Extrakte gewonnen:

*n*-Hexan-Extrakt (HE): 55,66 g;

Ethanol-Extrakt (EE): 42,12 g;

wässrige Extrakt (WE): 100,96 g.

5.3.3 Fraktionierung des *n*-Hexan-ExtraktsAbb. 129: Isolierungsschema der Verbindungen 1 - 18 aus dem *n*-Hexan-Extrakt von *C. officinalis*.

8 g des *n*-Hexan-Extrakts wurden in 2 Portionen (I und II) mittels MPLC (Polypropylen-Säule 15 x 4 cm) über Kieselgel 60 mit Petrolether/Dichlormethan 50:49 sowie steigenden Methanolanteilen (0 – 60 %) fraktioniert. Die aufgefangenen Eluate wurden nach analytischer DC mit FM 2 zu jeweils 14 und 18 Fraktionen zusammengefasst (s. Tab. 1). In einem dritten Ansatz wurden 3 g des *n*-Hexan-Extrakts (III) mittels offener SC (42 x 3 cm) über neutralem Aluminiumoxid Aktivitätsgrad III mit einem Petrolether/Diethylether-Gradienten (100:0; 95:5; 90:10; 80:20; 50:50; 0:100) sowie einem Diethylether/Ethanol-Gradienten (95:5; 80:20; 0:100) im Hinblick auf eine Trennung von Triterpenen und Carotinoiden sowie eine Trennung von Carotinen und Xanthophyllen fraktioniert.

Tab. 19: Ergebnis der SC-Trennung des *n*-Hexan-Extrakts von *C. officinalis* in 2 Portionen I und II über KG 60 mittels MPLC sowie in Portion III über neutralem Aluminiumoxid Aktivitätsgrad III.

Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg
I.1	78	II.1	55,1	III.1	8,6
I.2	22	II.2	68,8	III.2	46,1
I.3	30	II.3	43,1	III.3	342,2
I.4	13	II.4	13,7	III.4	238,4
I.5	236	II.5	280,2	III.5	14,1
I.6	28	II.6	34,0	III.6	137,4
I.7	33	II.7	35,5	III.7	1525,1
I.8	45	II.8	90,8	III.8	239,8
I.9	29	II.9	78,7	III.9	204,7
I.10	88	II.10	766,3	III.10	208,3
I.11	347	II.11	2120,1	III.11	94,1
I.12	1889	II.12	35,8	III.12	412,9
I.13	58	II.13	29,9	III.13	71,4
I.14	64	II.14	108,9		
		II.15	25,5		
		II.16	36,1		
		II.17	50,4		
		II.18	121		

Fraktion I.13 (1889 mg) wurde in 3 Portionen sowie Fraktion II.11 mittels offener SC (30 x 2 cm und 50 x 3 cm) über Florisil® mit einem Petrolether/Aceton-Gradienten (0 – 90 %) getrennt.

Tab. 20: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen I.13 in 3 Portionen sowie I.11 über Florisil.

Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg
I.13.I.1	97,9	I.13.II.1	369,6	I.13.III.1	220	I.11.1	810
I.13.I.2	46,9	I.13.II.2	104,6	I.13.III.2	39,5	I.11.2	98,2
I.13.I.3	15,5	I.13.II.3	61,4	I.13.III.3	16,8	I.11.3	71,1
I.13.I.4	16,5	I.13.II.4	38,3	I.13.III.4	21,3	I.11.4	84,3
I.13.I.5	22,8	I.13.II.5	108,2	I.13.III.5	44,7	I.11.5	83,3
I.13.I.6	36,1	I.13.II.6	18,2	I.13.III.6	13,7	I.11.6	466,4
		I.13.II.7	12,3	I.13.III.7	4,1	I.11.7	227

Fraktion I.13.II.5 (108,2 mg) wurden mittels offener SC (30 x 0,5 cm) über Kieselgel 60 isokratisch mit *n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 fraktioniert. Dabei wurden die Verbindungen **17+18** im Gemisch (I.13.II.5.3) zu 16,2 mg isoliert.

Tab. 21: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen I.13.II.5 über KG 60

Fraktion	m in mg
I.13.II.5.1	10,4
I.13.II.5.2	15,6
I.13.II.5.3	16,2
I.13.II.5.4	18,7
I.13.II.5.5	26,5

Ein Teil der Fraktion I.13.II.1 (200 mg) wurde mittels MPLC (Kartusche 12 x 150 mm) über Kieselgel 60 mit einem Cyclohexan/Dichlormethan 7:4 und Methanol Gradienten (0 – 8 %) getrennt.

Fraktion I.13.II.1.5 wurde mittels offener SC (30 x 1 cm) über Kieselgel 60 mit einem *n*-Hexan/Ethylacetat-Gradienten (8:2; 7:3; 1:1; 0:1) fraktioniert. Bei dieser Trennung konnte das Gemisch der Verbindungen **11a+b** und **12a+b** (I.13.II.1.5.6) in einer Ausbeute von 9 mg isoliert werden. Fraktion I.13.II.1.6 (44,9 mg) wurde

mittels offener SC (30 x 1cm) über Kieselgel 60 isokratisch mit Dichlormethan/Ethylacetat 9:1 getrennt. Dabei konnten 4,1 mg des Gemisches der Verbindungen **13 – 16** (I.13.II.1.6.6) zu isoliert werden.

**Tab. 22: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen I.13.II.1, I.13.II.1.5 und I.13.II.1.6 über KG 60.**

Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg
I.13.II.1.1	1,6	I.13.II.1.5.1	1,3	I.13.II.1.6.1	3
I.13.II.1.2	1,6	I.13.II.1.5.2	3,5	I.13.II.1.6.2	15,1
I.13.II.1.3	3	I.13.II.1.5.3	5,7	I.13.II.1.6.3	3,7
I.13.II.1.4	2,4	I.13.II.1.5.4	6,4	I.13.II.1.6.4	15,3
I.13.II.1.5	45,0	I.13.II.1.5.5	5,9	I.13.II.1.6.5	2,5
I.13.II.1.6	44,9	I.13.II.1.5.6	9,0	I.13.II.1.6.6	4,1
I.13.II.1.7	5,2				
I.13.II.1.8	1,9				
I.13.II.1.9	1,4				
I.13.II.1.10	10,5				
I.13.II.1.11	3,2				

Nach analytischer DC-Untersuchung auf Triterpendiolester unter Verwendung von FM 1 und Anisaldehyd/Schwefelsäure für die Derivatisierung wurden die Fraktionen I.12; II.10; II.11.1; I.13.I.1; I.13.II.2 und I.13.III.1 zu der Fraktion TFa (2,32 g) zusammengefasst. TFa wurde anschließend mittels MPLC (Kartusche 40 x 150 mm) mit einem Dichlormethan/Ethylacetat-Gradienten (0 - 30 %) fraktioniert. Mit dieser chromatographischen Trennung wurden die Gemische der Verbindungen **1 – 4** (TFa.5) in Ausbeuten von 11,2 mg und **8a+b** (TFa.9) von 38,9 mg isoliert.

**Tab. 23: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktion TFa über KG 60 mittels MPLC.**

Fraktion	m in mg
TFa.1	3,3
TFa.2	5,7
TFa.3	6,6
TFa.4	4,6
TFa.5	11,8
TFa.6	34,7
TFa.7	5,0

Fortsetzung Tab. 23.

Fraktion	m in mg
TFa.8	10,7
TFa.9	38,9
TFa.10	9,5
TFa.11	570,7
TFa.12	280,3
TFa.13	68,8
TFa.14	47,7
TFa.15	112,9

Fraktion TFa.11 wurde mittels offener SC (60 x 1,5 cm) über Kieselgel 60 mit einem Dichlormethan/Ethylacetat-Gradienten (100:0; 98:2; 95:5; 90:10) fraktioniert. Aus der Teilfraktion TFa.11.2 (350 mg) konnte nach offener SC (30 x 1,5 cm) über Kieselgel 60 mit einem *n*-Hexan/Ethylacetat-Gradienten (95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30) das Gemisch der Verbindungen **5a+b** (TFa.11.2.5, 7,8 mg) isoliert werden.

Tab. 24: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen TFa.11 ; TFa.11.2 und TFa.12 über KG 60.

Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg
TFa.11.1	3,7	TFa.11.2.1	12,4	TFa.12.1	0,5
TFa.11.2	347,1	TFa.11.2.2	1,8	TFa.12.2	3,8
TFa.11.3	193,3	TFa.11.2.3	1,8	TFa.12.3	1,1
TFa.11.4	16,2	TFa.11.2.4	7,1	TFa.12.4	6,5
TFa.11.5	20,3	TFa.11.2.5	7,8	TFa.12.5	83,8
		TFa.11.2.6	153,8	TFa.12.6	62,0
		TFa.11.2.7	140,4	TFa.12.7	4,5
		TFa.11.2.8	1,6	TFa.12.8	4,7
				TFa.12.9	5,3

Mit der Auftrennung von TFa.12 (280 mg) mittels offener SC über Kieselgel 60 mit einem *n*-Hexan/Ethylacetat-Gradienten (95:5; 90:10; 85:15; 82,5:17,5; 80:20; 77,5:22,5; 70:30) konnte das Gemisch der Verbindungen **9a+b** (TFa.12.8, 4,69 mg) isoliert werden.

Nach analytischer DC-Untersuchung auf Triterpentriolester unter Verwendung von FM 1 und Anisaldehyd/Schwefelsäure zur Detektion wurden die Fraktionen II.11.5; I.13.I.3; I.13.II.3; I.13.III.2 und TFa.15 zu der Fraktion TFb (340 mg) vereinigt. Die Trennung von TFb erfolgte mittels offener SC (38 x 1,5 cm) über Kieselgel 60 mit einem *n*-Hexan/Ethylacetat-Gradienten (80:20; 77,5:22,5; 75:25; 72,5:27,5; 70:30; 65:35; 60:40; 50:50; 20:80).

Mit der Trennung der Fraktion TFb.10 mittels offener SC (30 x 1cm) über Kieselgel 60 mit einem Dichlormethan/Ethylacetat-Gradienten (100:0; 95:5; 92,5:7,5; 90:10; 87,5:12,5; 85:15; 80:20, 70:30) wurde das Gemisch der Verbindungen **6a+b** (TFb.10.5, 10,7 mg) sowie Verbindung **10** (TFb.10.2, 3,8 mg) isoliert. Die Trennung der Fraktion TFb.11 mittels offener SC (18 x 1 cm) über Kieselgel 60 mit einem Dichlormethan/Ethylacetat-Gradienten (95:5; 90:10; 87,5:12,5; 85:15; 82,5:17,5; 80:20; 0:100) ergab die Isolierung des Gemisches der Verbindungen **7a+b** (TFb.11.3) in einer Ausbeute von 3,7 mg.

Tab. 25: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen TFb, TFb.10 und TFb.11 über KG 60.

Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg	Fraktion	m in mg
TFb.1	6,0	TFb.10.1	3,6	TFb.11.1	2,3
TFb.2	3,2	TFb.10.2	3,8	TFb.11.2	2,8
TFb.3	7,6	TFb.10.3	3,9	TFb.11.3	3,7
TFb.4	9,6	TFb.10.4	19,9	TFb.11.4	1,6
TFb.5	10,9	TFb.10.5	10,7	TFb.11.5	8,3
TFb.6	11,3	TFb.10.6	4,33		
TFb.7	10,4	TFb.10.7	2,0		
TFb.8	7,2	TFb.10.8	2,0		
TFb.9	5,7	TFb.10.9	3,9		
TFb.10	38,8				
TFb.11	18,5				
TFb.12	77,9				

### 5.3.4 Fraktionierung des Ethanol-Extrakts

4,25 g des Ethanol-Extrakts wurden mittels offener SC (59 x 3 cm) über Sephadex LH-20 mit isokratischer Elution mit Methanol fraktioniert. Der Ethanol-Extrakt löste sich nicht vollständig in Methanol, sodass nur der gelöste Anteil nach dem Zentrifugieren (Rückstand: 560 mg) auf die Säule aufgetragen wurde. Nach Untersuchung der erhaltenen Eluate auf Triterpensaponine und Flavonoide/Kaffeensäure-Derivate mittels analytischer DC mit FM 3 und FM 4 wurden die Eluate zu 9 Fraktionen zusammengefasst.

Tab. 26: Ergebnis der SC-Trennung des Ethanol-Extrakts (EE) von *Calendula*-Blüten über Sephadex LH-20.

Fraktion	m in mg
E.1	97,2
E.2	1164,1
E.3	409,6
E.4	866,4
E.5	925,4
E.6	93,5
E.7	63,0
E.8	64,4
E.9	24,4

## 5.4 Biologische Untersuchungsmethoden

### 5.4.1 Zellkultur

Alle für die Zellkultur notwendigen Schritte wurden unter einer Laminar-Air-Flow Sterilbank mit sterilen Medien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen wurde in Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95 % vorgenommen.

#### 5.4.1.1 Verwendete Zelltypen und Zelllinien

Für die Untersuchung der wundheilungsfördernden Wirkung von Extrakten und Fraktionen aus *C. officinalis*-Blüten wurden primäre humane Fibroblasten (HDF) und humane immortalisierte Keratinocyten (NIK) verwendet (siehe Tab. 27), da diese Zelltypen hauptsächlich an dem Wundheilungsprozess beteiligt sind. Die Isolierung primären humanen Fibroblasten erfolgte, wie im Kapitel 5.4.1.2 beschrieben, aus juvenilen Vorhäuten in unserem Labor. Die Nutzung der Primärzellen wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Freiburg (Genehmigungsnummer Freiburg, 21.02.2013: 45/03) genehmigt. Die humanen immortalisierten Keratinocyten wurden im Labor von Prof. Dr. L. Bruckner-Tuderman (Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Freiburg) isoliert und uns ab Passage 9 freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Es wurden die primären humanen Fibroblasten bis Passage 7 und die humanen immortalisierten Keratinocyten bis Passage 16 verwendet.

**Tab. 27: Verwendete primäre Zellen.**

Zellart	Interner Name	Alter	Geschlecht	Entnahmestelle
Fibroblasten	F130220	<15 J.	männlich	Vorhaut
Keratinocyten	NHK300910 (NIK)	n.b.	männlich/immortalisiert	Vorhaut/Hautklinik

#### 5.4.1.2 Isolierung der Zellen

Für die Isolierung der Fibroblasten wurden die Vorhautstücke zweimal mit PBS (1x) (Phosphate Buffered Saline, Zusammensetzung siehe Tab. 28) gewaschen und zusammen mit 8 % Antibiotic-Antimycotic Mix sowie 2 mg/ml, Ciprobay® 400 in eine Petrischale gegeben, wo überschüssiges Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt wurde. Nach einem weiteren Waschschrift konnte die Haut für maximal 3 Tage in einem Tube mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GlutaMax (high Glucose 4,5 g/l) Medium + 20 mM HEPES inklusive 1 % Antibiotic-Antimycotic Mix + 2 mg/ml Ciprobay 400 bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden. Vor der

Isolierung wurden die Hautstücke viermal mit PBS (1x) inklusive 8 % Antibiotic-Antimycotic Mix + 2 mg/ml Ciprofloxacin gewaschen und danach in ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und erneut von überschüssigem Fettgewebe befreit. Die Hautstücke wurden mit der Dermis nach unten gerichtet in eine T75-Kulturflasche gegeben und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis die Zellen angetrocknet waren. Anschließend wurde DMEM GlutaMax (high Glucose 4,5 g/l) Medium + 20 % FCS und 1% Penicillin / Streptomycin hinzugefügt und für 4 Wochen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumswechsel vorgenommen. Durch Zugabe von 3 ml einer mit PBS 1x 1:10 verdünnten 2,5 %-igen Trypsin-Lösung (ohne EDTA) wurden die Zellen abgelöst. Die Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 12 ml DMEM mit 10 % FCS + 1% Penicillin / Streptomycin abgestoppt. Diese Suspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min abzentrifugiert, die überstehende Lösung abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert und in einer neuen T175-Kulturflasche bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert.

#### 5.4.1.3 Kultivierung der verwendeten Zellen

Die Keratinocyten wurden im Keratinocyte SFM (1x) + L-Glutamin Medium, welches 1% Penicillin / Streptomycin sowie ein vom Hersteller mitgeliefertes Supplement, bestehend aus 2,5 µg rekombinant EGF und 25 mg bovine pituitary extract (BPE) enthielt, kultiviert. Um bei den meisten zellbiologischen Versuchen eine Basisstimulation zu senken, wurden die Keratinocyten in Hungermedium, welches nur aus Keratinocyte SFM (1x) + L-Glutamin Medium mit 1% Penicillin / Streptomycin ohne Supplement bestand, kultiviert. Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte im DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GlutaMax (high Glucose 4,5 g/l) Medium, dem 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin / Streptomycin zugesetzt wurden. Als Hungermedium für die Fibroblasten diente das DMEM GlutaMax (high Glucose 4,5 g/l) Medium, das nur mit 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt war.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in T175-Zellkulturflaschen kultiviert, bis sie eine Konfluenz von etwa 80 % erreichten. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS (1x) gewaschen. Danach wurden 3 ml Trypsin-EDTA 0,05 % / 0,02 % in die Kulturflaschen gegeben und 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um die Zellen von der Oberfläche abzulösen. Durch die Zugabe eines Überschusses von frischem Medium wurde diese Reaktion abgestoppt. Nach dem Zentrifugieren dieser Suspension bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die entsprechende Menge an Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

**Tab. 28: Zusammensetzung von PBS.**

PBS (10x)	PBS (1x)
80 g NaCl	100 ml PBS (10x)
2 g KCl	Aqua pur. ad 1000 ml
7,65 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
Aqua pur. ad 1000 ml	
pH 7.4 (eingestellt)	

#### 5.4.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Vor dem Einfrieren, Subkultivieren und Ausplattieren der Zellen musste deren Anzahl in der Zellsuspension bestimmt werden. Dazu wurden 10 µl einer 1:10 Verdünnung der Zellsuspension nach dem Resuspendieren der Zellen in frischem Medium mit einer Trypanblau-Lösung auf eine Neubauer-Zählkammer mit Deckglas aufgebracht und die Zellen in den 4 großen Quadraten unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt. Da Trypanblau sich nur in toten Zellen einlagert, können tote Zellen beim Zählen ausgeschlossen werden. Mit der folgenden Formel konnte dann unter Einbeziehung des Mittelwerts der Zellzahlen aus den 4 Zählquadraten, des spezifischen Kammerfaktors (10000) und des

Verdünnungsfaktors (10) die Konzentration der Zellsuspension (c) in Anzahl der Zellen pro ml berechnet werden. Mit dieser Konzentration konnte die Verdünnung der Zellsuspension für die jeweilige erforderliche Zellzahl berechnet werden.

$$c \left( \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Zellzahl gesamt gezählt}}{4} * 10000 * 10$$

#### 5.4.1.5 Ausplattieren und Stimulation der Zellen

Die zellbiologischen Untersuchungen wurden in Zellkulturplatten (6-, 12- oder 24-Well-Platten) bzw. Petrischalen (d = 10 cm) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen, wie in Kapitel 5.4.1.3 beschrieben, behandelt und die vom jeweiligen Versuch abhängige Zellzahl ausplattiert und im Vollmedium für 12 bis 24 h kultiviert, sodass die Zellen adhären konnten. Für die meisten Untersuchungen wurden die Zellen im jeweiligen Hungermedium für mindestens 24 h inkubiert, um eine Grundstimulation der Zellen zu reduzieren. Für die Stimulation der Zellen wurden Stammlösungen der *Calendula*-Extrakte, isolierte Fraktionen aus den Extrakten oder Einzelsubstanzen, die in DMSO, THF/Cremophor-EtOH 3:1 oder THF gelöst waren, in der Regel in einer 1:1000 oder 1:250 Verdünnung in das Medium gegeben und die Zellen inkubiert. Dabei durfte für DMSO eine Endkonzentration von 0,4 % v/v sowie für THF/Cremophor-EtOH 3:1 und THF von 0,1 % v/v aufgrund von zytotoxischen Wirkungen der Lösungsmittel auf die Zellen nicht überschritten werden.

#### 5.4.1.6 Kryokonservierung der Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in Kryovials in einen flüssigen Stickstofftank bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  gebracht. Nachdem die Zellen in einer T175-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert wurden, wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen nach Waschen mit 7 ml PBS (1x) mit Trypsin-EDTA 0,05 % / 0,02 % für 5 min abgelöst. Durch Zugabe eines Überschusses an Medium wurde die Reaktion abgestoppt. Vor der Zentrifugation bei 1200 U/min und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde das überstehende Medium abgesaugt und das Pellet in einer entsprechenden Menge auf  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlten Mediums resuspendiert, sodass eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml erreicht wurde. Das gleiche Volumen wurde einer auf  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlten Lösung aus 80 % Medium und 20 % DMSO tropfenweise und unter ständigem Schütteln zugesetzt. Die so erhaltene Zellsuspension hatte eine Konzentration von 500000 Zellen pro ml. 1,0 ml dieser Lösung wurde schnellstmöglich in ein Kryovial überführt und in einer Styroporbox für einen Tag auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt, bevor sie in den Stickstofftank bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  verbracht wurden.

#### 5.4.1.7 Auftauen der Zellen

Die Kryovials mit 1 ml der Zellsuspension und einem DMSO-Gehalt von 10 % wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und aufgetaut und unmittelbar in 9 ml frisches Medium überführt, um zytotoxische Wirkungen des DMSOs zu verhindern. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 U/min und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min zentrifugiert und das überstehende Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und einer T175-Kulturflasche bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Inkubator kultiviert.

#### 5.4.1.8 Gewinnung der Gesamtextrakte

Für die Gewährleistung der Proteinstabilität wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Das überstehende Medium wurde entfernt und jede Petrischale mit 5 ml eiskaltem PBS (1x) gewaschen. Danach wurden 1,0 ml eiskaltes PBS (1x) in jede Petrischale gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und die Suspension in ein Eppendorftube überführt und für 5 min bei 1600 U/min und 4°C zentrifugiert. Nachdem die überstehende Flüssigkeit entfernt wurde, wurden 50 µl Totex-Lysepuffer, dem kurz vor der Verwendung die entsprechenden Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden (Zusammensetzung siehe Tab. 29), zugegeben und das Pellet mehrere Male resuspendiert. Die Eppendorftubes wurden in einem Eppendorftubeschüttler bei 4 °C und 550 U/min für 30 min im Kühlschrank gestellt und anschließend bei 14000 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ in ein zweites, vorher gekühltes Eppendorftube überführt und bei -20 °C bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay und dem EMSA aufbewahrt.

**Tab. 29: Zusammensetzung des Totex-Lysepuffers.**

Zusammensetzung	zugegebene Proteaseinhibitoren
20 mM HEPES pH 7,9	17 µg/ml Aprotinin
350 mM NaCl	10 µg/ml Leupeptin
20 % Glycerol	10 µg/ml Pepstatin
1 % Nonidet P-40	1 mM PMSF
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM DTT
0,5 mM EDTA	
0,1 mM EGTA	

## 5.4.1.9 Gewinnung der Kernextrakte

Die Gewinnung der Kernextrakte erfolgte nach der Methode von Schreiber, wobei die ersten Schritte bis zur Zugabe des Puffers denen der Gewinnung der Gesamtextrakte gleich sind. Anstelle des Totex-Lysepuffers wurden den Proben 400 µl des Puffers A (siehe Tab. 30), der die entsprechenden Proteaseinhibitoren enthielt, zugegeben. Nach Resuspendieren wurden die Eppendorftubes für 15 min auf Eis verbracht und anschließend 25 µl einer 10 %-igen NP-40-Lösung zugesetzt und gemischt. Nach dem Zentrifugieren bei 4 °C und 10000 U/min für 5 min wurde der komplette Überstand entfernt und 100 µl des Puffers C (siehe Tab. 30) mit den Proteaseinhibitoren zugesetzt und auf einem Eppendorfschüttler für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Danach wurde bei 4 °C und 10000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorftube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 30: Zusammensetzung der Puffer A und C.

Puffer A	Puffer C	zugegebene Proteaseinhibitoren
10 mM HEPES pH 7,9	20 mM HEPES pH 7,9	17 µg/ml Aprotinin
10 mM KCl	400 mM NaCl	10 µg/ml Leupeptin
0,1 mM EDTA	1 mM EDTA	10 µg/ml Pepstatin
0,1 mM EGTA	1 mM EGTA	1 mM PMSF
		1 mM DTT

#### 5.4.1.10 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Unmittelbar vor der Durchführung des EMSA wurde die Proteinkonzentration in den Gesamtextrakten mittels des Bradford-Assay bestimmt. Dieser Assay beruht auf einer Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit Seitenketten von Proteinen. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden, die über eine BSA-Standardreihe von 0 bis 1 mg/ml ermittelt wurde, wird die Konzentration an Protein in der Probe ermittelt. Von den Standard-Lösungen und Proben wurden dreimal jeweils 1 µl mit 250 µl Bradford-Reagenz in eine 96-Well-Platte gegeben, geschüttelt und anschließend nach einer Wartezeit von 10 min mit dem BioRad-Microplate-Reader photometrisch bei 595 nm gemessen.

#### 5.4.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um den Einfluss der *Calendula*-Extrakte und von Matricin auf die NF-κB-DNA-Bindungsaktivität zu untersuchen, wurden die gewonnenen Proteingesamt- bzw. Kernextrakte im EMSA durchgeführt, bei dem NF-κB mit radioaktiv-markierten, doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden einen Komplex bildet, der dann nach elektrophoretischer Trennung in einem Polyacrylamidgel mittels Autoradiographie detektiert werden kann.

600000 NIK bzw. 500000 HDF wurden in 10 ml des jeweiligen Vollmediums pro Petrischale (d = 10 cm) ausplattiert, für 48 h inkubiert und danach auf 10 ml des jeweiligen Hungermediums gewechselt. Nach einer Inkubation für weitere 24 h wurden entweder die Stammlösungen der *Calendula*-Extrakte in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben und für insgesamt 7 h inkubiert oder für 6 h vorinkubiert und 1 h mit TNF-α 4 ng/ml nachstimuliert. Die alleinige Stimulation mit TNF-α 4 ng/ml für 1 h galt dabei als Positivkontrolle. Anschließend wurden, wie in den Kapiteln 5.4.1.8 und 5.4.1.9 beschrieben, die Proteingesamt- oder Kernextrakte gewonnen.

#### 5.4.2.1 Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK), die den Transfer der terminalen, radioaktiven Phosphatgruppen von  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  auf 5'-OH-Gruppen der doppelsträngigen DNA katalysiert und außerdem 5'-terminal stehende, nicht radioaktive Phosphatgruppen gegen den radioaktiven Phosphatrest aus  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  austauscht. Für die Entfernung von nicht gebundenem  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  wurde der Ansatz über eine MicroSpin G25-Säule chromatographiert. Der Reaktionsansatz, bestehend aus 1  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid (25 ng/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$   $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ , 5  $\mu\text{l}$  Kinasepuffer 10x, 2  $\mu\text{l}$  T4-PNK (10 U/ $\mu\text{l}$ ) und 37  $\mu\text{l}$  sterilem dd  $\text{H}_2\text{O}$ , wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend über die MicroSpin Säule getrennt. Die auf diese Weise gewonnene ca. 50  $\mu\text{l}$  gereinigte DNA-Sonde (0,035 pmol/ $\mu\text{l}$ ) wurde bei -20 °C gelagert.

#### 5.4.2.2 Bindungsreaktion und Gelelektrophorese

Der gewonnene Gesamt- bzw. Kernextrakt wurde mit einem Reaktionsmix, der aus dem radioaktiv markierten DNA-Strang, Poly(dIdC) (synthetischer repetitiver DNA-Strang und BSA bestand, inkubiert. 10 bis 25  $\mu\text{g}$  des Gesamt- oder Kernextrakts wurden mit 14  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmixes versetzt und nach kurzem Zentrifugieren für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das native, nicht denaturierte Polyacrylamidgel wurde in einer vertikalen mit Elektrodenpuffer 0,5 % befüllten Elektrophoreseapparatur eingebracht. Nach der Beladung des Gels mit den Proben wurde die Elektrophorese bei  $U = 200 \text{ V}$  und  $I = 20 - 22 \text{ mA}$  für 14 min, danach 14 mA für 120 min durchgeführt. 2  $\mu\text{l}$  eines Farbstoffgemisches aus Bromphenolblau und Xylencyanol wurden zur optischen Kontrolle der Gelelektrophorese in eine Tasche pipettiert. Anschließend wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt und die Oberseite mit Klarsichtfolie abgedeckt. Das Gel wurde dann im Vakuumtrockner bei 80 °C für 1h getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einen Phosphoimager BAS-

Film gelegt und zwischen 16 und 24 h auf dem Film belassen und danach mittels des Phosphoimagers (Fuji) und dem Software-Paket Basread und Aida vermessen.

**Tab. 31: Zusammensetzung des EMSA-Reaktionsmixes und der Puffer.**

Reaktionsmix	Puffer D+	Puffer F
2 µl BSA (10 µg/ml)	20 mM HEPES pH 7,9	20 % Ficoll 400
2 µl Poly(dIdC) (1 µg/ml)	20 % Glycerol	100 mM HEPES pH 7,9
2 µl Puffer D+	100 mM KCl	300 mM KCl
4 µl Puffer F	0,5 mM EDTA	10 mM DTT
4 µl dd H <sub>2</sub> O	0,25 NP-40	0,1 % PMSF
1 µl <sup>33</sup> P-gelabeltes Oligonukleotid (0,035 pmol/µl)	2 mM DTT	
	0,1 % PMSF	

**Tab. 32: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.**

Polyacrylamidgel 6 %	TBE-Puffer 5x
51,5 ml dd H <sub>2</sub> O	445 mM Tris
7 ml TBE-Puffer 5x	445 mM Borsäure
15 ml Acrylamidlösung (30 %)	10 mM EDTA pH 8
400 µl APS 10 %	
40 µl TEMED	

#### 5.4.2.3 Competition-Assay

Als Beleg, dass eine Interaktion von NFκB mit der korrespondierenden DNA-Sequenz vorliegt, wurde ein 100-facher Überschuss an ungelabeltem Oligonukleotid (1 µl) zum Reaktionsmix hinzugefügt. Dieses ungelabelte Oligonukleotid bindet an Stelle des gelabelten Oligonukleotids mit NFκB, weshalb die ursprüngliche Bande in der Autoradiografie nicht mehr nachweisbar ist.

### 5.4.3 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels quantitativer Real Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) unter Benutzung des LightCycler 480 von Roche durchgeführt. Dieses System basiert auf der Transkription der isolierten mRNA in cDNA und der Verwendung von TaqMan-Sonden bei der qRT-PCR.

#### 5.4.3.1 Vorbereitung der Zellen und mRNA-Isolation

Zur Gewinnung der mRNA wurden 200000 NIK pro 6-Well in 4 ml Keratinocyte SFM-Vollmedium ausplattiert, für 36 h inkubiert und für weitere 24 h im Hungermedium inkubiert, bevor die Zellen mit den *Calendula*-Extrakten in den entsprechenden Testkonzentrationen für 7 h stimuliert wurden. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  4 ng/ml für 1 h inkubiert. Für die Gewinnung ausreichender Mengen an mRNA wurden 2 Wells pro Probe bei der Isolierung vereinigt. Die mRNA wurde mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Für die Isolierung war die Verwendung von RNase-freien Materialien, wie Eppendorfpipetten-Spitzen, Eppendorf-Gefäßen und Pipetten und Chemikalien, wie RNase-freiem Wasser und Ethanol sowie eine gründliche Desinfizierung des Arbeitsplatzes mit Ethanol 70 % unerlässlich, da die hitzestabile und ubiquitär vorkommende RNase zu einer schnellen Degradierung der mRNA führt. Nach dem Absaugen des überstehenden Mediums und dem Waschen mit 1 ml PBS (1x) wurden 175  $\mu$ l RLT-Plus Puffer, der 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, zugesetzt, die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und die jeweils gleichen Proben in einem Eppendorftube vereinigt. Durch das im Puffer enthaltene Guanidinisothiocyanat und mehrmaliges Homogenisieren der Zellen mit einer 1 ml Spritze mit einer 20G-Kanüle wurden die Zellen denaturiert. Anschließend wurde das Lysat auf die Eliminatorsäule gegeben und bei 11000 rpm, 25 °C für 30 s zentrifugiert, um enthaltene genomische DNA (gDNA) zu entfernen. Dem Filtrat wurden 350  $\mu$ l 70 %-iger Ethanol zugesetzt, wodurch nach gutem Mischen die RNA gefällt wurde. Das Gemisch wurde auf die RNease-Säule gegeben

und bei 11000 rpm, 25 °C für 30 s zentrifugiert und das Filtrat dabei verworfen. Die an das Säulenmaterial gebundene RNA wurde im Folgenden mit 700 µl RW1-Puffer und 2-mal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen, wobei im ersten und zweiten Waschschrift, wie oben beschrieben, und im letzten Waschschrift insgesamt 2 min zentrifugiert wurde. Danach wurde die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und erneut bei 14000 rpm, 25 °C für 1 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein neues RNase-freies, bei -20 °C vorgekühltes Eppendorftube gesetzt und mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei 11000 rpm, 4 °C für 1 min zentrifugiert. Von dem Eluat wurden 4 µl in ein weiteres Eppendorf-Gefäß für die RNA-Gehaltsbestimmung überführt. Die gewonnen RNA-Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt.

#### 5.4.3.2 RNA-Gehaltsbestimmung

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl der Probe bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrop 2000 vermessen. Die RNA-Konzentration (in ng/µl) wurde anschließend über Multiplikation der gemessenen Absorption mit einem Faktor von 40 ng/µl errechnet. Das Verhältnis der gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm, das optimal zwischen 1,8 und 2,2 liegt, war dabei ein Maß für die Reinheit der Proben.

#### 5.4.3.3 Transkription der mRNA in cDNA

Ausgehend von der ermittelten RNA-Konzentration wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser in einem PCR-Tube verdünnt, in dem 1000 ng mRNA mit RNase freiem Wasser auf 12 µl verdünnt wurden. Nach Zugabe von 2 µl gDNA wipeout-Puffer wurden die Proben im Eppendorf PCR-Cycler inkubiert (I.: 42 °C, 2 min; II.: 95 °C, 3 min, III.: Abkühlen bei 4 °C). In diesem Schritt wurde restliche gDNA zerstört. Danach wurden den Proben eine Mischung aus 5 µl RT-Mastermix (4µl Quantiscript RT Puffer (5x) + 1 µl RT Primer Mix) und 1 µl Quantiscript Reverse-Transkriptase zugesetzt und die Proben im Eppendorf PCR-Cycler inkubiert (I.: 42

°C, 15 min; II.: 95 °C, 3 min, III.: Abkühlen bei 4 °C). Dabei waren die Reverse Transkriptase für die Synthese des homologen DNA-Strangs und die Exoribonuklease für den Abbau der RNA bei 42 °C verantwortlich. Bei 95 °C erfolgte die Inaktivierung beider Enzyme. Nach der Zugabe von 80 µl RNase-freiem Wasser wurden die Proben bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 5.4.3.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der qRT-PCR kann die Amplifizierung der cDNA in Echtzeit quantifiziert werden. Hierzu wurden den Proben neben einer temperaturempfindlichen DNA-Polymerase, sequenzspezifischen Primern und Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) sogenannte Hydrolysesonden (TaqMan-Sonden = Probes), die aus einer spezifischen, der zu amplifizierenden Sequenz komplementären Nukleotidteilsequenz sowie einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff, Hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) oder 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) am 5'-Ende, und einem Quencher, Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA), am 3'-Ende zugesetzt. Dabei entspricht die Wellenlänge des emittierten Lichts des Reporters genau der Anregungswellenlänge des Quenchers, wodurch es bei räumlicher Nähe zu einer Löschung kommt. Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer Spaltung der TaqMan-Sonde durch die 5'-3'-Exoribonukleaseaktivität der DNA-Polymerase während der Amplifizierung, wodurch die räumliche Nähe von Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und Quencher aufgehoben wird und das emittierende Fluoreszenzsignal nicht mehr gelöscht wird und somit vom LightCycler 480 detektiert werden kann. Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals erfolgt stets am Ende eines Elongationszyklus. Für die Normalisierung und als Amplifikationskontrolle wurden neben den Targetgenen, Referenzgene, die unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert werden, verwendet. Für die Untersuchungen der Genexpression mit humanen immortalisierten Keratinocyten wurde die Sequenz der 18s rRNA als Referenzgen verwendet. Für die entsprechenden Primer und Taqman-Sonden wurden die jeweiligen Gensequenzen

(siehe Tab. 33) in der Datenbank vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) gesucht und online mit dem OligoArchitect von Sigma Aldrich entworfen und anschließend synthetisiert. Dabei waren an dem 3`-Ende der Sonden der Quencher (TAMRA), am 5`-Ende der Sonde des Zielgens der Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM und am 5`-Ende der Sonde des Referenzgens HEX als Reporter gekoppelt.

**Tab. 33: Am LightCycler 480 untersuchte Gene und deren Sequenzen.**

Gen	Protein	Art	Nukleotidsequenz (5`-3`)
IL8	IL-8	Sense/Forward Primer	5`-CTCCATAAGGCACAAACT-3`
		Antisense/Reverse Primer	5`-AGTTCTTTAGCACTCCTT-3`
		Sonde	5`-TCAGAGACAGCAGAGCACAC-3`
RNA18S5	18S rRNA	Sense/Forward Primer	5`-CGGCTACCACATCCAAGG-3`
		Antisense/Reverse Primer	5`-CGGGTCGGGAGTGGGT-3`
		Sonde	5`-TTGCGCGCCTGCTGCCT-3`
CAM1	ICAM-1	Sense/Forward Primer	5`-GAGTGCCCAGGGAATATG-3`
		Antisense/Reverse Primer	5`-GAGGGAGTCCTCCAATAC-3`
		Sonde	5`-ATGCCTTGTCCTCTTGTCTGT-3`

#### 5.4.3.5 qRT-PCR mit dem LightCycler 480

Für die Durchführung der qRT-PCR mit dem LightCycler 480 wurden in eine speziellen 96-Well-Platte 19 µl eines Mastermixes, dessen Zusammensetzung in Tab. 34 zusammengestellt ist und 6 µl der cDNA-Probe pipettiert. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nachdem die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und bei 1200 rpm, 4 °C für 5 min zentrifugiert wurde, wurde die PCR im LightCycler 480 nach dem in Tab. 35 dargestellten Schema durchgeführt. Nach dem Ende eines Zyklus wurde die Fluoreszenz aufgezeichnet und gegen die Zykluszahl in einem Diagramm aufgetragen.

**Tab. 34: Zusammensetzung des Mastermixes für die qRT-PCR am LightCycler 480.**

Komponente	V pro Probe	cStammlösung
KAPA PROBE FAST Master Mix	12,5 µl	2x
RNase-freies Wasser	3,75 µl	
Sense/Forward Primer Referenzgen	0,125 µl	10 µM
Antisense/Reverse Primer Referenzgen	0,125 µl	10 µM
Sonde Referenzgen	0,5 µl	5 µM
Sense/Forward Primer Zielgen	0,75 µl	10 µM
Antisense/Reverse Primer	0,75 µl	10 µM
Sonde Zielgen	0,5 µl	5 µM

**Tab. 35: Schema für den Ablauf der qRT-PCR am LightCycler 480.**

Schritt (Wdhg.)	Temperatur	Dauer
Vorinkubation (1x)	95 °C	5 min
	95 °C	10 s
Amplifikation (65x)	60 °C	30 s
	72 °C	1 s
Kühlung (1x)	40 °C	10 s

#### 5.4.3.6 Quantifizierung

Um die Genexpression quantifizieren zu können, wurde von der zum LightCycler 480 gehörenden Software für jede Probe ein Ct-Wert (cycle threshold) ermittelt. Dieser Wert drückt aus, ab wann das gemessene Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert in Abhängigkeit von der cDNA-Menge in der Probe überschreitet. Dieser Ct-Wert wurde sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen bestimmt. Für die Normalisierung wurde anschließend der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert aus der Differenz des  $\text{Ct}_{\text{Zielgen}}$  und  $\text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$  ermittelt. Das Ergebnis wurde dann abschließend als x-fache Zunahme (fold change) der Probe in Bezug auf die Kontrolle als  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  berechnet, wobei sich  $\Delta\Delta\text{Ct}$  aus der Differenz des  $\Delta\text{Ct}$  der Probe und des  $\Delta\text{Ct}$  der Kontrolle ergibt.

#### 5.4.4 IL-8-ELISA

Für die quantitative Bestimmung des proinflammatorischen Chemokins IL-8 im Überstand einer Zellkultur von NIK wurde das Quantikine Human IL-8-ELISA-Kit, das auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip basiert, nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls verwendet. 200000 NIK wurden pro 6-Well in 4 ml Keratinocyten-Vollmedium ausplattiert, für 36 h inkubiert und für weitere 24 h im Hungermedium inkubiert, bevor mit den *Calendula*-Extrakten in den entsprechenden Testkonzentrationen oder 4 ng/ml TNF- $\alpha$  als Positivkontrolle für 24 h stimuliert wurde. Danach wurde je 1 ml des Zellüberstands in ein Eppendorfggefäß überführt und bei 10000 rpm, 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß pipettiert und die Proben auf Eis gestellt. In die entsprechenden Mikroplattenreihen wurden 100  $\mu$ l Assay Diluent RD1-85-Lösung vorgelegt und 50  $\mu$ l der IL-8-Standards verschiedener Konzentration (0 – 2000 pg/ml) sowie die Proben pipettiert. Dabei wurden die Zellüberstände abweichend vom Assayprotokoll ohne 1:100 Verdünnung verwendet. Die Mikroplatte wurde auf einem Eppendorf-Schüttler bei 300 rpm und RT für 2 h unter Lichtabschluss inkubiert. Nachdem die Wells insgesamt 4-mal mit je 300  $\mu$ l eines Waschpuffers gewaschen worden ist, wurden 100  $\mu$ l des IL-8-Konjugats zugegeben und für 1 h wie oben beschrieben inkubiert. Anschließend wurde ein zweiter Waschschrift, wie oben beschrieben, durchgeführt und je 200  $\mu$ l der Substratlösung, die ein frisch hergestelltes 1:1-Gemisch aus dem Farbreagenz A (Wasserstoffperoxid) und dem Farbreagenz B (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) war, zugesetzt und für ca. 15 min unter Lichtabschluss inkubiert, bis eine blau-grüne Färbung erkennbar war. Nach gleichzeitiger Zugabe von 50  $\mu$ l der Stopplösung (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mit einer Multipipette und Durchmischen wurde die Absorption der gelben Lösung bei 450 nm im Biorad Microplate Reader gemessen. Mit Hilfe von GraphPad Prism 5.0 wurde anhand der gemessenen IL-8-Standards über eine nichtlineare Regression nach dem 4-PL (four-parameter sigmoidal logistic model) Verfahren nach einem entsprechenden Protokoll (Miller, 2003) eine Standardkurve erstellt, über die die IL-8-Konzentrationen in pg/ml in den Proben berechnet werden konnten.

### 5.4.5 *in vitro* Kollagenbestimmung

In der Gewebeneubildungsphase der Wundheilung spielt bei der Neubildung der Extrazellulären Matrix (EZM) die Kollagenproduktion in den Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Eine quantitative *in vivo* sowie *in vitro* Bestimmung von Kollagen verschiedener Typen kann mit Hilfe des Sircol Collagen Assays durchgeführt werden. Dieser Assay wurde bereits mehrfach für Untersuchungen des Einflusses von verschiedenen Pflanzenextrakten auf die *in vitro* Kollagensynthese verwendet (Balekar et al., 2012; Chiang et al., 2013; Sudsai et al., 2013). Dabei wird das im Überstand einer Fibroblasten-Zellkultur das lösliche Kollagen im sauren pH an den Farbstoff Picro Sirius Red (siehe Abb. 130) gebunden und ausgefällt. Nach Lösen des Komplexes im basischen pH kann der Farbstoff photometrisch bei 540 nm gemessen und die Kollagen-Konzentration über eine erstellte Kalibriergerade ermittelt werden.

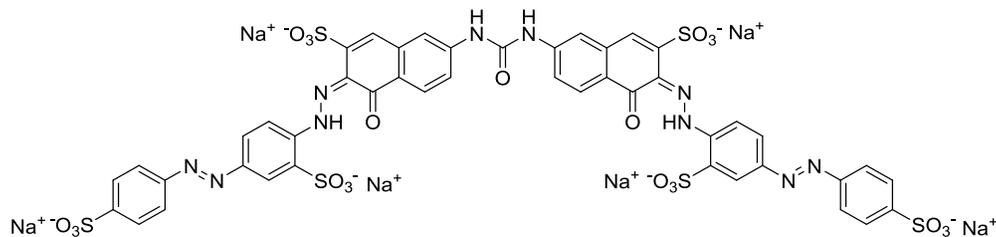


Abb. 130: Struktur des Farbstoffs Picro Sirius Red.

200000 HDF wurden in 2 ml DMEM-Vollmedium pro 6-Well ausplattiert und für 24 h inkubiert. Im ersten Versuchsaufbau wurden die Zellen für 48 h in 2 ml Hungermedium inkubiert und anschließend für weitere 72 h in 2 ml frischem Hungermedium, das die Extrakte, Fraktionen oder Einzelsubstanzen in den jeweiligen Testkonzentrationen enthielt, inkubiert. Als Positivkontrolle diente L-Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesium-Hydrat (APM), das in H<sub>2</sub>O gelöst war, in einer Testkonzentration von 100 µM. Im zweiten Versuchsaufbau wurden die Zellen ohne vorheriges Hungern in 2,0 ml DMEM-Medium, das 1 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt und dem die Testlösungen oder Positivkontrolle in den jeweiligen Testkonzentrationen zugesetzt waren, für 72 h inkubiert.

Die folgenden Arbeitsschritte waren für beide Versuchsansätze gleich. Das Assay-Protokoll vom Hersteller wurde modifiziert. Nach der Stimulationsdauer von 72 h wurde aus jedem Well 1,0 ml des überstehenden Mediums in ein Low-Bind-Eppendorftube überführt und 200 µl des auf Eis gekühlten Collagen Isolation & Concentration-Reagenz zugesetzt. Nach gutem Mischen auf dem Vortexer wurden die Eppendorftubes in einem Wasser-Eis-Gemisch im Kühlschrank bei 2 – 8 °C über Nacht gelagert. Anschließend wurden die Tubes bei 4 °C und 12000 U/min für 10 min zentrifugiert, wobei sich das konzentrierte Kollagen als unsichtbarer Film am Tubeboden absetzte. Gleichzeitig wurden für die Erstellung einer Regressionsgeraden aus dem Kollagen-Standard ( $c = 0,5$  mg/ml) 5 Kollagen-Standardlösungen zu je 100 µl ( $c = 0; 12,5; 25; 37,5$  und  $50$  µg/ml) in DMEM-Hungermedium, bzw. in DMEM mit 1 % FCS hergestellt. Nachdem 1,0 ml des Überstands aus jedem Tube mit einer Eppendorfpipette abgenommen worden war, wurden jeweils 1,0 ml Dye Reagent (Picro Sirius Red) zugegeben und die Tubes gut geschüttelt und für 30 min auf einen Eppendorftubeschüttler bei Raumtemperatur und 550 U/min gestellt. In dieser Zeit bildete der Farbstoff mit dem löslichen Kollagen einen im sauren pH unlöslichen Komplex, der dann bei 12000 U/min und 20 °C für 10 min abzentrifugiert wurde. Danach wurde die überstehende Farblösung in zwei Schritten mit einer Eppendorfpipette und kurzem Zwischenzentrifugationsschritt bei 14000 U/min und 20°C für 1 min vollständig und ohne Verlust des Farbstoff-Kollagen-Pellets entfernt. Danach wurden 750 µl einer eiskalten Acid-Wash-Solution zugegeben, um Reste des ungebundenen Farbstoffs zu entfernen und für 10 min bei 14000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Die überstehende Waschlösung wurde auf gleiche Weise wie die Farbstofflösung in 2 Schritten entfernt, wobei die Zwischenzentrifugation bei 4 °C erfolgte. Das gewaschene Farbstoff-Kollagen-Pellet wurde in 150 µl Release Reagent (0,1 M NaOH) gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden in eine 96-Wellplatte überführt. Die Absorption wurde gegen Milliporewasser als Kontrolle bei 540 nm im Spektrofluorometer gemessen. Die Konzentration des Kollagens in den Testlösungen wurde mittels der erstellten Regressionsgerade berechnet.

#### 5.4.6 *in vitro* Kollagenase-Inhibitions-Assay

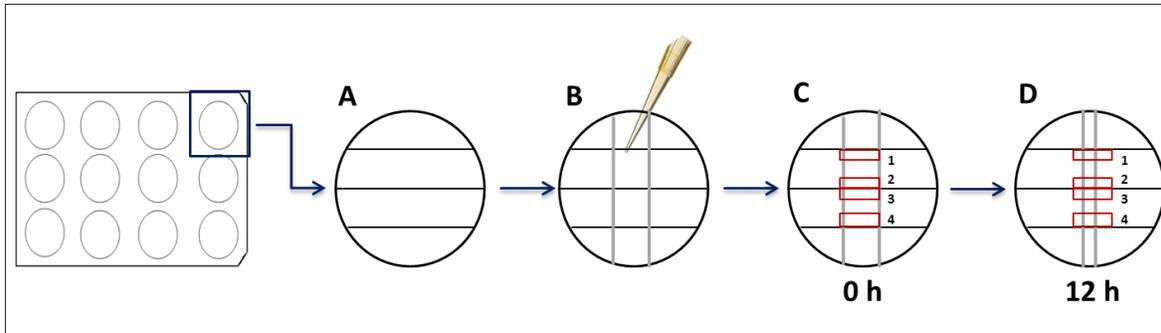
Der Kollagenase-Inhibitions-Assay beruht auf einer enzymatischen Spaltung eines Substrats, an welches ein fluorophorer Rest (7-Methoxycumarin-4-yl-acetat) gebunden ist, durch die aus *Clostridium histolyticum* isolierte Kollagenase des Typs V. Die während des Tests gemessene Emission durch die Spaltung des fluorophoren Rests ist dabei ein Maß für die Aktivität der Kollagenase. Dieser Assay wurde von Prof. Dr. M. Ganzera und A. Hartmann, Institut für Pharmazie und Pharmakognosie, Universität Innsbruck wie in (Hartmann et al., 2015) beschrieben im 96-Well-Format durchgeführt. Die Reaktion wurde im Infinite F 200 pro Microplate Reader mit einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 400 nm verfolgt. Der Reaktionsmix bestand aus 25 µl Substrat-Lösung, 25 µl Enzym-Lösung, 25 µl Puffer-Lösung und 25 µl Probenlösung. Das Enzym und Substrat wurden im Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl; pH 7.3) gelöst und zu 100 µg/ml (Enzym-Lösung) und 55.55 µg/ml (Substrat-Lösung) unmittelbar vor der Verwendung verdünnt. Die *Calendula-Extrakte* wurden in H<sub>2</sub>O/DMSO gelöst, wobei eine DMSO-Konzentration von 2.5 % pro Well nicht überschritten werden durfte. Als Positivkontrolle diente 12,5 µM Phosphoramidon. Nach dem Vorlegen der Puffer- und Probenlösungen wurde die Enzymlösung hinzugegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Substrat-Lösung hinzugefügt und die Emission nach 30 min gemessen. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte dann nach folgender Formel die Kollagenaseaktivität berechnet werden, wobei FU den gemessenen Fluoreszenzeinheiten entspricht.

$$\text{Kollagenaseaktivität (\%)} = \frac{FU \text{ Kontrolle} - FU \text{ Probe}}{FU \text{ Kontrolle}} * 100 \%$$

#### 5.4.7 Scratch Assay

Bei der Reepithelisierung in der zweiten Phase der Wundheilung spielen die Proliferation und Migration der Keratinocyten in den Wundspalt eine wichtige Rolle. Der Scratch Assay stellt eine artifizielle Wunde in einer konfluenten Zellschicht dar und ermöglicht eine *in vitro* Untersuchung des Einflusses von Extrakten und Fraktionen von *Calendula-Blüten* auf die Proliferation und Migration der oben genannten Zellen in die artifizielle Wundfläche. Der Scratch Assay wurde in Zusammenarbeit mit S. Junghanns im Rahmen ihrer, von mir betreuten Diplomarbeit nach dem Protokoll aus dem Labor von Prof. Dr. J. M. Brandner (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Zur Markierung für die Orientierung bei den mikroskopischen Aufnahmen wurde zu Beginn die 12-Wellplatte auf der Rückseite durch 3 waagerechte Linien unterteilt. 220000 NIKs wurden in 2 ml Keratinocyte SFM (1x) Vollmedium ausplattiert und für 24 h inkubiert. Unmittelbar nach der Erzeugung der artifiziellen Wunde mit einer 200 µl Eppendorfpipettenspitze wurde das alte Medium durch frisches Vollmedium, dem die *Calendula-Extrakte*, definierte Fraktionen, Einzelsubstanzen in den jeweiligen Testkonzentrationen oder HGF 5 ng/ml (Hepatocyte growth factor) als Positivkontrolle zugesetzt wurden. Für jedes Well wurden an den in Abb. 131 dargestellten 4 Fixpunkten jeweils mikroskopische Aufnahmen bei einer 10-fachen Objektivvergrößerung angefertigt (0 h–Aufnahme). Nach der Inkubation von 12 h wurden an gleichen Fixpunkten erneut jeweils 4 mikroskopische Aufnahmen angefertigt. (12 h–Aufnahme). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels TScratch–Software analysiert, wobei die offene Fläche der artifiziellen Wunde nach 0 h und 12 h ermittelt wurde. Über die folgende Formel konnte mit den beiden Werten der Wundschluss nach 12 h in % berechnet werden, d.h. wieviel % der ursprünglichen offenen, artifiziellen Wundfläche nach 12 h geschlossen sind.

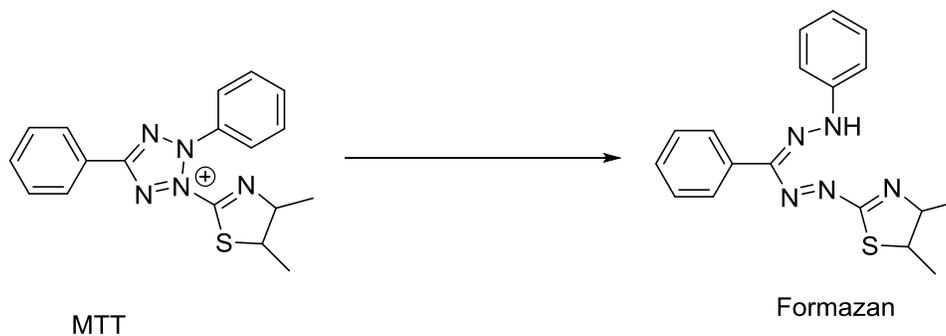
$$\text{Wundschluss (\%)} = 100 \% - \left[ \frac{\text{offene Wundfläche 12 h}}{\text{offene Wundfläche 0 h}} * 100 \% \right]$$



**Abb. 131: Schematische Darstellung des Ablaufes des Scratch Assays.** A) Zeichnen der 3 waagerechten Linien auf der Rückseite der 12-Well-Platte. B) Erzeugung des vertikalen Scratches in der konfluenten Zellschicht mittel 200 µl-Eppendorfpipettenspitze. C) und D) Fixpunkte für die mikroskopischen Aufnahmen nach 0 h und 12 h.

#### 5.4.8 MTT-Assay

Der MTT-Assay ermöglicht die Untersuchung des Einflusses von Extrakten und Fraktionen von *Calendula* sowie Einzelsubstanzen auf die Viabilität von Zellen. Dabei wird im Endoplasmatischen Retikulum der Mitochondrien von lebenden und stoffwechselaktiven Zellen durch die Succinat-abhängige Dehydrogenase sowie die Kofaktoren NADH und NADPH das lösliche, gelbe MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zum blauen Formazan reduziert (siehe Abb. 132), welches dann photometrisch nach Lösen in DMSO bei 595 nm vermessen werden kann (Mosmann, 1983). In Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle kann dann eine Aussage über den Einfluss auf die Zellviabilität getroffen werden, da eine Reduktion lebender Zellen zu einer verminderten Bildung des Formazans führt.



**Abb. 132: Reduktionsreaktion von MTT zum Formazan durch die mitochondriale, Succinat-abhängige Dehydrogenase.**

Für den MTT-Assay wurden 80000 HDF oder 100000 NIK in 2 ml des jeweiligen Vollmediums ausplattiert und für 24 h inkubiert. Das Hungern der Zellen und dessen Dauer richtete sich nach dem jeweiligen Versuch. Dem Medium wurden dann die Stammlösungen der *Calendula*-Extrakte in einer 1:1000 bzw. 1:250 Verdünnung zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde eine Triton X-100-Lösung in einer Endkonzentration von 0,1 % verwendet. Anschließend an die jeweilige Inkubationsdauer wurden 200 µl einer frisch hergestellten 5 mg/ml MTT-Lösung in PBS (1x) zu jedem Well gegeben und für weitere 3 h inkubiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und die gebildeten Formazankristalle in 500 µl DMSO gelöst. 3-mal je 75 µl dieser Lösung wurden mit 25 µl DMSO in einer 96-Wellplatte gemischt und die Absorption bei 595 nm im Biorad Microplate Reader gemessen. Die Zellviabilität konnte nach folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{\text{Absorption Probe}}{\text{Absorption unbehandelte Kontrolle}} * 100 \%$$

#### 5.4.9 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurden in dieser Arbeit Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism 5 verwendet. Dabei wurden die Mittelwerte + Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben. Anschließend wurde eine einfache Varianzanalyse (one way ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni Post hoc-Test durchgeführt und die p-Werte ermittelt. p-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen. Im Falle eines Vorliegens einer Signifikanz wurden p-Werte < 0,05 mit \*, p-Werte < 0,01 mit \*\* und p-Werte < 0,001 mit \*\*\* gekennzeichnet.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdelmalek, M., Spencer, J., 2006. Retinoids and wound healing. *Dermatologic Surg.* 32, 1219–1230.
- Ahmed, A.A., Jakupovic, J., Mabry, T.J., 1993. Sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* 56, 1821–1824.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T., 1996. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* 43, 1255–1260.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.B., (Herausgeber), K.S., 2009. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10th ed. Urban & Fischer Verlag - Lehrbücher.
- Ammon, H.P.T., Kaul, R., 1992. Kamille: Pharmakologie der Kamille und ihrer Inhaltsstoffe. *Dtsch. Apotheker Zeitung* 132, 3–26.
- Andersson, E., Vahlquist, A., Rosdahl, I., 2001.  $\beta$ -Carotene uptake and bioconversion to retinol differ between human melanocytes and keratinocytes. *Nutr. Cancer* 39, 300–306.
- Arana, L., Salado, C., Vega, S., Aizpurua-Olaizola, O., Arada, I. de la, Suarez, T., Usobiaga, A., Arrondo, J.L.R., Alonso, A., Goñi, F.M., Alkorta, I., 2015. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 135, 18–26.
- Aro, A.A., Perez, M.O., Vieira, C.P., Esquisatto, M.A.M., Rodrigues, R.A.F., Gomes, L., Pimentel, E.R., 2015. Effect of *Calendula Officinalis* cream on achilles tendon healing. *Anat. Rec.* 298, 428–435.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2005. GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Biomed. Chromatogr.* 19, 285–311.

- Bakó, E., Deli, J., Tóth, G., 2002. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J. Biochemical Biophys. Methods* 53, 241–250.
- Balekar, N., Katkam, N.G., Nakpheng, T., Jehtae, K., Srichana, T., 2012. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *J. Ethnopharmacol.* 141, 817–24.
- Basch, E., Bent, S., Foppa, I., Haskmi, S., Kroll, D., Mele, M., Szapary, P., Ulbricht, C., Vora, M., Yong, S., 2006. Marigold (*Calendula officinalis* L.): An evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *J. Herb. Pharmacother.* 6, 135–159.
- Bian, D., Zhang, J., Wu, X., Dou, Y., Yang, Y., Tan, Q., Xia, Y., Gong, Z., Dai, Y., 2013. Asiatic acid isolated from *Centella Asiatica* inhibits TGF- $\beta$ 1-induced collagen expression in human keloid fibroblasts via PPAR- $\gamma$  activation. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1032–1042.
- Bikádi, Z., Hazai, E., Zsila, F., Lockwood, S.F., 2006. Molecular modeling of non-covalent binding of homochiral (3S,3'S)-astaxanthin to matrix metalloproteinase-13 (MMP-13). *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5451–5458.
- Blakytyn, R., Jude, E., 2006. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet. Med.* 23, 594–608.
- Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J., Decker, E.A., 2010. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 515–32.
- Boutaghane, N., Voutquenne-Nazabadioko, L., Simon, A., Harakat, D., Benlabeled, K., Kabouche, Z., 2013. A new triterpenic diester from the aerial parts of *Chrysanthemum macrocarpum*. *Phytochem. Lett.* 6, 519–525.
- Braddock, M., Quinn, A., 2004. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 330–340.

- Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., Djerassi, C., 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3688–3699.
- Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C. (Eds.), 2010. *Rook's Textbook of Dermatology*, 8th ed. Wiley-Blackwell.
- Buzzi, M., de Freitas, F., Winter, M., 2016. A prospective, descriptive study to assess the clinical benefits of using *Calendula officinalis* hydroglycolic extract for the topical treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manag.* 62, 8–24.
- Chen, W.-P., Xiong, Y., Shi, Y.-X., Hu, P.-F., Bao, J.-P., Wu, L.-D., 2014. Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 19, 174–177.
- Chiang, H.-M., Chen, H.-C., Chiu, H.-H., Chen, C.-W., Wang, S.-M., Wen, K.-C., 2013. *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 1–9.
- Colombo, E., Sangiovanni, E., D'Ambrosio, M., Bosisio, E., Ciocarlan, A., Fumagalli, M., Guerriero, A., Harghel, P., Dell'Agli, M., 2015. A bio-guided fractionation to assess the inhibitory activity of *Calendula officinalis* L. on the NF- $\kappa$ B driven transcription in human gastric epithelial cells. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 1–8.
- D'Ambrosio, M., Ciocarlan, A., Colombo, E., Guerriero, A., Pizza, C., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M., 2015. Structure and cytotoxic activity of sesquiterpene glycoside esters from *Calendula officinalis* L.: Studies on the conformation of viridiflorol. *Phytochemistry* 117, 1–9.
- De Tommasi, N., Pizza, C., 1990. Structure and *in vitro* antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* 53, 830–835.

- dela Sena, C., Narayanasamy, S., Riedl, K.M., Curley, R.W., Schwartz, S.J., Harrison, E.H., 2013. Substrate specificity of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-oxygenase (BCO1). *J. Biol. Chem.* 288, 37094–37103.
- Della Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., Isaac, O., 1994. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60, 516–520.
- Dinda, M., Dasgupta, U., Singh, N., Bhattacharyya, D., Karmakar, P., 2015. PI3K-mediated proliferation of fibroblasts by *Calendula officinalis* tincture: Implication in wound healing. *Phyther. Res.* 29, 607–616.
- Dingermann, T., Hiller, K., Schneider, G., Zündorf, I., 2004. *Schneider - Arzneidrogen*, 5th ed. Elsevier GmbH, München.
- Dugo, P., Herrero, M., Giuffrida, D., Ragonese, C., Dugo, G., Mondello, L., 2008. Analysis of native carotenoid composition in orange juice using C 30 columns in tandem. *J. Sep. Sci.* 31, 2151–2160.
- Duran, V., Matic, M., Jovanović, M., Mimica, N., Gajinov, Z., Poljacki, M., Boza, P., 2005. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *Int. J. Tissue React.* 27, 101–106.
- Ebeling, S., Naumann, K., Pollok, S., Wardecki, T., Vidal-y-Sy, S., Nascimento, J.M., Boerries, M., Schmidt, G., Brandner, J.M., Merfort, I., 2014. From a traditional medicinal plant to a rational drug: Understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. *PLoS One* 9, e86147.
- Ende, C., Gebhardt, R., 2004. Inhibition of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med.* 70, 1006–1008.
- Flemming, M., Kraus, B., Rascle, A., Jürgenliemk, G., Fuchs, S., Fürst, R., Heilmann, J., 2015. Revisited anti-inflammatory activity of matricine *in vitro*: Comparison with chamazulene. *Fitoterapia* 106, 122–128.

- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., Merfort, I., 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 126, 463–467.
- Fuchino, H., Satoh, T., Tanaka, N., 1995. Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. I. Constituents of *Betula ermanii*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 43, 1937–1942.
- Gill, S., Parks, W., 2008. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1334–1347.
- Gillitzer, R., Goebeler, M., 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.* 69, 513–521.
- Goodwin, T., 1954. Studies in carotenogenesis. 13. The carotenoids of the flower petals of *Calendula officinalis*. *Biochem. J.* 58, 90–94.
- Gooyit, M., Peng, Z., Wolter, W.R., Pi, H., Ding, D., Heseck, D., Lee, M., Boggess, B., Champion, M.M., Suckow, M. a., Mobashery, S., Chang, M., 2014. A chemical biological strategy to facilitate diabetic wound healing. *ACS Chem. Biol.* 9, 105–110.
- Grabbe, C., Husnjak, K., Dikic, I., 2011. The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 295–307.
- Gracza, L., 1987. Oxygen-containing terpene derivatives from *Calendula officinalis*. *Planta Med.* 53, 227–227.
- Greaves, N.S., Ashcroft, K.J., Baguneid, M., Bayat, A., 2013. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 72, 206–217.
- Gröne, A., 2002. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 1–12.

- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.
- Hamburger, M., Adler, S., Baumann, D., Förg, A., Weinreich, B., 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* 74, 328–338.
- Hänsel, Rudolf, Sticher, O. (Hrsg.), 2010. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 9th ed. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Hartmann, A., Gostner, J., Fuchs, J., Chaita, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., Ganzera, M., 2015. Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Med.* 81, 813–820.
- Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, Graeve, L. (Hrsg.), 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9th ed, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- HMPC, 2011. European Union herbal monograph on *Matricaria recutita* L., flos.
- HMPC, 2008a. Community herbal monograph on *Calendula officinalis* L., flos..
- HMPC, 2008b. Assessment report for the development of community herbal monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof in the community list, *Calendula officinalis* L., flos.
- Hu, K., Lui, C., Ernst, H., Krinsky, N., Russell, R., Wang, X., 2006. The biochemical characterization of ferret carotene-9', 10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 281, 19327–19338.
- Huebner, W., Albath, W., 1939. Über die entzündungswidrige Wirkung des Rein-Azulens aus *Matricaria chamomilla* L. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 192, 383–388.
- Isaac, O., 1992. *Die Ringelblume: Botanik, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung*. WVG, Stuttgart.

- Jakovlev, V., Isaac, O., Flaskamp, E., 1983. Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. *Planta Med.* 49, 67–73.
- Jakupovic, J., Grenz, M., Bohlmann, F., Rustaiyan, A., Koussari, S., 1988. Sesquiterpene glycosides from *Calendula persica*. *Planta Med.* 54, 254–256.
- Ji, S., Wang, Q., Qiao, X., Guo, H., Yang, Y., Bo, T., Xiang, C., Guo, D., Ye, M., 2014. New triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis* and their rapid screening by LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 90, 15–26.
- Jiang, W., Sanders, A.J., Ruge, F., Harding, K.G., 2011. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- $\gamma$  and potential clinical implications. *Exp. Ther. Med.* 3, 231–236.
- Karliner, J., Djerassi, C., 1966. Terpenoids. LVII. Mass spectral and nuclear magnetic resonance studies of pentacyclic triterpene hydrocarbons. *J. Org. Chem.* 31, 1945–1956.
- Kasprzyk, Z., Pyrek, J., 1968. Triterpenic alcohols of *Calendula officinalis* L. flowers. *Phytochemistry* 7, 1631–1639.
- Khokha, R., Murthy, A., Weiss, A., 2013. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 649–65.
- Kim, H., Kim, B., Kim, H., Um, S., Lee, J., Ryoo, H., Jung, H., 2008. Synthesis and *in vitro* biological activity of retinyl retinoate, a novel hybrid retinoid derivative. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6387–6393.
- Kishimoto, S., Maoka, T., Sumitomo, K., Ohmiya, A., 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2122–2128.
- Kishimoto, S., Sumitomo, K., Yagi, M., Nakayama, M., Ohmiya, A., 2007. Three routes to orange petal color via carotenoid components in 9 Compositae species. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 76, 250–257.

- Kloucek-Popova, E., Popov, A., Pavlova, N., Krusteva, S., 1982. Influence of the physiological regeneration and epithelization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* 8, 63–67.
- Kondo, S., Kono, T., Sauder, D.N., McKenzie, R.C., 1993. IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J. Invest. Dermatol.* 101, 690–694.
- Kondo, T., Ishida, Y., 2010. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci. Int.* 203, 93–98.
- Kwok, H.-H., Yue, P.Y.-K., Mak, N.-K., Wong, R.N.-S., 2012. Ginsenoside Rb1 induces type I collagen expression through peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem. Pharmacol.* 84, 532–539.
- Lareu, R.R., Zeugolis, D.I., Abu-Rub, M., Pandit, A., Raghunath, M., 2010. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. *Acta Biomater.* 6, 3146–3151.
- Lateef, H., Stevens, M.J., Varani, J., 2004. All-*trans*-retinoic acid suppresses matrix metalloproteinase activity and increases collagen synthesis in diabetic human skin in organ culture. *Am. J. Pathol.* 165, 167–174.
- Leach, M.J., 2008. *Calendula officinalis* and wound healing: A systematic review. *Wounds* 20, 236–243.
- Leask, A., Abraham, D.J., 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18, 816–827.
- Lee, H.-P.D., Eichmeier, L.S., Piatak, D.M., 1985. Mass spectral study of ring E of taraxasterol and compounds with similar ring substitution. *Org. Mass Spectrom.* 20, 247–252.

- Lee, J., Jung, E., Kim, Y., Park, J., Park, J., Hong, S., Kim, J., Hyun, C., Kim, Y.S., Park, D., 2006. Asiaticoside induces human Collagen I synthesis through TGF $\beta$  receptor I kinase (T $\beta$ RI Kinase)-independent Smad signaling. *Planta Med.* 72, 324–328.
- Leung, K.H., 1999. Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 734–739.
- Li, X., Zhang, L., Yin, X., Gao, Z., Zhang, H., Liu, X., Pan, X., Li, N., Yu, Z., 2014. Retinoic acid remodels extracellular matrix (ECM) of cultured human fetal palate mesenchymal cells (hFPMCs) through down-regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *Toxicol. Lett.* 225, 208–215.
- Lichius, J.J., Willuhn, G., Loew, D., 2016. *Calendulae* flos, in: Wichtl, M. (Ed.), *Teedrogen Und Phytopharmaka*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, pp. 136–139.
- Lindqvist, A., 2005. Cell type-specific expression of beta-carotene 9',10'-monooxygenase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1403–1412.
- Lindqvist, A., Andersson, S., 2004. Cell type-specific expression of beta-carotene 15,15'-mono-oxygenase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 491–499.
- Lv, J.-J., Yu, S., Xin, Y., Cheng, R.-R., Zhu, H.-T., Wang, D., Yang, C.-R., Xu, M., Zhang, Y.-J., 2015. Anti-viral and cytotoxic norbisabolane sesquiterpenoid glycosides from *Phyllanthus emblica* and their absolute configurations. *Phytochemistry* 117, 123–134.
- Lyss, G., 2000. Untersuchungen zum molekularen, antiphlogistischen Wirkmechanismus von Sesquiterpenlactonen aus Arnikablüten mit den Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und NF-AT als Targets. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.

- Marukami, T., Kishi, A., Yoshikawa, M., 2001. Medicinal Flowers. IV. Marigold. (2): Structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 49, 974–978.
- Mein, J.R., Dolnikowski, G.G., Ernst, H., Russell, R.M., Wang, X., 2012. Enzymatic formation of apo-carotenoids from xanthophyll carotenoids lutein, zeaxanthin and beta-cryptoxanthin by ferret carotene-9',10'-monooxygenase. Arch. Biochem. Biophys. 506, 109–121.
- Merfort, I., Heilmann, J., Hagedorn-Leweke, U., Lippold, B.C., 1994. *In vivo* skin penetration studies of camomile flavones. Pharmazie 49, 509–511.
- Milborrow, B., Swift, I., Netting, A., 1980. The stereochemistry of hydroxylation of the carotenoid lutein in *Calendula officinalis*. Phytochemistry 21, 2853–2857.
- Miller, J.R., 2003. Nonlinear Standard Curves: RIA and ELISA.
- Moll, I., Jung, E.G., Augustin, M., Bahmer, F.A., Bahmer, J., Bayerl, C. (Eds.), 2010. 1.2 Mikroskopische Struktur und Differenzierung der Haut, in: Dermatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Moon, Y.-M., Park, I.-H., Cho, J.-S., Um, J.-Y., Kim, T.H., Lee, H.-M., 2013. Berberine inhibits myofibroblast differentiation in nasal polyp-derived fibroblasts via the p38 pathway. Phyther. Res. 27, 16–20.
- Mori, Y., Hatamochi, A., Takeda, K., Ueki, H., 1994. Effects of tretinoin tocoferil on gene expression of the extracellular matrix components in human dermal fibroblasts *in vitro*. J. Dermatol. Sci. 8, 233–238.
- Morikawa, T., Ninomiya, K., Takamori, Y., Nishida, E., Yasue, M., Hayakawa, T., Muraoka, O., Li, X., Nakamura, S., Yoshikawa, M., Matsuda, H., 2015. Oleanane-type triterpene saponins with collagen synthesis-promoting activity from the flowers of *Bellis perennis*. Phytochemistry 116, 203–212.

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Naeini, A.T., Miri, R., Shafiei, N., Tabandeh, M.R., Oryan, A., Nazifi, S., 2012. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comp. Clin. Path.* 21, 253–257.
- Nazaruk, J., Galicka, A., 2014. The influence of selected flavonoids from the leaves of *Cirsium palustre* (L.) Scop. on collagen expression in human skin fibroblasts. *Phyther. Res.* 28, 1399–1405.
- Neubeck, M., Stahl-Biskup, E., 2014. *Matricariae flos* - Arzneibuch-Kommentar.
- Neukirch, H., D'Ambrosio, M., Sosa, S., Altinier, G., Della Loggia, R., Guerriero, A., 2005. Improved anti-inflammatory activity of three new terpenoids derived, by systematic chemical modifications, from the abundant triterpenes of the flowery plant *Calendula officinalis*. *Chem. Biodivers.* 2, 657–671.
- Neukirch, H., D'Ambrosio, M., Via, J.D., Guerriero, A., 2004. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochem. Anal.* 15, 30–35.
- Nicolaus, C., Sievers-Engler, A., Murillo, R., D'Ambrosio, M., Lämmerhofer, M., Merfort, I., 2016. Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono- and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non-aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118, 195–205.
- Niżyński, B., Alsoufi, A.S.M., Pączkowski, C., Długosz, M., Szakiel, A., 2015. The content of free and esterified triterpenoids of the native marigold (*Calendula officinalis*) plant and its modifications in *in vitro* cultures. *Phytochem. Lett.* 11, 410–417.

- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708.
- Oettel, H., Wilhelm-Kollmannsperger, G., 1955. Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulen. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 226, 473–485.
- Okuma, C.H., Andrade, T.A.M., Caetano, G.F., Finci, L.I., Maciel, N.R., Topan, J.F., Cefali, L.C., Polizello, A.C.M., Carlo, T., Rogerio, A.P., Spadaro, A.C.C., Isaac, V.L.B., Frade, M.A.C., Rocha-Filho, P.A., 2015. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. *Eur. J. Pharm. Sci.* 71, 62–72.
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6853–6866.
- Parente, L.M.L., Lino Júnior, R.D.S., Tresvenzol, L.M.F., Vinaud, M.C., de Paula, J.R., Paulo, N.M., 2012. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2012, 1–7.
- Patrick, K., Kumar, S., Edwardson, P., Hutchinson, J., 1996. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. *Phytomedicine* 3, 11–18.
- Pintea, A., Bele, C., Andrei, S., Socaciu, C., 2003. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biol. Szeged.* 47, 37–40.
- Pizza, C., De Tommasi, N., 1988. Sesquiterpene glycosides based on the alloaromadendrane skeleton from *Calendula arvensis*. *Phytochemistry* 27, 2205–2208.
- Pizza, C., De Tommasi, N., 1987. Plants metabolites. A new sesquiterpene glycoside from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* 50, 784–789.

- Pommier, P., Gomez, F., Sunyach, M.P., D'Hombres, A., Carrie, C., Montbarbon, X., 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 1447–1453.
- Preethi, K.C., Kuttan, R., 2009. Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 20, 73–79.
- Pyrek, J.S., 1979. Terpenes of Compositae plants. Part XI. Structures of heliantriols B0, B1, B2 and A1, new pentacyclic triterpenes from *Helianthus annuus* L. and *Calendula officinalis* L. *Pol. J. Chem.* 53, 2465–2490.
- Pyrek, J.S., Baranowska, E., 1978. Terpenes of Compositae plants. XII. Mass spectral fragmentation of 16-substituted taraxanes, taraxenes and psi-taraxenes. *Pol. J. Chem.* 52, 97–106.
- Quetin-Leclercq, J., Elias, R., Balansard, G., 1992. Cytotoxic activity of some triterpenoid saponins. *Planta Med.* 58, 279–281.
- Ramadan, M., Goeters, S., Watzer, B., Krause, E., Lohmann, K., Bauer, R., Hempel, B., Imming, P., 2006. Chamazulene carboxylic acid and matricin: A natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. *J. Nat. Prod.* 69, 1041–1045.
- Rankin, A.C., Hendry, B.M., Corcoran, J.P., Xu, Q., 2013. An *in vitro* model for the pro-fibrotic effects of retinoids: mechanisms of action. *Br. J. Pharmacol.* 170, 1177–1189.
- Rao, S.G., Udupa, A.L., Udupa, S.L., Rao, P.G.M., Rao, G., Kulkarni, D.R., 1991. *Calendula* and *Hypericum*: Two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. *Fitoterapia* 62, 508–510.
- Reddy, K.K., Grossman, L., Rogers, G.S., 2013. Common complementary and alternative therapies with potential use in dermatologic surgery: Risks and benefits. *J. Am. Acad. Dermatol.* 68, e127–e135.

- Reinke, J.M., Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 49, 35–43.
- Rennekampff, H.-O., Hansbrough, J.F., Kiessig, V., Doré, C., Sticherling, M., Schröder, J.-M., 2000. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* 93, 41–54.
- Reuter, J., Merfort, I., Seelinger, G., Wölfle, U., Schempp, C.M., 2009. Botanicals in dermatology and skin health., in: Cooper, R., Kronenberg, F. (Eds.), *Botanical medicine. From bench to bedside.* Mary Ann Liebert Inc., New York, pp. 33–65.
- Rhourri-Frih, B., Chaimbault, P., Claude, B., Lamy, C., André, P., Lafosse, M., 2009. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *J. Mass Spectrom.* 44, 71–80.
- Roos, T.C., Jugert, F.K., Merk, H.F., Bickers, D.R., 1998. Retinoid metabolism in the skin. *Pharmacol. Rev.* 50, 315–333.
- Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, E.-R., Ammon, H., 1994. Chamazulene: An antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. *Planta Med.* 60, 410–413.
- Saini, P., Al-Shibani, N., Sun, J., Zhang, W., Song, F., Gregson, K.S., Windsor, L.J., 2012. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. *Homeopathy* 101, 92–98.
- Sayo, T., Sugiyama, Y., Inoue, S., 2013. Lutein, a nonprovitamin A, activates the retinoic acid receptor to induce HAS3-dependent hyaluronan synthesis in keratinocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1282–1286.
- Schiller, M., Javelaud, D., Mauviel, A., 2004. TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 35, 83–92.
- Schmidt, T.J., von Raison, J., Willuhn, G., 2004. New triterpene esters from flowerheads of *Arnica lonchophylla*. *Planta Med.* 70, 967–977.

- Schneider, E., 1993. Carotinoide aus *Calendula officinalis* L.: Beeinflussung verschiedener Fibroblastenfunktionen in Verbindung mit der Wundheilung, Selektion carotinoidreicher Pflanzen sowie Untersuchungen zu Stabilität und Analytik. Philipps-Universität Marburg/Lahn.
- Schneider, E., Hölzl, J., Eckes, B., Mauch, C., Schirren, C., 1991. Effects of carotenoids extracted from *Calendula officinalis* on proliferation and chemotaxis of human fibroblasts and on contraction of collagen lattices by fibroblasts. *Planta Med.* 57, A 60.
- Sharp, L., Finnilä, K., Johansson, H., Abrahamsson, M., Hatschek, T., Bergenmar, M., 2013. No differences between *Calendula* cream and aqueous cream in the prevention of acute radiation skin reactions – Results from a randomised blinded trial. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 17, 429–435.
- Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774.
- Siedle, B., García-Piñeres, A.J., Murillo, R., Schulte-Mönting, J., Castro, V., Rüngeler, P., Klaas, C.A., Da Costa, F.B., Kisiel, W., Merfort, I., 2004. Quantitative structure–activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Med. Chem.* 47, 6042–6054.
- Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., Nakpheng, T., Tewtrakul, S., 2013. Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. *J. Ethnopharmacol.* 150, 223–231.
- Tang, B., Zhu, B., Liang, Y., Bi, L., Hu, Z., Chen, B., Zhang, K., Zhu, J., 2011. Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF- $\beta$ /Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF- $\beta$ RI and TGF- $\beta$ RII in keloid fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 563–572.
- Toffolon, M., 2014. Principal component analysis with sesquiterpene lactones: focusing on NF- $\kappa$ B activity. *Universita' degli studi di Padova.*

- Tom, W.L., Peng, D.H., Allaei, A., Hsu, D., Hata, T.R., 2005. The effect of short-contact topical tretinoin therapy for foot ulcers in patients with diabetes. *Arch. Dermatol.* 141, 1373–1377.
- Toriseva, M., Kähäri, V.-M., 2009. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 203–224.
- Törmä, H., Vahlquist, A., 1985. Biosynthesis of 3-dehydroretinol (vitamin A<sub>2</sub>) from all-*trans*-retinol (vitamin A<sub>1</sub>) in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 85, 498–500.
- Tóth, G., Szabolcs, J., 1981. Occurrence of some mono-*cis*-isomers of asymmetric C 40-carotenoids. *Phytochemistry* 20, 2411–2415.
- Tsuji-Naito, K., Ishikura, S., Akagawa, M., Saeki, H., 2010.  $\alpha$ -Lipoic acid induces collagen biosynthesis involving prolyl hydroxylase expression via activation of TGF- $\beta$ -Smad signaling in human dermal fibroblasts. *Connect. Tissue Res.* 51, 378–387.
- Tsutsumi, K., Fujikawa, H., Kajikawa, T., Takedachi, M., Yamamoto, T., Murakami, S., 2012. Effects of L-ascorbic acid 2-phosphate magnesium salt on the properties of human gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res.* 47, 263–271.
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., Takido, M., 2001. Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible *Chrysanthemum* flower extract and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3187–3197.
- Vahlquist, A., Duvic, M., 2007. Retinoids and carotenoids in dermatology. Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- Vahur, S., Teearu, A., Haljasorg, T., Burk, P., Leito, I., Kaljurand, I., 2012. Analysis of dammar resin with MALDI-FT-ICR-MS and APCI-FT-ICR-MS. *J. Mass Spectrom.* 47, 392–409.

- van der Doelen, G.A., van den Berg, K.J., Boon, J.J., Shibayama, N., René de la Rie, E., L. Genuit, W.J., 1998. Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 809, 21–37.
- Varani, J., Warner, R.L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H., Kang, S., Chung, J., Wang, Z., Datta, S.C., Fisher, G.J., Voorhees, J.J., 2000. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* 114, 480–486.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., 2009. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37, 1528–1542.
- von Raison, A.J.D., 1999. Untersuchungen zur Sekundärstoffführung der Blüten von *Arnica lonchophylla* sowie zur systematischen Stellung der Gattung *Arnica* innerhalb der Asteraceae anhand der RbcL-Basensequenzen.pdf. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wang, J., Zhou, J., Zhang, N., Zhang, X., Li, Q., 2014. A heterocyclic molecule kartogenin induces collagen synthesis of human dermal fibroblasts by activating the smad4/smud5 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 568–574.
- Wang, L., Li, X., Zhang, S., Lu, W., Liao, S., Liu, X., Shan, L., Shen, X., Jiang, H., Zhang, W., Huang, J., Li, H., 2012. Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 4164–4171.
- Wang, L., Tankersley, L.R., Tang, M., Potter, J.J., Mezey, E., 2004. Regulation of  $\alpha 2(I)$  collagen expression in stellate cells by retinoic acid and retinoid X receptors through interactions with their cofactors. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 92–98.

- Wang, S., Qiao, L., Shi, X., Hu, C., Kong, H., Xu, G., 2015. On-line stop-flow two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry method for the separation and identification of triterpenoid saponins from ginseng extract. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 331–341.
- Wardecki, T., Werner, P., Thomas, M., Templin, M.F., Schmidt, G., Brandner, J.M., Merfort, I., 2016. Influence of birch bark triterpenes on keratinocytes and fibroblasts from diabetic and nondiabetic donors. *J. Nat. Prod.* 79, 1112–1123.
- Warner, R.L., Bhagavathula, N., Nerusu, K., Hanosh, A., McClintock, S.D., Naik, M.K., Johnson, K.J., Ginsburg, I., Varani, J., 2008. MDI 301, a nonirritating retinoid, improves abrasion wound healing in damaged/atrophic skin. *Wound Repair Regen.* 16, 117–124.
- Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M., 2010. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci. Signal.* 3, 1–6.
- Wei, R.R., Warner, W.G., Lambert, L.A., Kornhauser, A., 1998.  $\beta$ -carotene uptake and effects on intracellular levels of retinol *in vitro*. *Nutr. Cancer* 30, 53–58.
- Werner, P., 2016. Einfluss des wundheilungsfördernden Birkenkorkextraktes auf Keratinozyten und Fibroblasten von nicht-diabetischen und diabetischen Spendern. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- Wertz, K., Seifert, N., Hunziker, P.B., Riss, G., Wyss, A., Lankin, C., Goralczyk, R., 2004.  $\beta$ -carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 654–670.
- Wiłkomirski, B., 1985. Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers. *Phytochemistry* 24, 3066–3067.
- Willuhn, G., Westhaus, R., 1987. Loliolide (calendin) from *Calendula officinalis*. *Planta Med.* 1987, 1987.
- Wojciechowski, Z., Bocheńska-Hryniewicz, M., Kucharczak, B., Kasprzyk, Z., 1972.

- Sterol and triterpene alcohol esters from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry* 11, 1165–1168.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanouchi, S., Kumaki, K., Tamura, T., Takido, M., 1996. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1329–1331.
- Yoshizawa, M., Miyazaki, H., Kojima, S., 1998. Retinoids potentiate transforming growth factor-beta activity in bovine endothelial cells through up-regulating the expression of transforming growth factor-beta receptors. *J. Cell. Physiol.* 573, 565–573.
- Zidorn, C., Dirsch, V.M., Rüngeler, P., Sosa, S., Della Loggia, R., Merfort, I., Pahl, H.L., Vollmar, A.M., Stuppner, H., 1999. Anti-inflammatory activities of hypocretenolides from *Leontodon hispidus*. *Planta Med.* 65, 704–708.
- Zitterl-Eglseer, K., Jurenitsch, J., Korhammer, S., Haslinger, E., Sosa, S., Della Loggia, R., Kubelka, W., Franz, C., 1991. Entzündungshemmende Sesquiterpenlactone von *Achillea setacea*. *Planta Med.* 57, 444–446.
- Zitterl-Eglseer, K., Sosa, S., Jurenitsch, J., Schubert-Zsilavecz, M., Della Loggia, R., Tubaro, A., Bertoldi, M., Franz, C., 1997. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.* 57, 139–144.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
18S rRNA	18S ribosomal RNA
Abb	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
AP-1	Aktivatorprotein-1
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
at-RA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
BCO1	β,β-Carotin 15,15`-monoxygenase 1
BCO2	β,β-Carotin 9`,10`-monoxygenase 2
bFGF	Fibroblast growth factor 2 (FGF2)
BPE	Bovine pituitary extract
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Stoffmengenkonzentration
CAM	Chorioallantoismembran Modell
cDNA	Complimentary Desoxyribonucleic Acid
CID	Collision Induced Dissociation
CMR	Chylomikron Rest
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<i>C. officinalis</i>	<i>Calendula officinalis</i>
COSY	Correlated Spectroscopy
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünschichtchromatografie / Dünschichtchromatogramm
ddROL	3,4-Didehydroretinol
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbeccos's Phosphate-Buffered Saline
EZM	Extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethanol-Extrakt
EGF	Epidermal growth factor
EI	Electron Impact
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELS	Evaporative Light Scattering
EMA	European Medicines Agency
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ESCOF	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	Electrospray Ionization
et al.	et alii (und andere)
FAM	Carboxyfluorescein
FBS	Fetales Bovines Serum
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FS	Fettsäure
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	<i>n</i> -Hexan-Extrakt
HDF	Human dermal fibroblast
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein
HGF	Hepatocyte growth factor
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMPC	Committee on herbal medicinal products
HR	High Resolution
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1 $\alpha$ / $\beta$	Interleukin 1 alpha / -beta
IL-8	Interleukin 8
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
I $\kappa$ B $\alpha$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

J.	Jahre
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KG	Kieselgel
KGF	Keratinocyte growth factor
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LH	Lysylhydroxylase
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloprotease
MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Na	Natrium
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	Nerve growth factor
NHK	Normal human keratinocytes
nm	Nanometer
NMR	Kernresoanzspektrometrie
p	phosphoryliert
P4H	Prolyl-4-hydroxylase
PAL-1	Plasminogen activator inhibitor-1

P/S	Penicillin / Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RAL	Retinal
RAR	Retinoid Acid Receptor
RBP	Retinol bindendes Protein
RE	Retinylester
RNA	Ribonucleic Acid
ROL	Retinol (Vitamin A)
ROS	Reactive oxygen species
RP	Reversed Phase
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Receptor
s	Sekunde
SC	Säulenchromatografie
S.D.	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean
Tab	Tabelle
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TE	Triterpenextrakt
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factors alpha
TOF	Time Of Flight
U	Umdrehung
(U)HPLC	(Ultra) High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WE	Wässrige Extrakt
XIC	Extracted Ion Chromatogram
z.B.	zum Beispiel

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Calendula officinalis</i> L. Links: orange blühende Varietät, rechts: gelb blühende Varietät. ....	5
Abb. 2: Strukturen der bereits nachgewiesenen pentazyklischen Triterpenalkohole in <i>Calendula</i> -Blüten. ....	6
Abb. 3: Strukturen von Carotinoiden und deren Abbauprodukte aus <i>Calendula</i> -Blüten. ....	7
Abb. 4: Phasen der Wundheilung. ....	14
Abb. 5: Biosynthese der Carotinoide. ....	16
Abb. 6: Schematische Darstellung der enzymatischen Spaltung des $\beta$ -Carotins und Strukturen der natürlichen Retinoide. ....	18
Abb. 7: Metabolismus, Transport und Speicherung der Carotinoide im menschlichen Körper und in der Haut. ....	20
Abb. 8: Schematische Darstellung der Kollagensynthese. ....	23
Abb. 9: Regulierung der Aktivierung und Inhibierung der MMPs. ....	24
Abb. 10: <i>Matricaria recutita</i> L. ....	29
Abb. 11: Strukturen der im ätherischen Öl von Kamillenblüten vorkommenden Verbindungen. ....	29
Abb. 12: Degradierung des Matricins zu Chamazulen. ....	30
Abb. 13: $^1\text{H}$ -Spektrum des <i>n</i> -Hexan-Extrakts (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	34
Abb. 14: $^1\text{H}$ -Spektrum des Ethanol-Extrakts (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). ....	35
Abb. 15: $^1\text{H}$ -Spektrum des wässrigen Extrakts (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). ....	35
Abb. 16: Struktur der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 – 4. ....	36
Abb. 17: EI-MS der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 nach basischer Hydrolyse. ....	37
Abb. 18: $^1\text{H}$ -Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	41
Abb. 19: $^{13}\text{C}$ -Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	41
Abb. 20: $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	42
Abb. 21: HSQC-Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	42
Abb. 22: HMBC-Spektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 - 4 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	43
Abb. 23: HR-+APCI-Massenspektrum der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 – 4. ....	43
Abb. 24: Struktur der Verbindungen 5a+b. ....	44
Abb. 25: EI-Massenspektrum der Verbindungen 5a+b nach basischer Hydrolyse. ....	45
Abb. 26: EI-MS-Fragmentierungsschema von Dammarendiol II. ....	45
Abb. 27: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 5a+b. ....	46
Abb. 28: $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	49
Abb. 29: $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	49
Abb. 30: $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	50
Abb. 31: HSQC-Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	50
Abb. 32: HMBC-Spektrum der Verbindungen 5a+b (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	51
Abb. 33: Struktur der Verbindungen 6a+b. ....	51

Abb. 34: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 6a+b. ....	52
Abb. 35: <sup>1</sup> H-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	55
Abb. 36: <sup>13</sup> C-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	55
Abb. 37: <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	56
Abb. 38: HSQC-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	56
Abb. 39: HMBC-Spektrum der Verbindungen 6a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	57
Abb. 40: Struktur der Verbindungen 7a+b.....	57
Abb. 41: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 7a+b. ....	58
Abb. 42: HR-+APCI-Massenspektrum (Ausschnitt) der Verbindungen 7a+b.....	59
Abb. 43: <sup>1</sup> H-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	61
Abb. 44: <sup>13</sup> C-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	62
Abb. 45: <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	62
Abb. 46: HSQC-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	63
Abb. 47: HMBC-Spektrum der Verbindungen 7a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	63
Abb. 48: Struktur der Verbindungen 8a+b.....	64
Abb. 49: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 8a+b. ....	65
Abb. 50: EI-MS-Massenspektrum der Verbindungen 8a+b nach basischer Hydrolyse. ....	65
Abb. 51: EI-MS-Fragmentierungsschema von Maniladiol. ....	66
Abb. 52: <sup>1</sup> H-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	68
Abb. 53: <sup>13</sup> C-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	69
Abb. 54: <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	69
Abb. 55: HSQC-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	70
Abb. 56: HMBC-Spektrum der Verbindungen 8a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	70
Abb. 57: Struktur der Verbindungen 9a+b.....	71
Abb. 58: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 9a+b. ....	72
Abb. 59: HR-ESI-Massenspektrum der Verbindungen 9a+b. ....	72
Abb. 60: <sup>1</sup> H-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	75
Abb. 61: <sup>13</sup> C-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	75
Abb. 62: <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	76
Abb. 63: HSQC-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	76
Abb. 64: HMBC-Spektrum der Verbindungen 9a+b (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	77
Abb. 65: Struktur der Verbindung 10.....	77
Abb. 66: <sup>1</sup> H-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	79
Abb. 67: <sup>13</sup> C-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	80
Abb. 68: <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	80
Abb. 69: HSQC-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	81
Abb. 70: HMBC-Spektrum der Verbindung 10 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	81
Abb. 71: Strukturen der Faradiol 3-ester (11a+b) und Arnidiol 3-ester (12a+b).....	82
Abb. 72: HR-+APCI-Massenspektrum der Verbindungen 11a+b und 12a+b. ....	83
Abb. 73: Gaschromatogramm der Verbindungen 11a+b und 12a+b nach basischer Hydrolyse. ....	83
Abb. 74: EI-Massenspektrum der Verbindungen 11a+b nach basischer Hydrolyse. ....	84
Abb. 75: EI-Massenspektrum der Verbindungen 12a+b nach basischer Hydrolyse. ....	84
Abb. 76: Strukturen von β-Amyrin (13), α-Amyrin (14), η-Taraxasterol (15), Taraxasterol (16).....	85
Abb. 77: Gaschromatogramm der Verbindungen 13 – 16. ....	86
Abb. 78: EI-Massenspektrum der Verbindung 13 nach GC-MS-Analyse. ....	86

Abb. 79: EI-Massenspektrum der Verbindung 14 nach GC-MS-Analyse. ....	87
Abb. 80: EI-Massenspektrum der Verbindung 15 nach GC-MS-Analyse. ....	87
Abb. 81: EI-Massenspektrum der Verbindung 16 nach GC-MS-Analyse. ....	88
Abb. 82: UHPLC-Trennung der Triterpenmonoester mittels einer RP-C18-Säule und Übereinanderlagerung der XICs. ....	89
Abb. 83: QTOF-MS/MS-Spektren nach Kinetex-C18-UHPLC-Trennung von A) Faradiol 3- myristat (11a) und B) Arnitriol A 3-myristat (6a) mit charakteristischer Fragmentierung.....	91
Abb. 84: Postuliertes Fragmentierungsschema von Faradiol 3-myristat (11a) aufgrund der MS/MS-Analyse. ....	91
Abb. 85: Postuliertes Fragmentierungsschema von Arnitriol A 3-myristat (6a) aufgrund der MS/MS-Analyse. ....	92
Abb. 86: Direkteinlass MS/MS-Spektren von Verbindung 5a (A) und Verbindung 5b (B) zum Nachweis der $[M+H]^+$ -Quasimolekülonen. ....	93
Abb. 87: HPLC-APCI-QTOF MS-Analyse der Verbindungen 1 – 4 und Überlagerung mit den Standardsubstanzen. ....	95
Abb. 88: „Direct infusion“-MS-Spektren der synthetischen Standards der gemischten Diester, Faradiol 3-myristat,16-palmitat (FMP) (A) und Faradiol 3-palmitat,16- myristat (FPM) (B). ....	95
Abb. 89: „Direct infusion“-MS/MS-Spektren der Verbindungen 1 - 4. ....	96
Abb. 90: Postuliertes Fragmentierungsschema der Faradiol 3,16-diester mit einem Myristoylrest an C-3 aufgrund der MS/MS-Analyse. ....	96
Abb. 91: Strukturen der Verbindungen 17 und 18. ....	97
Abb. 92: HR-APCI-Massenspektrum im negativen Modus der Verbindungen 17+18. ....	100
Abb. 93: EI-Massenspektrum der Verbindung 17 nach saurer Hydrolyse. ....	100
Abb. 94: EI-Massenspektrum der Verbindung 18 nach saurer Hydrolyse. ....	101
Abb. 95: $^1\text{H}$ -Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	103
Abb. 96: $^{13}\text{C}$ -Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	104
Abb. 97: $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	104
Abb. 98: HSQC-Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	105
Abb. 99: HMBC-Spektrum der Verbindungen 17+18 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	105
Abb. 100: Chromatogramm der HPLC-DAD-ELS-Analyse der Fraktion, in der die Verbindungen 17+18 angereichert waren. ....	106
Abb. 101: Struktur von $\alpha$ -Elemol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat. ....	107
Abb. 102: Untersuchung der <i>Calendula</i> -Extrakte auf die durch TNF- $\alpha$ induzierte NF- $\kappa$ B- DNA-Bindungsaktivität in humanen immortalisierten Keratinocyten. ....	108
Abb. 103: Untersuchung der <i>Calendula</i> -Extrakte auf die durch TNF- $\alpha$ induzierte NF- $\kappa$ B- DNA-Bindungsaktivität in humanen primären Fibroblasten.....	109
Abb. 104: Untersuchung der <i>Calendula</i> -Extrakte auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen immortalisierten Keratinocyten. ....	110
Abb. 105: Untersuchung der <i>Calendula-Extrakte</i> auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen primären Fibroblasten. ....	111
Abb. 106: Beeinflussung von IL-8 auf die mRNA- (A) und Proteinebene (B) durch EE und HE in humanen immortalisierten Keratinocyten. ....	112
Abb. 107: Untersuchung der <i>Calendula</i> -Extrakte, einiger seiner Triterpene und $\beta$ -Carotins im Scratch Assay und Verwendung von humanen immortalisierten Keratinocyten und Stimulation von 12 h. ....	114

Abb. 108: Effekt von EE und WE aus <i>Calendula</i> -Blüten auf die bakterielle Kollagenase. ....	116
Abb. 109: Einfluss der Hunger- und Stimulationszeit auf den Kollagengehalt im Überstand von primären humanen Fibroblasten nach Stimulation mit APM. ....	118
Abb. 110: Effekt der <i>Calendula</i> -Extrakte auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten. ....	119
Abb. 111: Effekt einiger Fraktionen von EE aus <i>Calendula</i> -Blüten auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten. ....	120
Abb. 112: Effekt einiger Fraktionen von HE aus <i>Calendula</i> -Blüten auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten. ....	121
Abb. 113: Effekt von Retinoiden und Carotinoiden auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten. ....	122
Abb. 114: Effekt von EE auf den Kollagengehalt in humanen primären Fibroblasten. ....	123
Abb. 115: Effekt von HE auf die Viabilität von humanen immortalisierten Keratinocyten im MTT-Assay nach 7 h. ....	124
Abb. 116: Effekt der <i>Calendula</i> -Extrakte auf die Viabilität von humanen immortalisierten Keratinocyten im MTT-Assay nach 12 h. ....	124
Abb. 117: Effekt von HE auf die Viabilität von humanen primären Fibroblasten im MTT- Assay nach 7 h. ....	125
Abb. 118: Effekt der <i>Calendula</i> -Extrakte auf die Viabilität von humanen primären Fibroblasten im MTT-Assay nach 72 h. ....	125
Abb. 119: Effekt von IL-1 $\beta$ auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in verschiedenen Zellen. ....	127
Abb. 120: Effekt von Matricin auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen, immortalisierten Keratinocyten. ....	128
Abb. 121: Effekt von Matricin auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in humanen, immortalisierten Keratinocyten und Vergleich der Stimulationen mit IL-1 $\beta$ bzw. TNF- $\alpha$ . ....	129
Abb. 122: Effekt von Matricin auf die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern in humanen immortalisierten Keratinocyten. ....	130
Abb. 123: Effekt von Matricin auf die mRNA-Expression von ICAM-1 in humanen immortalisierten Keratinocyten. ....	131
Abb. 124: Strukturen der aus Blüten von <i>Calendula officinalis</i> isolierten Triterpene und Sesquiterpenglycoside. ....	133
Abb. 125: DC-Untersuchung der <i>Calendula</i> -Extrakte (HE, EE, WE) auf Triterpene und Zuordnung von Triterpenen und Sterolen in HE. ....	157
Abb. 126: DC-Untersuchung der <i>Calendula</i> -Extrakte (HE, EE, WE) auf Flavonoide, Kaffeensäurederivate und Triterpensaponine. ....	158
Abb. 127: DC-Untersuchung der Fraktionen nach SC-Trennung von HE über neutralem Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> auf Carotinoide und Triterpene. ....	158
Abb. 128: DC-Untersuchung der Fraktionen nach SC-Trennung von EE über Sephadex LH- 20 auf Flavonoide, Kaffeensäurederivate und Triterpensaponine. ....	159
Abb. 129: Isolierungsschema der Verbindungen 1 - 18 aus dem <i>n</i> -Hexan-Extrakt von <i>C</i> <i>officinalis</i> . ....	162
Abb. 130: Struktur des Farbstoffs Picro Sirius Red. ....	185
Abb. 131: Schematische Darstellung des Ablaufes des Scratch Assays. ....	189
Abb. 132: Reduktionsreaktion von MTT zum Formazan durch die mitochondriale, Succinat- abhängige Dehydrogenase. ....	189

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der im Gemisch angereicherten Verbindungen 1 – 4 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte zu Faradiol 3-myristat.....	39
Tab. 2: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der im Gemisch angereicherten Verbindungen 5a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ -Werte zu Dammarendiol II sowie $^1\text{H}$ -NMR-Werte von Dammarendiol II-3-palmitat .....	47
Tab. 3: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der im Gemisch angereicherten Verbindungen 6a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -NMR-Werte zu Arnitriol A 3-palmitat .....	53
Tab. 4: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -Werte der Verbindungen 7a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Werte zu Lupan-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20-triol 3-monoester .....	60
Tab. 5: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindungen 8a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Werte zu Maniladiol 3-palmitat .....	67
Tab. 6: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindungen 9a+b ( $\text{CDCl}_3$ ) ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Werte zu Calenduladiol 3-myristat .....	73
Tab. 7: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindung 10 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ -Werte von Faradiol (nach (Della Loggia et al., 1994)) .....	78
Tab. 8: Übersicht über Retentionszeiten und $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasimolekülonen nach RP-C18-UHPLC-QTOF-MS/MS-Analyse der Triterpenmonoester aus <i>Calendula</i> -Blüten. ....	90
Tab. 9: Übersicht über Retentionszeiten und $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ionen nach RP-C30-HPLC-QTOF-MS/MS-Analyse der Verbindungen 1 - 4 aus <i>Calendula</i> -Blüten.....	94
Tab. 10: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindung 17 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Werte zu $\beta$ -Eudesmol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-angelat.....	101
Tab. 11: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte der Verbindung 18 ( $\text{CDCl}_3$ ) und Literaturangaben der $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Werte zu Viridiflorol- $\beta$ -D-fucopyranosid-2'-O-(3''-methyl-pentenoat).....	102
Tab. 12: weitere identifizierte Sesquiterpenglycoside nach HPLC-DAD-ELS-Analyse der Fraktion, in der die Verbindungen 17+18 angereichert waren .....	106
Tab. 13: Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	150
Tab. 14: Verwendete Kits, Primer und Sonden.....	153
Tab. 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	153
Tab. 16: Verwendete Geräte .....	154
Tab. 17: Übersicht über die verwendeten Fließmittel und Detektionsreagenzien .....	156
Tab. 18: R <sub>f</sub> -Werte der Verbindungen 1 - 18 aus <i>C. officinalis</i> sowie deren Anfärbung mit Anisaldehyd / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	159
Tab. 19: Ergebnis der SC-Trennung des <i>n</i> -Hexan-Extrakts von <i>C. officinalis</i> f in 2 Portionen I und II über KG 60 mittels MPLC sowie in Portion III über neutralem Aluminiumoxid Aktivitätsgrad III .....	163
Tab. 20: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen I.13 in 3 Portionen sowie I.11 über Florisil .....	164
Tab. 21: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen I.13.II.5 über KG 60.....	164
Tab. 22: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen I.13.II.1, I.13.II.1.5 und I.13.II.1.6 über KG 60.....	165
Tab. 23: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktion TFa über KG 60 mittels MPLC.....	165
Tab. 24: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen TFa.11 ; TFa.11.2 und TFa.12 über KG 60 .....	166

---

Tab. 25: Ergebnis der SC-Trennung der Fraktionen TFb, TFb.10 und TFb.11 über KG 60 .....	167
Tab. 26: Ergebnis der SC-Trennung des ethanolischen Extrakts (EE) von <i>Calendula</i> -Blüten über Sephadex LH-20 .....	168
Tab. 27: Verwendete primäre Zellen .....	169
Tab. 28: Zusammensetzung von PBS .....	171
Tab. 29: Zusammensetzung des Totex-Lysepuffers .....	174
Tab. 30: Zusammensetzung der Puffer A und C .....	175
Tab. 31: Zusammensetzung des EMSA-Reaktionsmixes und der Puffer .....	178
Tab. 32: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels .....	178
Tab. 33: Am LightCycler 480 untersuchte Gene und deren Sequenzen .....	182
Tab. 34: Zusammensetzung des Mastermixes für die qRT-PCR am LightCycler 480 .....	183
Tab. 35: Schema für den Ablauf der qRT-PCR am LightCycler 480 .....	183

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## 10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort für die Vergabe des interessanten und vielseitigen Themas, ihr in mich gesetztes Vertrauen, ihre Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschläge, die mir stets konstruktive Denkanstöße gaben sowie das Ermöglichen der Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Bechthold danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats und Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert für die Übernahme der Aufgabe des Drittprüfers.

Herrn Prof. Dr. Renato Murillo möchte ich sehr für seine Hilfe bei der Strukturaufklärung und der Interpretation der NMR-Spektren danken. Muchas gracias por todo tu apoyo en las etapas difíciles.

Herrn Prof. Dr. Michael Lämmerhofer und Adrian Sievers-Engler danke ich sehr für die Etablierung der (U)HPLC-QTOF-APCI-MS/MS-Methoden und die Hilfe bei der Identifizierung der Triterpenmono- und diester.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei

- ❖ Herrn Prof. Dr. Markus Ganzera und Dr. Anja Hartmann für die Testung der *Calendula*-Extrakte im *in vitro* Kollagenase-Inhibitions-Assay.
- ❖ Frau Prof. Dr. Leena Bruckner-Tuderman für die Bereitstellung der humanen immortalisierten Keratinocyten.
- ❖ Dr. Michele D'Ambrosio für das Überlassen von Faradiol 3-myristat und – palmitat sowie die Durchführung der HPLC-DAD-ELS- und LC-MS-Analyse und seine Hilfe bei der Identifizierung der Sesquiterpenglycoside.
- ❖ Dr. Jürgen Wörth und Christoph Warth für die Durchführung der HR-APCI- und ESI-MS-Analysen
- ❖ Dr. Wolfram Junghanns für die Bereitstellung der *Calendula*-Blüten
- ❖ Sascha Ferlino für die Aufnahme der NMR-Spektren.

❖ Barbara Schuler für die Durchführung der EMSAs.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der AG Merfort und AG Bechthold für die harmonische und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei Regina Dornhof, Katharina Heßelbach, Stefanie Hackl, Astrid Erber, Dr. Tanja Heitzler, Philipp Schwarzer, Dr. Roman Makitrynsky und Olya Tsyplik für ihre Unterstützung mit Rat und Tat während meiner Promotion, die heiteren Mittagspausen in der Mensa sowie die zahlreichen Aktivitäten außerhalb des universitären Alltags. Dr. Philipp Werner und Dr. Tina Wardecki danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und diverse biologische Untersuchungsmethoden sowie die schönen Momente in Budapest auf dem GA-Kongress. Vielen Dank auch an Markus Essing, der mir immer bei Fragen rund um PC und Technik zur Seite stand. Bei Dr. Gabriele Weitnauer bedanke ich mich für die gemeinsame angenehme Betreuung des PB-III-Praktikums. Außerdem danke ich Dr. Bettina Siedle und Dr. Matjaz Humar für ihr offenes Ohr für jegliche Fragen; Dr. Christian De Ford für die schöne Zeit im Büro, Susanne Junghanns für ihr Engagement während ihrer Diplomarbeit sowie Gesa Gnegel für ihre Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen zu den Carotinoiden während ihres Praktikums.

Mein großer Dank gilt auch meinen Freunden Martin Kittel, Alexander Kuchta, Nancy Sykora, Dr. Sten König, Dr. Robert Hennig, Dr. Robert Liebner sowie Thomas Köhler, Ekkehart Baer und Prof. Dr. Axel Nicolaus, die mich immer auf meinem Weg bestärkt haben.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meiner Großmutter, die mich auf meinem bisherigen Weg auf jede erdenkliche Weise unterstützt haben und mir die Kraft gaben, meine Ziele zu verwirklichen. Auch wenn nicht mehr unter den Lebenden so hat mich mein Vater stets in Gedanken begleitet.

