

Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen (HWI) zählen weltweit zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten und haben jedes Jahr hunderttausende Todesfälle zur Folge. Die hohe Inzidenz, insbesondere unter Frauen, stellt die Gesundheitssysteme weltweit vor große Herausforderungen und erzeugt enorme Behandlungskosten. Besonders im Hinblick auf die zunehmende Resistenz gegenüber Antibiotika wird deutlich, dass die Entwicklung alternativer oder adjuvanter Behandlungsmöglichkeiten unverzichtbar ist. Auf diesem Gebiet zeigen Arzneipflanzen großes Potenzial, jedoch basiert deren Nutzung häufig auf traditionellen Überlieferungen, wobei die pharmakologische und klinische Evidenz nicht ausreichend durch entsprechende Studien rationalisiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Arzneipflanzen untersucht, die häufig in Kombinationen für Blasen- und Nierentees, z.B. im Rahmen von Standardzulassung, eingesetzt werden. Hierbei wurden sowohl der Einfluss der Extraktionsmethode auf die Zusammensetzung der Extrakte als auch funktionelle Aspekte der Zubereitungen gegenüber uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC), insbesondere im Hinblick auf potenzielle synergistische Effekte, geprüft. Hierfür wurden Extraktmischungen untersucht, die entweder durch eine kombinierte Extraktion mehrerer Arzneipflanzen oder durch Mischung separat hergestellter Einzelextrakte gewonnen wurden. Für eine Kombination S₁, basierend auf der Standardzulassung für Blasen- und Nierentee I, die aus Birkenblättern, Hauhechelwurzel, Queckenwurzelstock und Riesengoldrutenkraut zusammengesetzt ist, konnten signifikante Unterschiede gegenüber UPEC zwischen der separaten Mischung S_{1S} und der kombinierten Mischung S_{1C} festgestellt werden. Beide Extrakte zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keine Hemmung der bakteriellen Proliferation von UPEC und der Viabilität von T24-Blasenzellen. Lediglich die kombiniert extrahierte Mischung S_{1C} zeigte in einer Konzentration von 330 µg/mL eine reproduzierbare Hemmung der Typ-1-Fimbrien-Aktivität von UPEC UTI89, während die Mischung separater Extrakte S_{1S} keine Wirkung zeigte. Mittels HPLC-MS wurde für S_{1C} eine Anreicherung von malonylierten und acetylierten Dammaran-Triterpenen aus den Birkenblättern festgestellt. In systematischen Extraktionsversuchen ergaben sich Hinweise auf eine Saponin-vermittelte Anreicherung dieser Stoffgruppe durch eine Kombination von Birkenblättern und Riesengoldrutenkraut. Eine binäre Mischung der beiden Drogen führte ausschließlich bei kombinierter Extraktion zu einer Hemmung der Typ-1-Fimbrienaktivität und hierdurch zur verminderten Adhäsion von UPEC UTI89 an RT4-Blasenzellen. Die Theorie einer Saponin-vermittelten Solubilisation der Birkentriterpene konnte durch Extraktionsexperimente mit weiteren Saponin-reichen Drogen gestützt werden. Hierbei ergaben sich Hinweise auf eine Korrelation zwischen Solubilisationseffizienz und Struktur bzw. Gehalt der Saponine.

Die Wirkung der Birkeninhaltsstoffe gegenüber UPEC wurde mit Hilfe einer Dammaran-angereicherten Fraktion DEF näher untersucht. Die phytochemische Charakterisierung dieser Fraktion ergab einen hohen Gehalt malonylierter sowie acetylierter Dammarane. Genexpressionsanalysen wichtiger UPEC-Virulenzfaktoren belegten bei Einsatz von 100 µg/mL DEF eine signifikante und zeitabhängige Hemmung der Expression der mit Typ-1-Fimbrien assoziierten Gene *fimC*, *fimD* und *fimH* sowie von *csqA*, welches für einen Baustein von S-Fimbrien codiert. Dieser Effekt trat nach einer Inkubationszeit von 6 bis 10 Stunden auf. Nach 10-stündiger Inkubation konnte zudem eine gesteigerte Expression des Motilitätsgens *fliC* und des P-Pili-Gens *papGIII* beobachtet werden. Der Einfluss von DEF auf die Typ-1-Pili und P-Fimbrien konnte durch Hefe- und Hämagglutinationsassays bestätigt werden, während die Aktivität der S-Fimbrien im Hämagglutinationsassay unverändert blieb. Insgesamt zeigte DEF (25 – 100 µg/mL) eine konzentrationsabhängige, starke Hemmung der Adhäsion von UPEC an Wirtszellen in 2D-Adhäsionsassays. Diese Wirkung konnte zudem in einem mehrschichtigen 3D-Infektionsmodell auf Basis von RT4-Sphäroiden, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und etabliert wurde, bestätigt werden. Der Einfluss von DEF auf die Biosynthese von Typ-1-Fimbrien auf Proteinebene wurde mittels Western Blot, einer durchflusszytometrischen Analyse nach Fluoreszenzmarkierung von FimH sowie durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen genauer charakterisiert. Im Rahmen einer zeitabhängigen Proteomuntersuchung ergaben sich Hinweise auf einen Stresszustand der Pathogene und eine Beeinflussung der Persistenzmechanismen und Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika durch Behandlung mit DEF. Ein durch DEF ausgelöster Stress konnte zudem durch eine gesteigerte Biofilmbildung beobachtet werden. Darüber hinaus führte DEF auch zu einer gesteigerten Motilität mehrerer UPEC-Stämme. Insgesamt ergaben die mechanistischen Untersuchungen, dass DEF eine Verschiebung vom adhäsiven zu einem motilen UPEC-Phänotyp erzeugt. Diese Wirkungen machen Birkenblätter zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung unterstützender oder prophylaktischer Therapeutika gegen Harnwegsinfektion.

Da sich Aktivitätsunterschiede zwischen den eingesetzten Chargen offizineller Birkenblätter zeigten, folgte ein systematischer Vergleich der Blätter von *B. pendula* und *B. pubescens*, die beide vom EuAB 11.0 als Quelle für die Droge *Betulae folium* zugelassen sind. Hierbei ergaben sich analytisch deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung hydroethanolischer Extrakte beider Drogen. Insbesondere konnten relevante Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Flavon- und Triterpenmusters ermittelt werden. Diese hatten jedoch keine gravierenden Unterschiede im Hinblick auf antiadhäsive Wirkungen gegenüber UPEC zur Folge. Allerdings konnte ein positiver synergistischer Effekt durch eine kombinierte Extraktion bei Testung der Kombination S1 nur mit Blättern der Hängebirke

festgestellt werden, der sich durch einen antiadhäsiven Effekt des Extraktes S1C gegenüber UPEC zeigte. Bei der Verwendung von Moorbirkenblättern resultierte kein derartiger Effekt.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit das hohe Potenzial von Drogenkombinationen zur ergänzenden Therapie von Harnwegsinfektionen. Dabei hat bereits der Extraktionsprozess große Bedeutung für die Wirkung der jeweiligen Zubereitungen. Zudem konnte festgestellt werden, dass Birkenblätter eine Vielzahl hochaktiver Verbindungen enthalten, die in Zukunft isoliert und nähergehend untersucht werden sollten.

Summary

Urinary tract infections are one of the most common infectious diseases and account for multiple thousand deaths every year. Especially among women there is a high incidence which poses a major challenge for the healthcare systems around the globe and leads to high treatment expenses. Particularly the rise of antimicrobial resistance makes the development of alternative or additive therapeutics indispensable. Medical plants possess high potential for this field. However, their use is mostly based on a traditional use whereby pharmacological and clinical evidence is not sufficiently rationalized by appropriate studies.

Within the scope of this thesis, medicinal plants that are frequently used in combinations for bladder and kidney teas, e.g. as official complex standard formulations, were examined. For this, the impact of the extraction method on the composition of resulting extracts as well as functional aspects of the preparation against uropathogenic *E. coli* (UPEC) were analyzed, especially regarding possible synergistic effects. Extract mixtures were either prepared by a combined extraction of multiple herbal materials or by mixing separately prepared extracts of single plants. For a combination S1, which is based on the standard formulation for bladder and kidney tea I and consists of birch leaves, roots from spiny restharrow, rhizome of couch grass and aerial material of giant goldenrod, significant differences between the separate extract S1S and the combined extract S1C regarding their activity against UPEC were detected. In the used concentration neither of the two extracts showed an impact on bacterial proliferation of UPEC or viability of T24 bladder cells. Only the preparation S1C, obtained by combined extraction of the plant material, showed a significant inhibition of type-1-fimbriae activity of UPEC UTI89 at a concentration of 330 µg/mL, while the separate mixture S1S had no effect. By LC-MS analysis an enrichment of malonylated and acetylated dammarane triterpenes from birch leaves was detected in S1C. Systematic extraction experiments led to the finding of a saponin dependent enrichment of the group of natural compounds by the combination of birch leaves and aerial material of giant goldenrod. A binary mixture of these materials led to an inhibition of type-1-fimbriae activity and thus to a decreased adhesion of UPEC to RT4 bladder cells only in the case of a combined extraction process. The theory of a saponin-based solubilization of birch triterpenes was further supported by additional extraction experiments with saponin-rich drugs. This resulted a correlation between solubilization efficiency and structure or content of the saponins.

The effects of birch extracts were studied in more detail with a dammarane-enhanced-fraction DEF. Characterization of the extract yielded a high content of malonylated and acetylated dammaranes. Gene expression analysis of important UPEC virulence factors after incubation with 100 µg/mL DEF clearly showed a significant and time dependent inhibition of type-1-fimbrial genes *fimC*, *fimD* and *fimH* as well as for *csgA*, a part of S-fimbriae. This effect occurred after incubation for 6 to 10 hours. Moreover, after 10 hours an increased expression

of motility gene *fliC* and P-pili adhesin *papGIII* was observed. The influence on type-1- and P-fimbriae was confirmed by yeast- and hemagglutination assays, while activity of S-fimbriae in a hemagglutination assay was not influenced. Overall, DEF (25 – 100 µg/mL) led to a concentration dependent decrease of UPEC adhesion to host cells in 2D adhesion assays. In addition, this effect was confirmed by use of a multi-layered 3D infection model based on RT4 cells spheroids, which has been developed and established in the scope of this thesis. The influence of DEF on the biosynthesis of type-1-fimbriae was analyzed by western blot, flow cytometry and atomic force microscopy. By time dependent proteome analysis indications for increased stress and influence on persistence mechanisms as well as antibiotic susceptibility triggered by incubation with DEF emerged. Raised stress levels could also be observed by increased biofilm formation. Moreover, DEF led to higher motility of multiple UPEC strains. Overall, there is sufficient evidence that DEF leads to a change from an adhesive to a motile UPEC phenotype. This effect makes birch leaves a promising candidate for the development of additive or prophylactic therapeutics against urinary tract infections.

Because of differences in the activity between different batches of officinal birch leaves, a systematic comparison of leaves from *B. pendula* and *B. pubescens* was conducted, as both are authorized as a source for the herbal material *Betulae folium*, according to European Pharmacopeia 11.0. Analytically clear differences were observed for purified hydroethanolic fractions. Especially relevant qualitative and quantitative differences were detected concerning the extracts' content of flavones and triterpenes. However, these differences did not lead to significant differences regarding the antiadhesive properties against UPEC. Though, a positive synergistic effect for the combined extraction of the combination S1 was only detected while using leaves of *B. pendula*, which resulted in an antiadhesive effect of S1C against UPEC. The use of leaves of *B. pubescens* did not lead to an active extract S1C.

In summary, this thesis indicates the high potential of plant combinations for additive treatment of urinary tract infections. Thereby already the extraction process has a big impact on the effects of the respective preparations. Birch leaves were found to contain a plethora of highly active compounds, which should be isolated and analyzed in detail by future studies.