

Summary

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common infections, mainly caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). To date, UTIs are treated with antibiotics, leading to the problem of resistances. An innovative approach for prevention of UTIs is the development of inhibitors of bacterial adhesion to bladder cells. Fruits of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) are traditionally used to avert UTIs, an antiadhesive mode of action is discussed in literature.

To investigate potential antiadhesive effects and the underlying mechanisms Cranberry extract Q (CDE-Q) from the fruits of *V. macrocarpon* was investigated. The composition of CDE-Q was characterized by LC-MS studies. CDE-Q inhibited under *in vitro* conditions the bacterial adhesion of UPEC strain UTI89 (IC₅₀: 217 µg/mL) and *E. coli* strain 2980 (IC₂₅: 368 µg/mL) to human T24 bladder cells and the adhesion of UPEC strain CFT073 to A498 kidney cells (IC₅₀: 606 µg/mL) in a concentration-dependent manner. The effect against FimH-dominated strain UTI89 was more pronounced than against strain 2980, not expressing FimH, but being PapG-dominated.

To transfer this promising *in vitro* results to *in vivo* conditions, an ethics committee-approved biomedical study was performed. Urine samples from 16 volunteers (8 ♂, 8 ♀) consuming CDE-Q for 7 days (900 mg /day) were analyzed for potential antiadhesive activity against UPEC by *ex vivo* experiments. Results indicated significant inhibition of adhesion of UPEC strain UTI89 to human T24 bladder cells. Subgroup analysis proofed significant inhibition of bacterial adhesion in case of urine samples obtained from male volunteers (43 % ± 21 % inhibition after 7 days of Cranberry intake) while female urines did not influence the bacterial attachment to the host cells. Differences between the antiadhesive capacities of urine samples from male/female volunteers were significant.

To investigate if the observed antiadhesive effect of urine after CDE-Q consumption was due to an effect on the bacterial gene expression, transcriptome of UPEC strain UTI89 after 2 h treatment with pooled urine from Cranberry-treated volunteers was analyzed by Next Generation Sequencing (NGS). Data obtained and analyzed by bioinformatic methods indicated that the transcriptome was unaffected by Cranberry metabolites.

To elucidate whether the antiadhesive activity of the urine after CDE-Q ingestion was based on a direct interaction with bacterial type 1 adhesins (FimH), an *in vitro* FimH assay was performed by the use of a recombinantly expressed FimH-lectin domain. The tests showed that the urine after CDE-Q consumption inhibits FimH stronger than the control urine in case of urine samples obtained from male volunteers. Urine samples obtained from female volunteers did not inhibit FimH.

The activity of the control urine towards FimH was attributed to Tamm-Horsfall protein (THP, syn. Uromodulin), since it is known that THP, a highly mannosylated glycoprotein, interacts with FimH. This leads to a decreased interaction of FimH with uroplakin, an urothelial membrane protein. Analysis of the urine samples showed increased levels of THP in the active samples. Inhibition of bacterial adhesion by the urine samples was correlated with the respective amount of THP. From these data it was concluded that the antiadhesive effect of Cranberry after oral intake is not only related to the direct inhibition of bacterial adhesins by extract compounds but is much more due to an induction of antiadhesive THP in the kidney.

LC-MS/MS study of the urine was performed to correlate Cranberry-related metabolites with the antiadhesive effects *via* multivariate data analysis. The correlation of the MS data with the biological data hinted at substances that are not Cranberry-associated metabolites.

To figure out which Cranberry-associated compounds show antiadhesive properties, 105 substances were screened on a potential antiadhesive activity against UPEC. The experiments revealed strong antiadhesive activity for flavonoids. Therefore, quantitative structure relationship (QSAR) models for predicting the antiadhesive activity of flavonoids were created, validated and evaluated with experimental data. The excellent results from internal and external predictions showed that this QSAR model can be used to predict the antiadhesive activity of further, yet untested, flavonoids, which can then be retrieved for testing. Using this system, permethylated flavonols from *Ageratum conyzoides* L., a traditionally used plant against UTIs, were predicted by the model; 5'-Methoxy-nobiletin was chosen for testing and experimental data proved the predicted activity.

Overall, the present work shows in which way Cranberry fruit extract effects a pleiotropic mode of action against bacterial adhesion. On the one hand Cranberry metabolites interact directly with the bacteria and on the other hand the endogenic renal excretion of THP is increased.

Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen gehören zu den häufigsten Infektionen und werden hauptsächlich durch uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) verursacht. Harnwegsinfektionen werden antibiotisch behandelt, was zu Resistenzen führt. Ein innovativer Ansatz zur Prävention ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der bakteriellen Adhäsion. Cranberry-Früchte (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) werden traditionell zur Prophylaxe von Harnwegsinfektionen verwendet, ein antiadhäsiver Wirkungsmechanismus wird in der Literatur diskutiert.

In dieser Arbeit inhibierte der kommerziell erhältliche, mittels LC-MS charakterisierte Cranberry-Extrakt CDE-Q aus den Früchten von *V. macro-carpon* unter *in vitro*-Bedingungen die bakterielle Adhäsion des UPEC-Stammes UTI89 (IC₅₀: 217 µg/mL) und des *E. coli*-Stammes 2980 (IC₂₅: 368 µg/mL) an T24-Blasenzellen und die Adhäsion des UPEC-Stammes CFT073 an A498-Nierenzellen (IC₅₀: 606 µg/mL) konzentrationsabhängig. Der Effekt gegen den Typ 1-Adhäsine (FimH) exprimierenden Stamm UTI89 war größer als gegen den P-Pili-dominierten Stamm 2980, der kein FimH exprimiert.

Um diese vielversprechenden *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo*-Bedingungen zu übertragen, wurde eine von der Ethikkommission genehmigte biomedizinische Studie durchgeführt. Urinproben von 16 Freiwilligen (8 ♂, 8 ♀), die 7 Tage lang CDE-Q (900 mg /Tag) konsumierten, wurden in *ex vivo*-Experimenten auf mögliche antiadhäsive Wirkungen gegen UPEC untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Inhibition der Adhäsion des UPEC-Stammes UTI89 an humane T24-Blasenzellen. Die Subgruppenanalyse ergab eine signifikante Hemmung der Adhäsion bei Urinproben, die von männlichen Freiwilligen gewonnen wurden (43 % ± 21 % Inhibition nach 7 Tagen CDE-Q-Konsum), während Urin weiblicher Testpersonen die Adhäsion der Bakterien nicht beeinflusste. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Wirkung erwiesen sich als signifikant.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete antiadhäsive Wirkung von Urin nach CDE-Q-Konsum auf eine Wirkung auf die bakterielle Genexpression von UPEC UTI89 zurückzuführen war, wurden eine Transkriptomanalyse nach Inkubation der UPEC in gepooltem Urin von CDE-Q-behandelten Freiwilligen mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) durchgeführt. Die Daten zeigten, dass das bakterielle Transkriptom durch Cranberry-Metabolite kaum beeinflusst wurde.

Um zu klären, ob die antiadhäsive Aktivität des Urins nach CDE-Q-Einnahme auf

einer Wechselwirkung mit FimH beruht, wurde ein *in vitro*-FimH-Assay durchgeführt. Die Tests zeigten, dass Urinproben von männlichen Probanden nach CDE-Q-Konsum FimH stärker hemmten als der Kontrollurin. Von weiblichen Probanden erhaltene Urinproben hemmten FimH nicht stärker als der Kontrollurin.

Die Aktivität des Kontrollurins gegenüber FimH ließ sich auf Tamm-Horsfall Protein (THP) zurückführen, da bekannt ist, dass THP, ein stark mannosyliertes Glykoprotein, mit FimH interagiert. Dies hat eine verminderte Interaktion von FimH mit dem urothelialen Rezeptorprotein Uroplakin zur Folge. Die Analyse der Urinproben ergab erhöhte Mengen an THP in den aktiven Proben. Die Inhibition der Adhäsion durch die Urinproben wurde mit der jeweiligen THP-Menge korreliert. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass die antiadhäsive Wirkung von CDE-Q nach oraler Einnahme neben der Hemmung bakterieller Adhäsine auf einer Induktion von antiadhäsivem THP in der Niere beruht.

Eine LC-MS / MS-Studie des Urins wurde durchgeführt, um die mit Cranberry-assoziierten Metaboliten mit den antiadhäsiven Wirkungen über multivariate Datenanalyse zu korrelieren. Die Korrelation der MS-Daten mit den biologischen Daten ergab Verbindungen, die keine Cranberry-assoziierten Metabolite darstellten.

Um herauszufinden, welche Cranberry-assoziierten Substanzen antiadhäsive Eigenschaften zeigen, wurden 105 Substanzen auf eine potenzielle antiadhäsive Aktivität gegen UPEC untersucht. Die Experimente zeigten eine starke Aktivität für Flavonoide. Daher wurden quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungs (QSAR)-Modelle zur Vorhersage der antiadhäsiven Aktivität von Flavonoiden erstellt, validiert und die Vorhersagbarkeit mit experimentellen Daten bewertet. Die hervorragenden Ergebnisse aus internen und externen Vorhersagen zeigten, dass das QSAR-Modell verwendet werden kann, um die antiadhäsive Aktivität weiterer, ungetesteter, Flavonoide vorherzusagen. Daher wurden permethylierte Flavonoide aus der traditionell bei Harnwegsinfektionen verwendeten Pflanze *Ageratum conyzoides* L. durch das Modell vorhergesagt. 5'-Methoxynobiletin wurde zur Testung ausgewählt und die experimentellen Daten bewiesen die vorhergesagte Aktivität.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass Extrakte aus Cranberry-Früchten einen pleiotropen Mechanismus gegen die bakterielle Adhäsion bewirken. Cranberry-Metabolite interagieren direkt mit den Bakterien, zusätzlich wird die endogene renale THP-Ausscheidung erhöht.