

# „OZDRAVNÉ“ LÁTKY A MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA CHMELOVÝCH GENŮ

## „MEDICINAL“ COMPOUNDS AND MOLECULAR ANALYSIS OF HOP GENES

JAROSLAV MATOUŠEK, Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, Oddělení molekulární genetiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, e-mail: jmat@umbr.cas.cz

**Matoušek, J.: „Ozdravné“ látky a molekulární analýza chmelových genů.** Kvasny Prum. 52, 2006, č. 2, s. 38–40.

Současné analýzy sekundárních metabolitů chmelu potvrzují úlohu chmelu jako plodiny, která je „molekulární továrnou“ a zdrojem pro nová léčiva. Současná studia se zaměřila především na prenylované flavonoidy a na biochemický potenciál xanthohumolu jako chemopreventivního a protirakovinného agens, působícího na všech stádiích vývoje rakoviny. Současný poznatek, že xanthohumol může být přeměněn na nejúčinnější rostlinný fytoestrogen 8-prenylarigenin působením lidské střevní mikroflóry, zvyšuje jeho dostupnost z přírodních chmelových produktů. Na trh byl uvolněn první opravdový medikament vyrobený z chmelu, tzv. MenoHop, který se užívá jako doplněk stravy pro překonání negativních symptomů klimakteria.

Paralelně je zde zvyšující se úsilí využít molekulární genetiku k přípravě nových odrůd chmelu s vyšším obsahem prenylflavonoidů. V našich studiích jsme identifikovali rodinu chmelových genů *chs\_H1* kodeterminující biosyntézu prenylovaných chalconů. Dle analýzy tzv. promotorových úseků jsou uvedené geny regulovány pomocí faktorů MYB R2R3. Dvě úplné kopie genů pro faktory R2R3 nazvané HIMyb1 a HIMyb5 byly klonovány z českého chmelu Oswald 72. V našich experimentech bylo navíc zjištěno, že dokonce MYB faktor z huseničky, nazvaný PAP1, stimuluje produkci chalconů působením na přirozené chmelové geny *chs\_H1*. Díky těmto zjištěním se očekává, že tzv. biotechnologie MYB povede k přípravě chmelových GMO jako nového výchozího materiálu pro šlechtění chmelu.

**Matoušek, J.: „Medicinal“ compounds and molecular analysis of hop genes.** Kvasny Prum. 52, 2006, No. 2, p. 38–40.

Recent analyses of hop (*Humulus lupulus* L.) secondary metabolites confirm a role of hop as a „molecular factory“ crop being a rich source for new medicaments. New studies have particularly focused on prenylated flavonoids and to biochemical potential of Xanthohumol as a fascinating cancer-chemopreventive compound acting at all stages of carcinogenesis. The recent finding that Xanthohumol can be converted to the most potent plant phytoestrogen, 8-prenylarigenin by human intestinal microflora, increases the availability of this compound from natural hop products. The first food supplement made from hop, so-called MenoHop has been released to the market as a real medicament beneficial for overcoming symptoms of human menopause.

In parallel, there is an increasing effort to exploit molecular genetics to produce new hop varieties with higher content of prenylflavonoids. In our studies the oligofamily of hop genes called *chs\_H1*, co-determining biosynthesis of prenylated chalcones has been identified. According to the analysis of promoter elements of *chs\_H1* genes, they are regulated by factors MYB R2R3. Two full R2R3 mybs designated HIMyb1 and HIMyb5, were cloned from Czech hop Oswald 72. In addition, even MYB factor from *Arabidopsis* called PAP1 has been shown in our studies to stimulate production of chalcones mediated by natural *chs\_H1* genes. Thus, myb biotechnology is expected to be a powerful tool to produce hop transgenotes as a new breeding materials.

**Matoušek, J.: „Heilstoffe“ und Molekularanalyse von Hopfengenen.** Kvasny Prum. 52, 2006, Nr. 2, S. 38–40.

Die zeitgenössische Analyse von Hopfensekondärmetaboliten bestätigen eine Aufgabe des Hopfens als einer Pflanze, die „eine Molekularfabrik“ und eine Quelle für neue Arzneimittel darstellen kann. Die Forschungsarbeit wurde vor allem auf Prenylflavonoide und auf

den biochemischen Potential des Xanthohumols orientiert, der als ein chemiepräventive- und antikrebs Agens in allen Stadien der Krebsentwicklung wirken können. Die neue Erkenntnis, dass Xanthohumol durch Wirkung der menschlichen Darmmikroflora zum äußerst wirkenden Pflanzenphytoestrogen 8-Prenylarigenin umgewandelt werden kann, erhöht seine Zugänglichkeit aus den Naturhopfenprodukten. Auf den Markt wurde unter Name „MenoHop“ das erste aus dem Hopfen hergestellte Arzneimittel eingeführt, das als eine zur Klimakteriumssymptombeseitigung dienende Nahrungsergänzung angesetzt wird.

Parallel zur diesen Tätigkeit wird die Molekulargenetik zur neuen Hopfensortenvorbereitung mit einem höheren Prenylflavonoidenhalt angewandt. In unserer Arbeit wurde eine codeterminierende Biosynthese von Prenylchalkons der Hopfengruppe *chs\_H1* identifiziert. Auf Grund der sogenannten Promotorgruppen werden die angeführte Gene durch Faktoren MYB R2R3 reguliert. Zwei komplette Kopien von Genen für R2R3 Faktoren, genannte HIMyb1 a HIMyb5, werden aus dem tschechischen Hopfen Oswald 72 kloniert. Während unserer Forschungstätigkeit wurde sogar festgestellt, dass aus dem *Arabidopsis thaliana* MYB Faktor mit dem Name PAP 1 durch Wirkung aus Naturhopfengene *chs\_H1* eine Chalkonproduktion stimuliert. Dank diesen Ermittlungsarbeiten kann erwartet werden, dass die sogenannte MYB Biotechnologie zur Vorbereitung von Hopfen GMO, die als ein Ausgangsmaterial zur Hopfenveredelung angewandt werden kann.

**Матюшек, Я.: Здоровье поддерживающие вещества и молекулярный анализ хмелевых генов.** Kvasny Prum. 52, 2006, No. 2, стр. 38–40.

Современные анализы вторичных метаболитов хмеля (*Humulus lupulus* L.) подтверждают роль хмеля как растения являющегося «молекулярным производителем» и источником новых лекарственных веществ. Изучения в настоящее время направлены прежде всего на пренилфлавоноиды и на биохимический потенциал ксантогумола как хемопротекторного и противоракового реагента, влияющего на всех стадиях развития рака. Современное сведение, что ксантогумол можно преобразовать на самый эффективный растительный фитоэстроген 8-прениларигенин воздействием микрофлоры в кишечнике человека, повышает его доступность в естественных хмелепродуктах. Было разрешено продавать на рынке первое действительное лекарство на базе хмеля, т.нз. МеноПор, принимаемый как питательная добавка для преодоления негативных признаков климактерия.

Параллельно имеется нарастающее усилие использовать молекулярную генетику для подготовки новых сортов хмеля с более высоким содержанием пренилфлавоноидов. В нашей работе была определена семья хмелевых генов *chs\_H1*, содействующая детерминации биосинтеза пренилхалконов. По анализу т.нз. промоторов указанные гены регулируются при помощи факторов MYB R2R3. Две полные копии генов для R2R3 факторов, называемые HIMyb1 и HIMyb5, были клонированы из чешского хмеля Oswald 72. Кроме того наши эксперименты показали, что фактор MYB полученный из *Arabidopsis thaliana*, называемый PAP1 стимулирует продукцию халконов воздействием на естественные хмелевые гены *chs\_H1*. Благодаря тому ожидается, что т.нз. биотехнология MYB содействует подготовке хмелевых GMO как нового исходного материала для селекции хмеля.

**Klíčová slova:** žatecký chmel, „ozdravné“ pivo, protirakovinné látky, regulační faktory, molekulární biologie, biotechnologie

**Keywords:** Saaz hop, „medicinal“ beer, anticancerogenic compounds, regulatory factors, molecular biology, biotechnology

**Chmel jako zdroj nových „medikamentů“**

Chmel byl znám v tradiční medicíně po celá staletí a mnohé autoritativní knihy a farmakopéa již v době středověku popisovaly různé

bioaktivity chmelu (*Humulus lupulus* L.). Soudobá zjištění, jež uvádějí léčivé vlastnosti sekundárních metabolitů chmelu, ukazují na potenciální využití této plodiny jako významné

molekulární továrny (molecular factory). Tyto předpoklady se v současné době bohatě naplňují i v rámci perspektiv, o kterých jsme před časem referovali v článku „Ozdravné pivo“ [9].

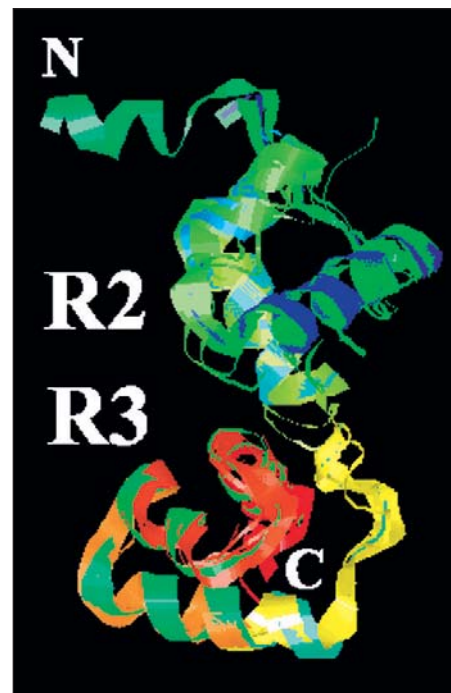
Sama problematika ozdravného charakteru piva je v současné době podrobně rozebrána v několika pracích (např. [1, 6, 8]) a byla prezentována v několika referátech na 21. Pivo-varsko-sladařských dnech konaných v roce 2005 v Ústí nad Labem. I když koncentrace látek pocházejících z chmelu dosahuje v pivu v průměru méně než 100 mg/l, a majoritní složku tvoří isohumulony, co se týká biologických efektů, největší pozornost základního i aplikovaného výzkumu přitahují minoritní prenylflavonoidy, jejichž koncentrace v pivu dosahuje maximálně 4 mg/l. Z těchto minoritních chmelových komponent piva pak zvláštní pozornost zasluhuje isoxanthohumol jako významný proestrogen, a to také v souvislosti s posledními výzkumy, které dokládají jeho přeměnu na 8-prenylnaringenin (v současné době též označovaný jako „hopein“) působením bakterií *Eubacterium limosum* lidské střevní mikroflóry [21]. Protože hopein je velice aktivním fytoestrogenem, který se svou biologickou aktivitou i specificitou blíží k živočišným estrogenům, nachází tato látka v současné době významné uplatnění jako skutečný chmelový medikament. Hopein je významnou součástí produktu „MenoHop“ pro zmírnění symptomů klimakteria u žen. „MenoHop“ je v současné době jako doplněk stravy vyráběn z chmelových hlávek firmou Biodynamics, Ostende v Belgii a exportován do řady zemí (obr. 1). Navíc v současnosti probíhají komplexní zkoušky pro použití chmelových prenylflavonoidů pro klinickou praxi. Není pochyb o tom, že tyto příklady svědčí o prolomení oné hranice, kdy biologický a lékařský výzkum povede k využití chmelového produktu v exaktní medicíně. O této společenské poptávce bylo v září 2005 podrobně referováno též na chmelovém minisymposiu v rámci 6. mezinárodního symposia ÚMBR AVČR „Recent Advances in Plant Biotechnology“ s příznačným názvem „From laboratory to Business“, které se uskutečnilo v Českých Budějovicích, mimochodem za sponzorství Budějovického Budvaru. Na tomto minisymposiu se například účastníci dozvěděli z přednášky jednoho z předních odborníků Prof. D. De Keukeleire z university v Ghentu řadu nových výsledků z výzkumů potenciálních chemoterapeutických vlastností komponent lupulinu a piva. K těmto výsledkům například

patří benefičiální aktivity isohumulonů pro úpravu diety cholesterolu a prevence obezity (např. [15, 24]) inhibice prostaglandinů [18]. Jiné nové poznatky se týkají například inhibičního vlivu 8-prenylnaringenu na angiogenezi *in vitro* a *in vivo* [20, 22], chemopreventivní a anti-proliferativní aktivity chmelových prenylflavonoidů u rakovinných buněk plic a prostaty (např. [2, 5]). Řada výsledků je v současné době věnována dostupnosti a utilizaci těchto významných chmelových komponent metabolismem člověka.

Uvedené výsledky spolu se staršími výzkumy, o kterých jsme referovali v předešlém článku, dokládají mimořádný zájem o tuto problematiku. Jen k tématu 8-prenylnaringenu od doby zjištění jeho estrogení aktivity v práci Milligan et al. [14], tj. od roku 1999, bylo do dnešní doby publikováno celkem 40 vědeckých prací, jež jsou citovány v 98 citacích. Část těchto publikací se týká šlechtitelů chmelu, kde dochází k logické snaze získat nové pěstelské materiály s vyšším obsahem ozdravných metabolitů pro produkci piva i chmelových medikamentů. V této souvislosti je na místě uvést i některé nové poznatky z oblasti molekulární genetiky, která může podstatným způsobem přispět k pochopení mechanismu biosyntézy těchto látek i k přípravě materiálů významných pro šlechtění chmelu.

#### Odhalení genů, které kodeterminují produkci léčivých komponent

Řada důležitých genů chmelu, které se podílejí na biosyntéze a zrání lupulinu, bude teprve identifikována. Avšak během minulého výzkumu českého chmelu, na kterém se podílí naše pracoviště ve spolupráci s Chmelářským institutem s.r.o. v Žatci zejména v rámci projektů Grantové agentury České republiky (GAČR 521/99/1591 a 521/03/0072), došlo k odhalení a identifikaci genů, které kódují enzym tzv. „pravou“ chalkonsyntasu (dle enzymatické nomenklatury EC 2.3.1.74), jež byla nazvána CHS\_H1 [10, 11]. Posléze byly identifikovány i další geny příbuzné této chalkonsyntase [16]. Pravá chalkonsyntasa, kterou jsme také identifikovali na základě proteomických studií s použitím výsledků krystalografie [4], byla v našich studiích rovněž zkoumána jako rekombinantní protein enzymaticky [12, 17]. Byla potvrzena vysoká a jednoznačná aktivita CHS\_H1 k substrátům, které vedou k biosyntéze prenylovaných chalkonů ve žláznatých pletivech chmelových hlávek, kde se specificky projevuje. Například pro CHS\_H1 činily kinetické parametry u prekurzoru chalkonu *p*-coumaroyl-CoA  $K_M = 40,9 \pm 0,1$  a  $V_{lim} = 256,5 \pm 28,1$ , což jsou hodnoty asi 44krát vyšší než pro valerophenon syntasu (VPS), publikovanou dříve japonskými autory [19]. Kromě toho bylo prokázáno, že CHS\_H1 je schopna využívat i substráty vedoucí k syntéze hořkých kyselin, a to s kinetikou srovnatelnou s VPS. Je přirozené, že za těchto okolností se hlavní výzkumné úsilí soustřeďuje na analýzu chmelové genové rodiny kódující CHS\_H1. Tato genová rodina byla v současné době podrobně charakterizována u českého chmelu Osvald 72 [23]. „Přečtení“ a porovnání jednotlivých genů zde ukázalo na jejich vysokou identitu v intervalu od 98,2 do 99,7 procent se zachováním úplné identity funkčně důležitých oblastí, což ukazuje na fungování této genové rodiny jako celku. Je však nutno konstatovat, že byly objeveny i ho-



Obr. 2 Strukturní model domény R2R3 chmelového regulačního faktoru HIMyB5. Doména R2R3 interaguje s DNA genomu v oblasti promotorů a vede k aktivaci chmelových genů.

mology chalkonsyntasy u chmelu, o jejichž funkcích můžeme dosud jen spekulovat [16], protože pro ně nebyly dosud nalezeny odpovídající substráty.

Mohlo by se zdát, že čím více genů rodina CHS\_H1 u jednotlivých odrůd chmelu má, tím větší je „úroda“ hořkých látek a prenylflavonoidů. Výzkumy posledních let však ukázaly, že zde není přímá korelace. Dokonce některé hybridní kultivary, vycházející z Osvaldova klonu českého chmelu, které dnes pěstujeme v ČR, jako například odrůdy Sládek a Premi-ant, mají stejný počet genů CHS\_H1, ale významně se liší co se týče poměru obsahu xanthohumolu a hořkých kyselin [11, 12]. Zdá se, že z českých chmelových materiálů vyniká v obsahu prenylovaných flavonoidů zejména odrůda Agnus [12]. Stabilní odrůdové rozdíly ukazují na genetickou regulaci rodiny genů *chs\_H1*, a tedy determinaci hladiny sekundárních metabolitů dalšími, pravděpodobně regulačními geny.

#### Regulační faktory a „technologie MYB“ – jeden ze směrů budoucího vývoje

Identifikace regulačních faktorů typu R2R3 MYB u chmelu je jedním z úkolů našeho současného projektu. Lze přitom vycházet z několika důležitých faktů: 1. biosyntetická dráha prenylflavonoidů má určité úseky velice podobné biosyntetické dráze květních barviv, jež regulace prostřednictvím faktorů MYB byly v literatuře popsány (např. [3]), a 2. naše vlastní analýza takzvaných „promotorových“ úseků *chs\_H1* genů chmelu odhalila sekvence charakteristické pro vazbu těchto faktorů. V současné době jsme identifikovali několik R2R3 sekvencí z chmelu a dva z těchto faktorů byly „přečteny“ kompletně. Jsou jimi první chmelový regulační faktor HIMyB1 [12] a faktor HIMyB5 (obr. 2), který se může rovněž účastnit regulace obrany chmelu vůči nepříznivým podmínkám nebo škůdcům. Funkce těchto molekul jsou nyní podrobně zkoumány.



Obr. 1 „MenoHop“ je jako doplněk stravy vyráběn z chmelových hlávek





Obr. 3 Regulační faktor PAP1 aktivuje chmelový gen *chs\_H1* v listech modelových rostlin *Petunia hybrida*, následkem této aktivace dochází ke tvorbě chalkonů a anthokyanů (modré zbarvení listů v místě genetické infiltrace, označeno šipkami)

Kromě vlastních chmelových regulačních genů lze však v současné době vážně uvažovat o využití tzv. technologie MYB. Jedná se o využití známých regulačních faktorů i z jiných rostlin. Pomocí těchto příbuzných faktorů lze „přinutit“ chmelové geny pracovat rychleji a účinněji. Výsledkem této zlepšené práce by následně mohla být větší produkce a výtečnost „ozdravných“ metabolitů. Jedním z kandidátů na tuto funkci je faktor PAP1, který jsme izolovali z huseníčku *Arabidopsis thaliana* a „napojili“ na gen *chs\_H1* z chmelu. Při vnesení těchto genů například do modelového objektu petunie pomocí genetické infiltrace nenechá na sebe výsledek u takových geneticky modifikovaných rostlin dlouho čekat. Každý zná tyto okrasné květiny velice důvěrně, aby věděl, že listy jsou u nich zelené a květy zbarvené v různých variacích od bílé přes červenou až do tmavě modré. U infiltrovaných petunií, které studujeme, dochází k intenzivnímu modráni listů v místě infiltrace cizorodé genetické informace (obr. 3). Bylo prokázáno, že tento efekt je způsoben faktorem PAP1, který „nutí“ chmelový gen produkovat chalkony a následně vznikají další flavonoidy i tam, kde nikdy nebývají [13]. A tak se gen z hospodářsky celkem bezvýznamného plevele může stát významným faktorem při jeho vnesení do chmelu. Pomocí transformace chmelu, která byla v uplynulých letech rozpracována (např. [7]), tak bude možné připravit šlechtitelsky významné materiály, chmelové GMO, které by mohly být využívány pro přípravu významných medikamentů a ozdravných metabolitů. Na tomto konceptu se naše pracoviště podílí v rámci domácí i zahraniční spolupráce. Této spolupráce se také týkalo uvedené minisymposium v Českých Budějovicích.

#### Poděkování

Spolupráce kolektivů oddělení molekulární genetiky ÚMBR AV ČR v Českých Budějovicích a oddělení explantátových kultur a diagnostiky Chmelářského institutu, s.r.o. v Žatci je sponzorována v rámci projektu GAČR 521/03/0072.

#### Literatura

1. Clarke, D.B., Barnes, K.A., Lloyd, A.S.: Determination of unusual soya and non-soya phytoestrogen sources in beer, fish

- products and other foods. Food Additives and Contaminants **21**, 2004, 949–962.
2. Delmulle, L., Bellahcène, A., Dhooge, W., Vanhoecke, B., Comhaire, F., Roelens, F., Huvaere, K., Heyerick, A., Castronovo, V., De Keukeleire, D.: Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in prostate cancer cell lines. Phytomedicine, 2007, in press.
3. Endt, D.V., Kijne, J.W., Memelink, J.: Phytochemistry **61**, 2002, 107–114.
4. Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P.: Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. Nature Struct. Biology **6**, 1999, 775–784.
5. Gerhäuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauf, J., Neumann, I., Scherf, H. R., Frank, N., Bartsch, H., Becker, H.: Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. Molecular Cancer Therapeutics. **1**, 2002, 959–969.
6. Gerhäuser, C.: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. European Journal of Cancer **41**, 2005, 1941–1954.
7. Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M., Weber, G.: Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep. **22**, 2003, 210–217.
8. Krofta, K., Poustka, J., Hajslová, J.: Contents of prenylflavonoids in Czech hops and beers. Proc. 1st IS on Humulus. Acta Hort. (ISHS) **668**, 2005, 201–206.
9. Matoušek, J.: „Ozdravné“ pivo. Kvasny Prum. **47**, 2001, 330–332.
10. Matoušek, J., Novák, P., Bříza, J., Patzak, J., Niedermeierová, H.: Cloning and characterisation of *chs*-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science **162**, 2002, 1007–1018.
11. Matoušek, J., Novák, P., Patzak, J., Bříza, J., Krofta, K.: Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of „medicinal hops“. Rostlinná výroba **48**, 2002, 7–14.
12. Matoušek, J., Vrba, L., Novák, P., Patzak, J., De Keukeleire, J., Škopek, J., Heyerick, A., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D.: Cloning and molecular analysis of the regulatory factor HiMyb1 in hop (*Humulus lupulus* L.) and the potential of hop to produce bioactive prenylated flavonoids. J. Agric. Food Chem. **53**, 2005, 4793–4798.
13. Matoušek, J., Vrba, L., Pešina, K., Matoušková, J., Orctová, L., Heyerick, A., De Keukeleire, D., Baulcombe, D.: Myb biotechnology for production of anticarcinogenic prenylflavonoids: factor PAP 1 from *A. thaliana* co-activates transcription of *chs\_H1* gene from hop. Book of Abstracts in: Bříza, J., Pavingerová D., Špak J. (eds), 6th International Symposium in the Series, Recent Advances in Plant Biotechnology, From Laboratory to Business, s. 27, České Budějovice, Czech Republic, Sept. 12–16, 2005.
14. Milligan, S. R., Kalita, J., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keukeleire, D.: Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **83**, 1999, 2249–2252.
15. Miura, Y., Hosono, M., Oyamada, C., Odai, H., Oikawa, S., Kondo, K.: Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPAR alpha activations in C57BL/6 mice. British Journal of Nutrition **93**, 2005, 559–567.
16. Novák, P., Matoušek, J., Bříza, J.: Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulus lupulus*. Biol. Plant. **46**, 2003, 375–381.
17. Novák, P., Krofta, K., Matoušek, J.: Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression. Biologia Plantarum **50**, 2006, 48–54.
18. Nozawa, H., Nakao, W., Zhao, F., Kondo, K.: Dietary supplement of isohumulones inhibits the formation of aberrant crypt foci with a concomitant decrease in prostaglandin E2 level in rat colon. Molecular Nutrition and Food Research **49**, 2005, 772–778.
19. Okada, Y., Ito, K.: Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). Biosci. Biotechnol. Biochem. **65**, 2001, 150–155.
20. Pepper, M. S., Hazel, S. J., Humpel, M., Schleuning, W. D.: 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. J. Cell. Physiol. **199**, 2004, 98–107.
21. Possemiers, S., Heyerick, A., Robbens, V., De Keukeleire, D., Verstraete, W.: Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. J. Agric. Food Chem. **53**, 2005, 6281–6288.
22. Rong, H. J., Boterberg, T., Maubach, J., Stove, C., Depypere, H., Van Slambrouck, S., Serreyn, R., De Keukeleire, D., Mareel, M., Bracke, M.: 8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells. Eur. J. Cell Biol. **80**, 2001, 580–585.
23. Vrba, L., Škopek, J., Füssy, Z., Matoušek, J.: Analysis of oligofamily of *chs\_H1* genes from hop. Book of Abstracts in: Bříza, J., Pavingerová D., Špak J. (eds), 6th International Symposium in the Series, Recent Advances in Plant Biotechnology, From Laboratory to Business, s. 27, České Budějovice, Czech Republic, Sept. 12–16, 2005.
24. Yajima, H., Noguchi, T., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Tsuboyama-Kasaka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., Kondo, K.: Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents. International Journal of Obesity **29**, 2005, 991–997.