



# Milk oligosaccharides and plant polyphenols as anti-adhesive agents against human serious pathogen *Neisseria meningitidis*

Carina Tikkanen-Kaukanen, FT, Dosentti

Tutkimusjohtaja  
Helsingin yliopisto  
Ruralia-instituutti

Tutkimusalajohtaja  
Luomuinstituutti

# Antimikrobiiresistenssi

- Maailmanlaajuinen kaikkia koskettava, olemassa oleva ongelma
- Yhtä vakava kuin ilmastonmuutos (Laxminaryan et al Lancet, 2016)
- Ongelma myös:

Antibioottien ja rokotteiden saavuttamattomuus ja kalleus etenkin kehitysmaissa (yli 1 milj lasta pneumonia/sepsis kuolee vuosittain)

Uudet antibiootit – ei näköpiirissä resistenttejä bakteereja vastaan

Vaihtoehtoiset ennaltaehkäisevät menetelmät

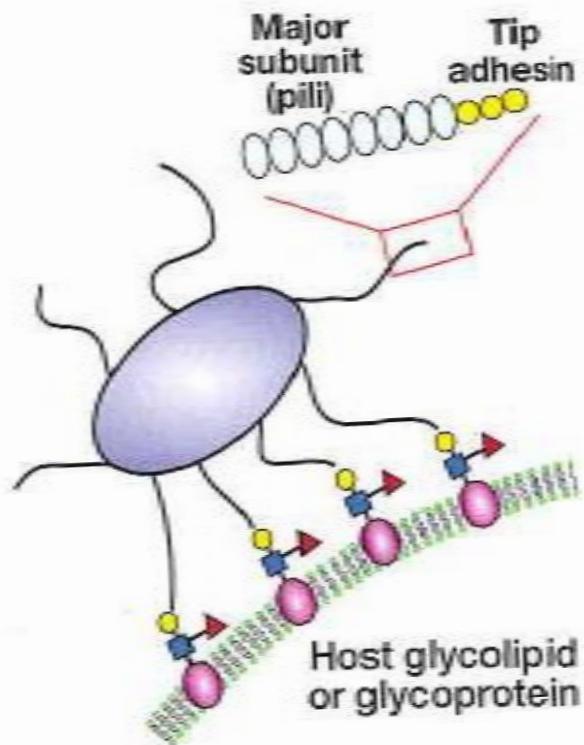
**- anti-adheeooterapia (bakteerien tarttumisen esto)**

# Esitelmän sisältö

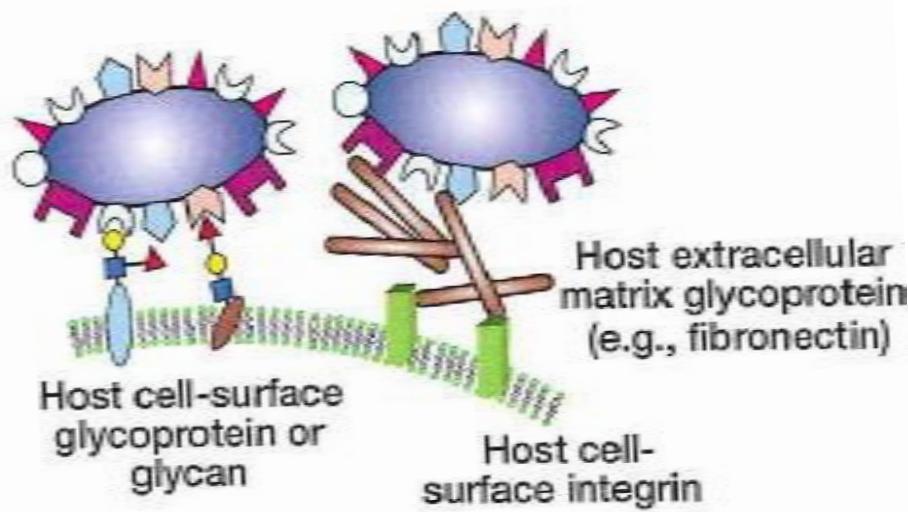
- Bakteerien tarttuminen (adheesi) ja antiadheesioterapia
- *Neisseria meningitidis* taudinaiheuttajana
- Antiadheesiotutkimus meningokokki-bakteerille kehitetyissä mallisysteemeissä
- Maidon oligosakkaridit ja kasvien polyfenolit antiadheesioterapiassa *Neisseria meningitidis*-bakteeria vastaan

# Bakteeriadheesi

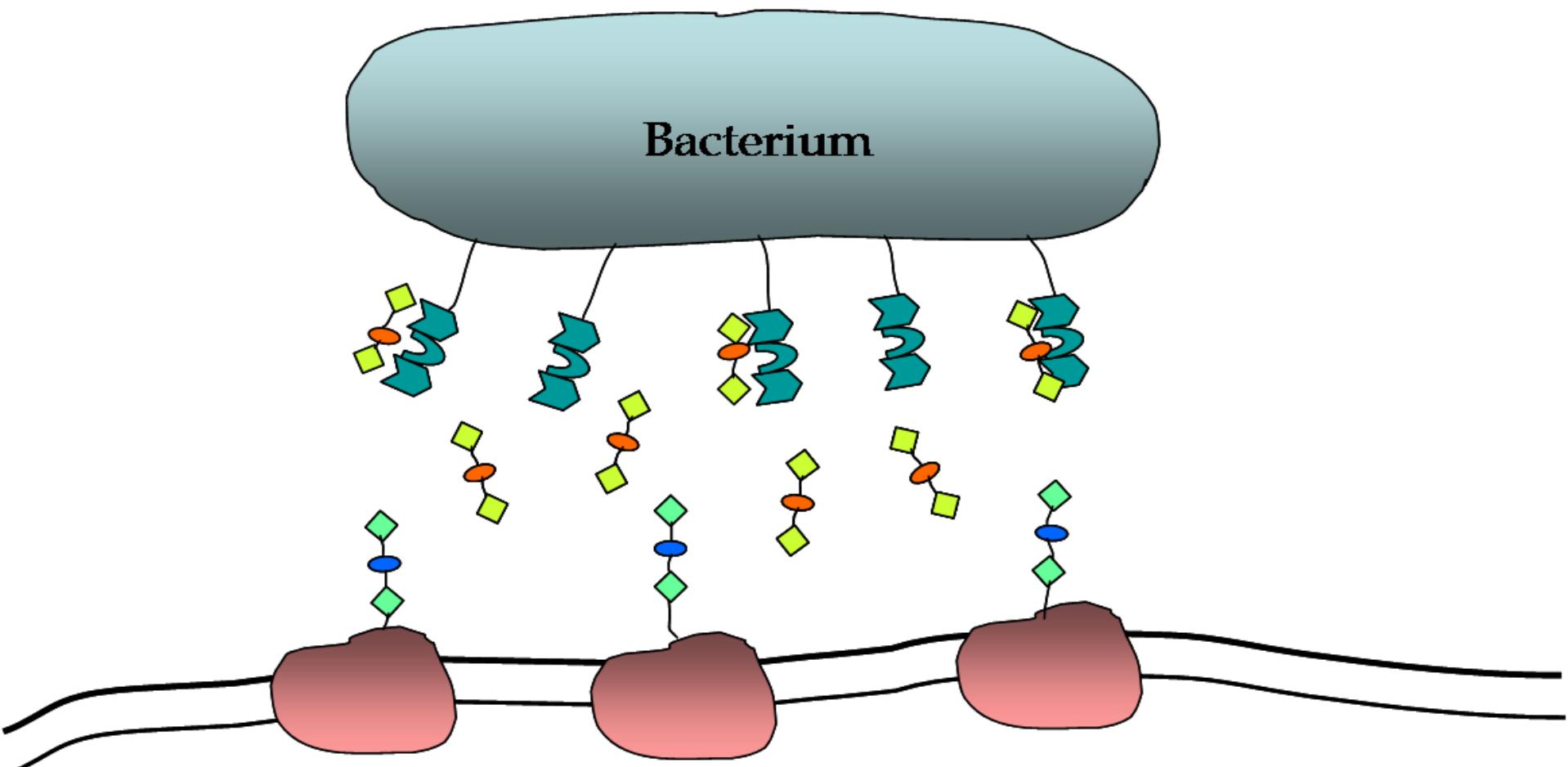
a) Pili or Fimbriae



b) Afimbrial Adhesins



# Antiadhesioterapia



**Host cell**

A. Kleino according to Zopf and Roth, Lancet 1996

# *Neisseria meningitidis*

- Meningiitti
- Sepsis
  - Kolonisaatio ihmisen nenäielun alueelle
  - Ainoa paikka, jossa meningokokki säilyy luonnossa

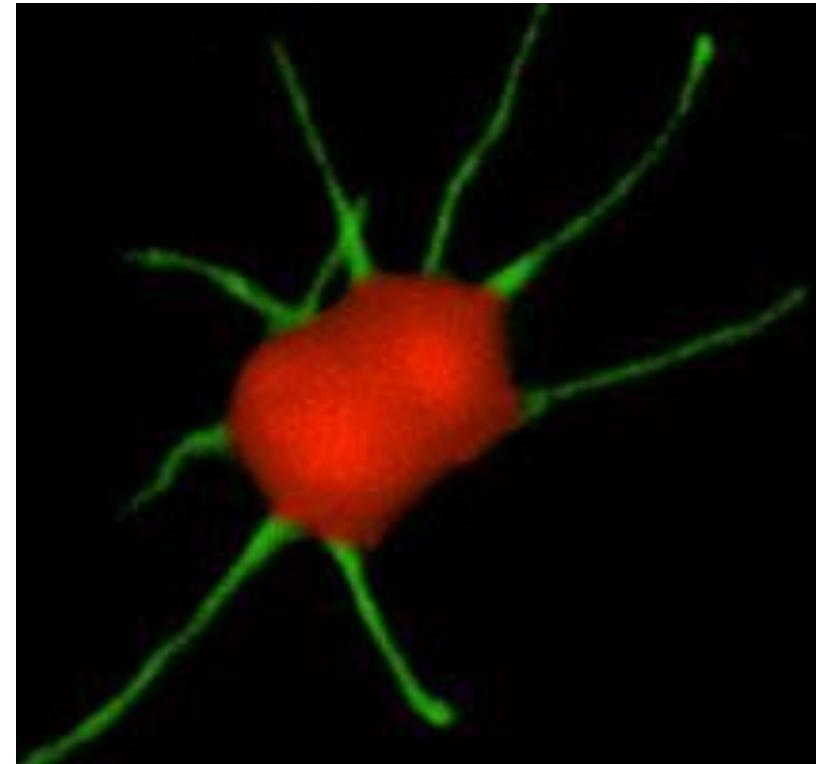


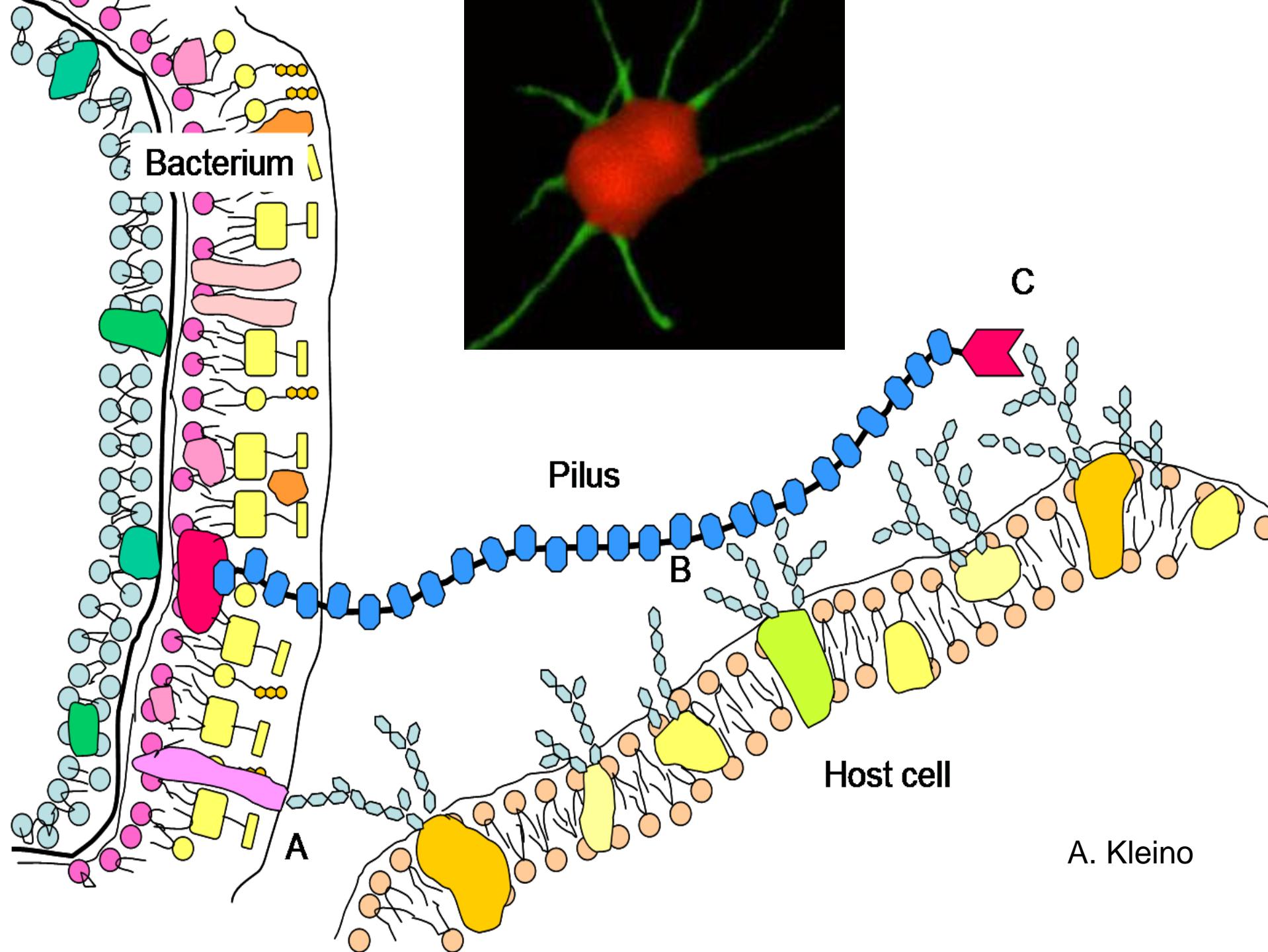
# *Neisseria meningitidis* -infektiot

- 13 erilaista serotyhmää; joista ryhmät A, B, C, W135 ja Y aiheuttavat 90 % vaikeista meningokokki –infektioista.
- Serotyppien A, C, Y and W135 aiheuttamat infektiot voidaan estää rokottamalla.
- Serotyppiä B vastaan rokotteet 10-25 vuotiaille
- *N. meningitidis* kolonisoituu nenänieluun noin 10 %:lla terveillä ihmisillä.
- Tarttumista välittävät tyyppi IV pilukset. Pilukset ovat pitkiä hiusmaisia rakenteita, jotka välittävät Gram-negatiivisten ja myös joidenkin Gram-positivisten bakteereiden adheesiota.
- *N. meningitidis* voi aiheuttaa meningiittiepidemioita. Erityisesti Saharan Afrikassa ja Aasiassa epidemiat ovat merkittävä terveysongelma

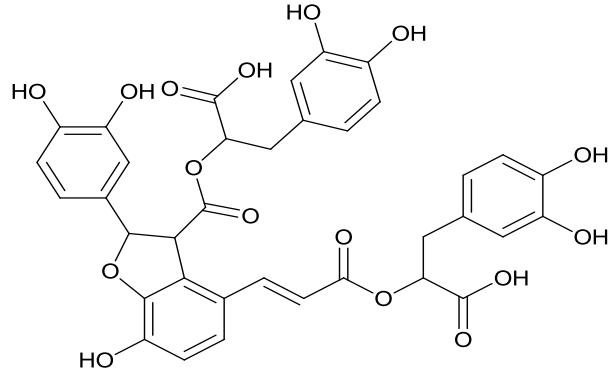
# Type IV pilus

- 1000-4000 nm filamentous structure,
- Two potential adhesins:
  - Pilin subunits (17-21 kDa) build up the type IV pilus
- PilC1 110 kD - tip located adhesin

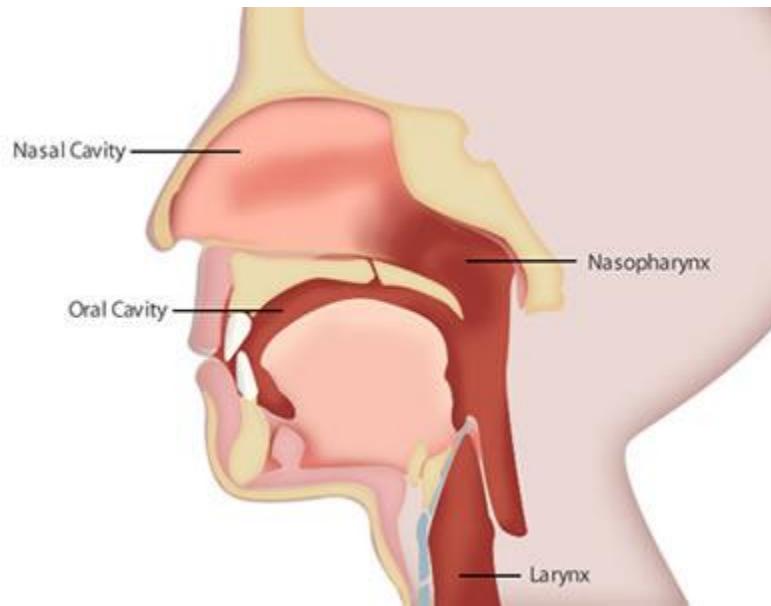




# Oma tutkimus



# Nenäielun alue tarttumiskohdeena



# Tutkimuksen vaiheet

Luonnonaineen fraktiointi ja puhdistaminen



**anti-adheesio-aktiivisuus**



Bioaktiivisten komponenttien molekulaarinen karakterisointi

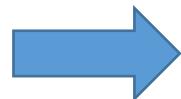


Kliininen koe

# Adheesio- ja anti-adheesio kokeet

## I Bakteerien tarttumista välittävien komponenttien, pilusten sitoutuminen

- glykoproteiineihin (kehitetty mallisysteemi)
- marjojen fenolisiin yhdisteisiin

 **Kuoppalevykoe**

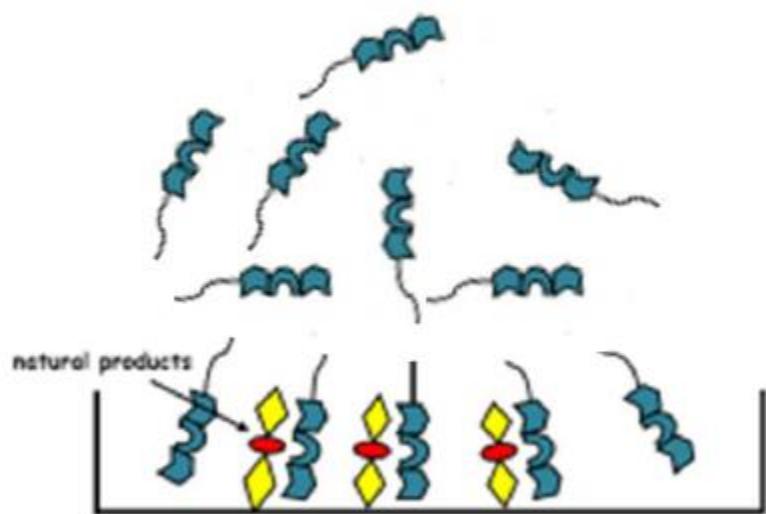
## II Sitoutumisen esto

 **Kuoppalevykoe**

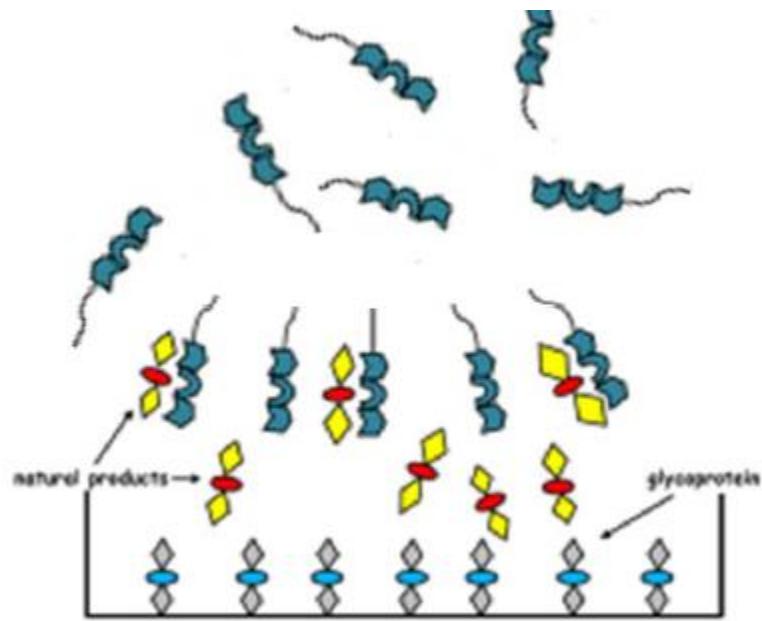
 **Täpläkoe**

 **Soluviljelykoe**

# Kuoppalevykokeet



A



B

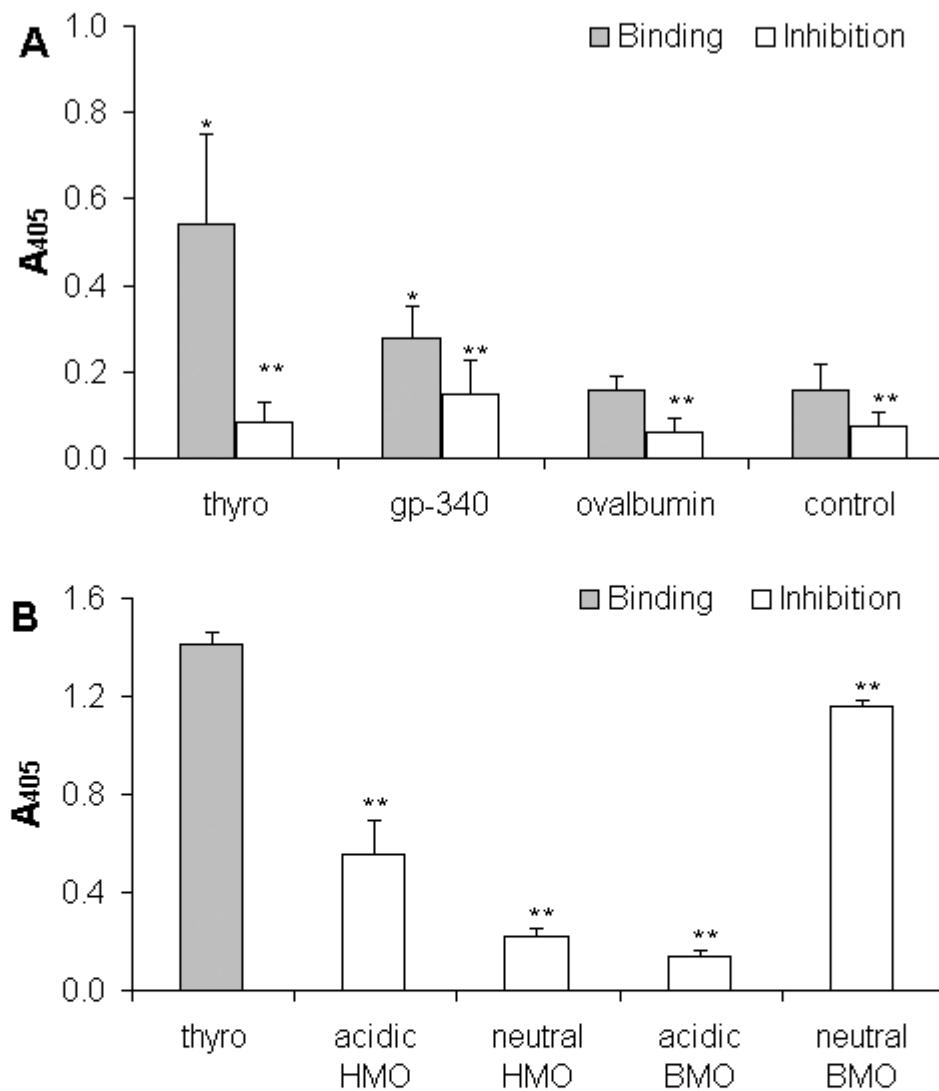
# Glycoproteins

- Hen ovalbumin and bovine thyroglobulin are commonly used for characterizing carbohydrate receptors for microorganisms
- Salivary agglutinin aggregates and adheres to several commensal and pathogenic microorganisms

Saliva represents the first line of defence

- **Bovine thyroglobulin (660 kDa)**
  - Contains two polypeptide chains
  - Approximately 10% of its mass carbohydrates
  - The glycans contain mannose, N-acetylglucosamine, galactose, fucose and sialic acid
- **Ovalbumin**
  - One oligosaccharide unit in its polypeptide chain
  - Mainly composed of mannose, GlcNAc, galactose
- **Salivary agglutinin**
  - About 25 % carbohydrate components of its total weight
  - Composed of galactose, fucose, mannose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and N-acetylneuraminic acid

# Carbohydrate Recognition of *N. meningitidis* Pili



# Bovine Milk OS vs Human Milk OS

- There are structural similarities among the oligosaccharides and glycoconjugates in bovine and human milk
- The main differences are the amount and pattern of oligosaccharides
- Human milk contains diverse and complex **neutral and acidic** oligosaccharide structures (5-13 mg/ml) (22mg/l in colostrum (200))
- Bovine milk contains fewer and less complexes OS than human milk and mainly sialylated (**acidic**), **mostly present in colostrum (40)**(0.7-12 mg/ml)

**Core structure of neutral human milk oligosaccharides**

[Gal(β1-3/4)GlcNAc(β1-]<sub>n=0-25</sub>3/6)Gal(β1-4)Glc

**Core structure of neutral milk oligosaccharides in cow milk**

Gal (β1-3/6)Gal(β1-4)Glc

# Human milk oligosaccharides as receptor analogues, inhibitors of pathogen adhesion

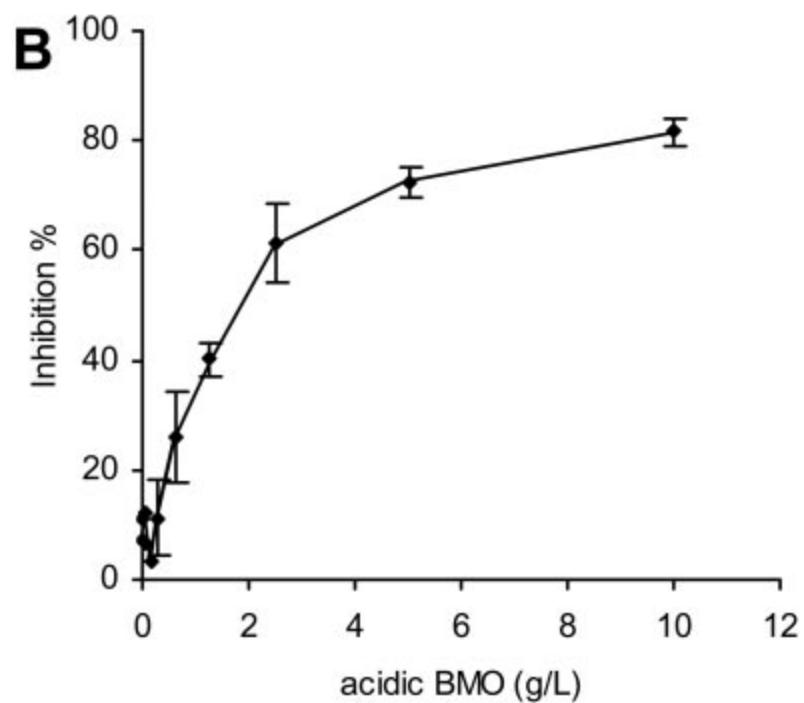
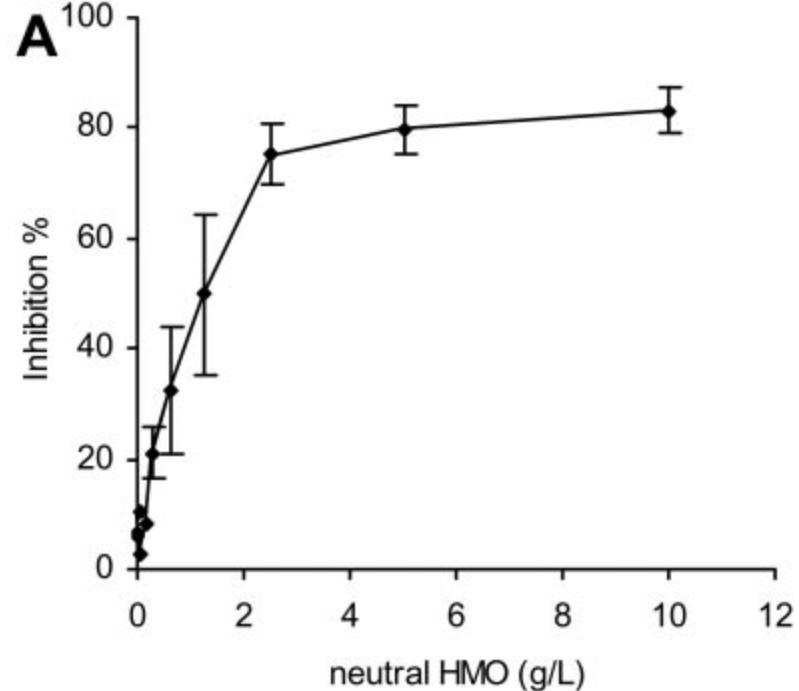
Receptor	Microbe	Disease
Neutral oligosaccharides	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	pneumonia, otitis media
Fucosylated oligosaccharides	<i>Campylobacter jejuni</i>	gastroenteritis, diarrhea
Gal β(1-4) GlcNAc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	various
Sialyl-lactose	<i>Helicobacter pylori</i>	gastritis, ulcers
	<i>Streptococcus sanguis</i>	endocarditis
	<i>Escherichia coli</i> entero- or uro-pathogenic	diarrhea or pyelonephritis, cystitis
	<i>Influenza virus</i>	flu
Sialylated glycoproteins (α2-3)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	pneumonia
Sialylated poly-N-acetyllactosamine		

# Bovine milk OS as antiadhesives

- Bovine colostrum oligosaccharides against *Campylobacter jejuni*, Lane et al 2013
- 3'sialyllactose against *Helicobacter pylori*, Parente et al 2003
- Enterotoxigenic *E.coli* from calves, Lane et al 2012

# Methods

- Fractionation of human and bovine milk to neutral and acidic oligosaccharides
- Isolation meningococcal pili
- Bovine thyroglogulin model in microter well binding assay

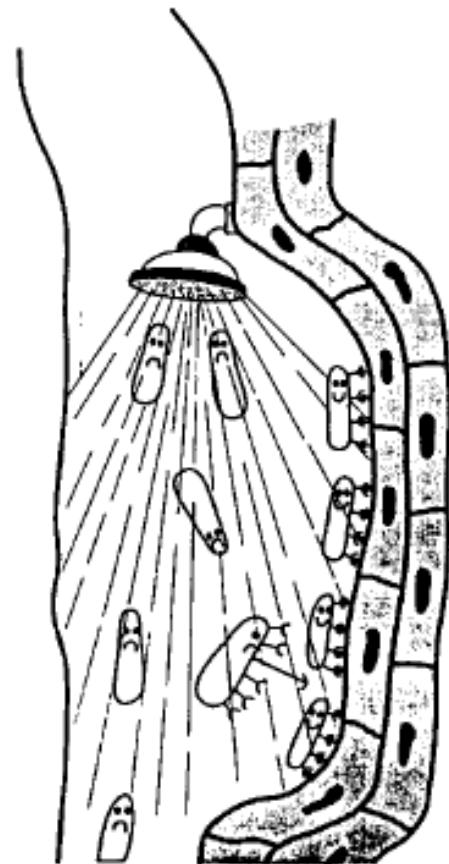


# Inhibitory activity

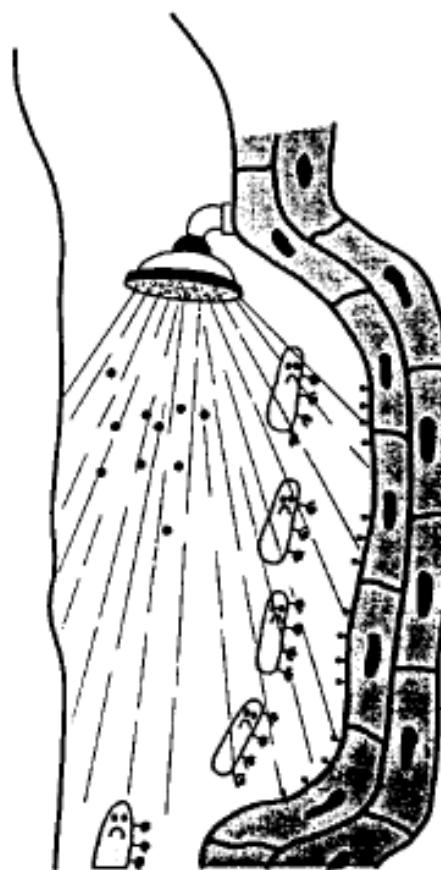
- Acidic bovine milk OS
- Inhibitory activity at 3-10g/l of 60-80%
- Neutral human milk OS
- Inhibitory activity at 2 g/l of 80%

# Antiadheesio

ADHESION PROTECTS INVADING  
MICROORGANISM FROM ELIMINATION  
BY NATURAL CLEANSING MECHANISMS

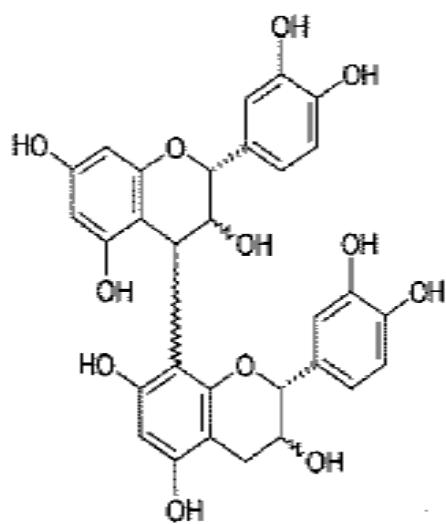


INHIBITORS OF ADHESION  
PREVENT INFECTION

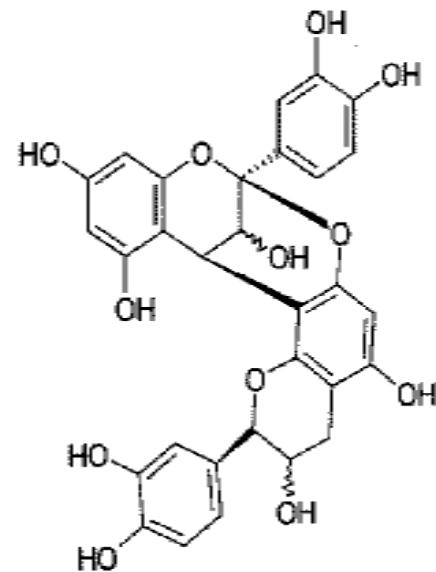


Dina Zafriri, Tel Aviv University, 1988

# Proantosyanidiinit A ja B marjoissa

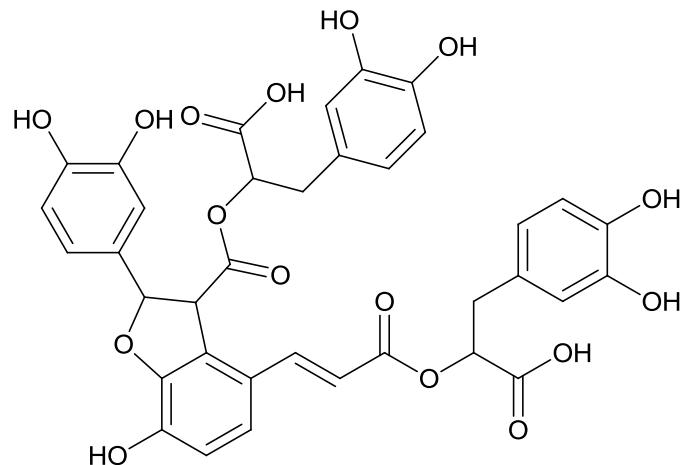


Dimer B

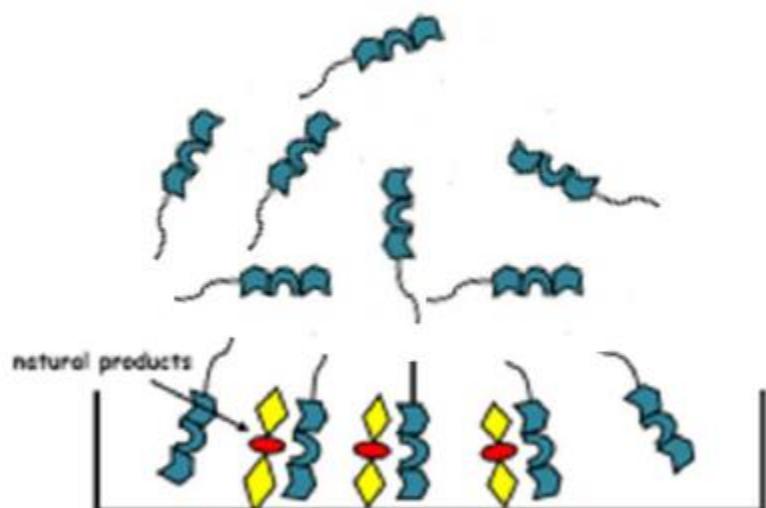


Dimer A

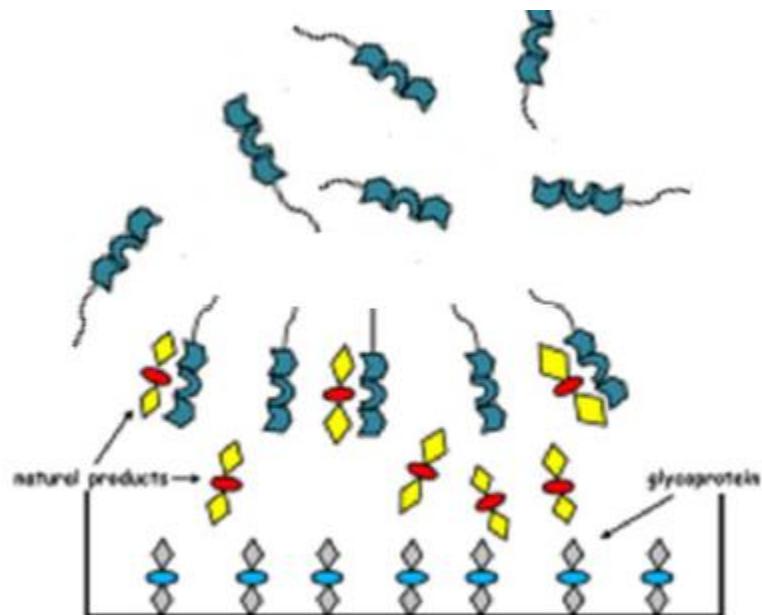
# Salvianolic Acid B *Salvia miltiorrhizaen* (kiinansalvia) juuresta



# Kuoppalevykokeet

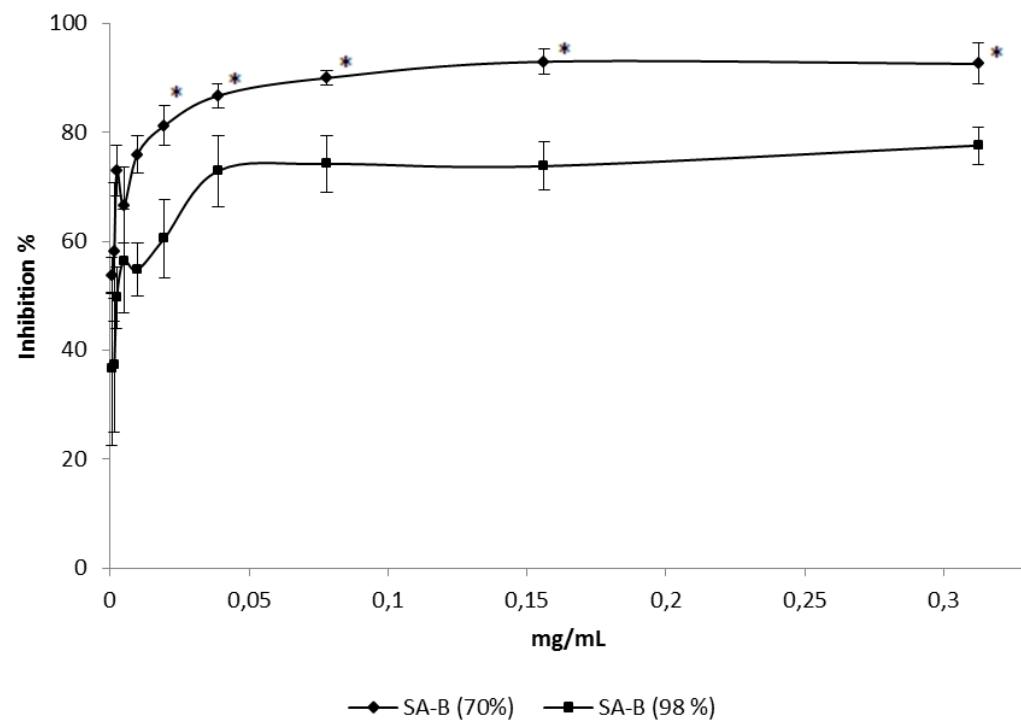


A



B

# Inhibition of meningococcal pili binding to bovine thyroglobulin by salvianolic acid B (98% and 70% purity)

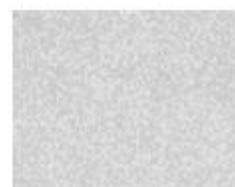


# DOT assay

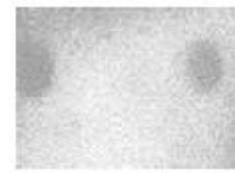
Inhibition of meningococcal pili binding to HEC-1B  
human epithelial cells by SA-B



**SA-B**



**Control A**

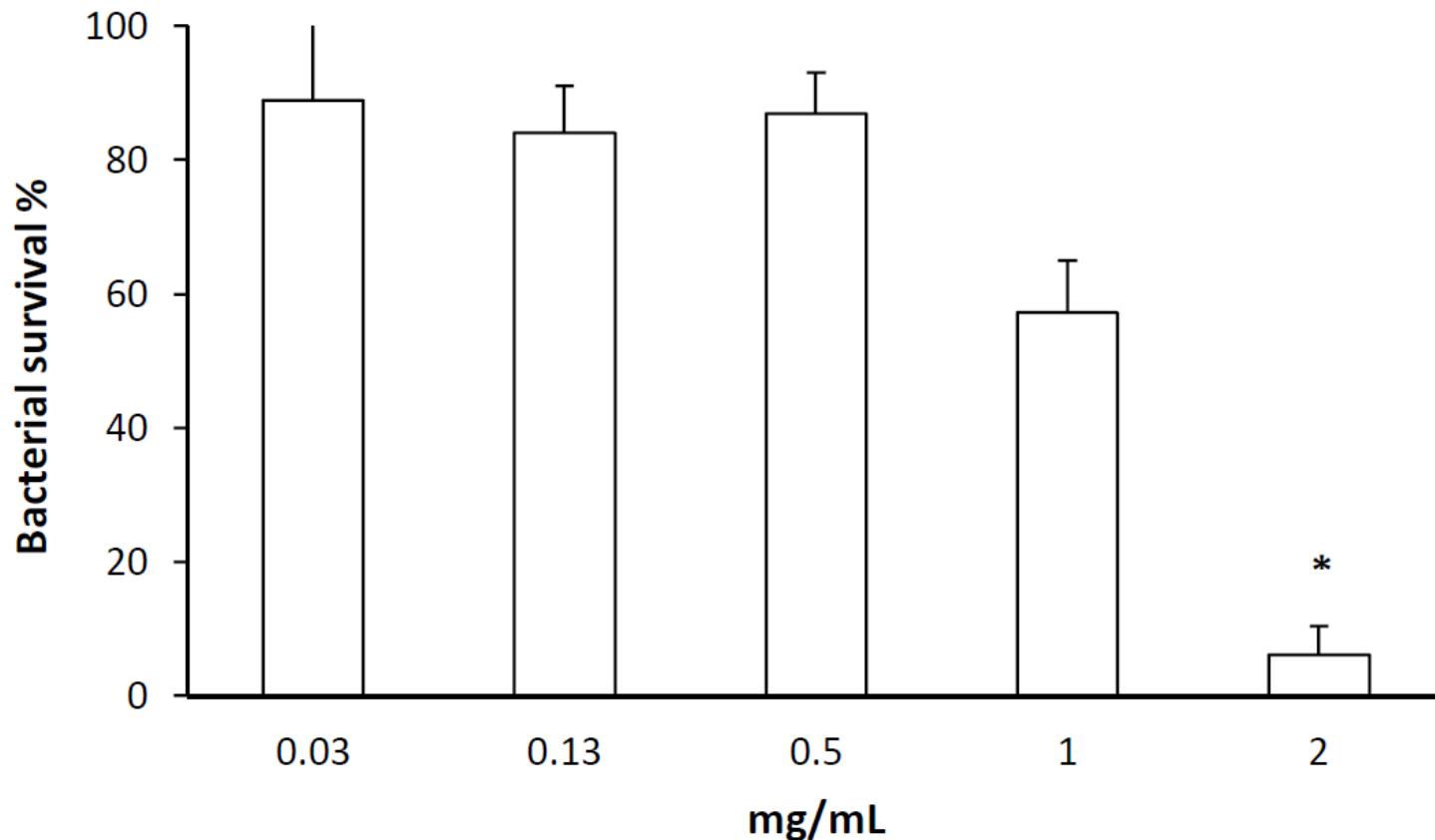


**Positive control**



**Control B**

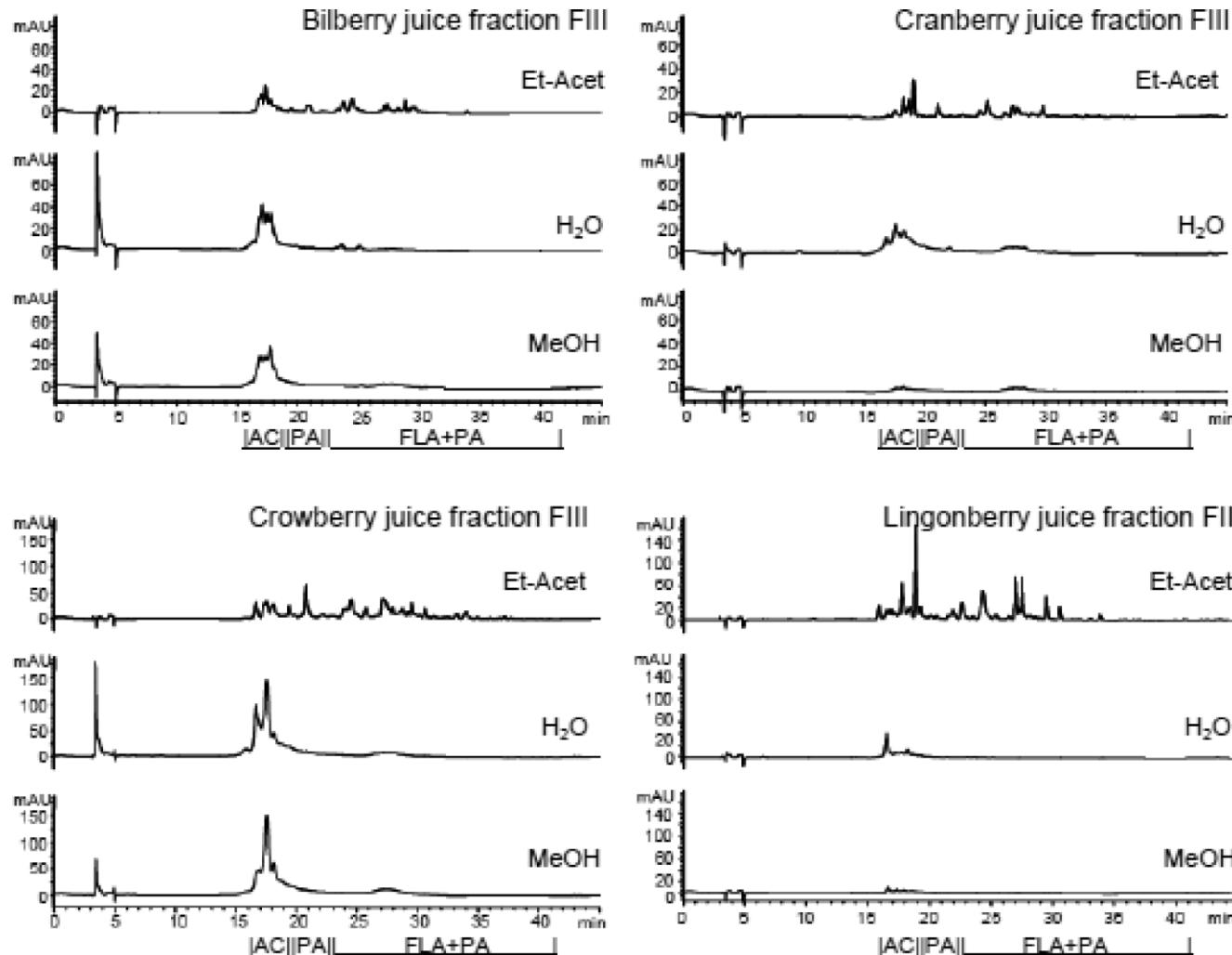
# Antimicrobial activity of SA-B against *Neisseria meningitidis* (bacterial survival)



# Conclusions

- Adhesion mediating purified pili of *N. meningitidis* bind to bovine thyroglobulin containing N-linked complex and hybrid (oligomannosidic) glycans (Dorland *et al* 1984) and human salivary agglutinin containing O- or N-linked (poly) lactosamine and hybrid oligosaccharides.
- The binding to bovine thyroglobulin was prevented by purified bovine milk acidic and human milk neutral oligosaccharide fractions and plant polyphenol SA-B
- Overall conclusion (including studies with wild berry polyphenols): *N. meningitidis* adhesion can be prevented by milk OS fractions and plant polyphenolic fractions

# Alafraktioiden RP-HPLC-DAD

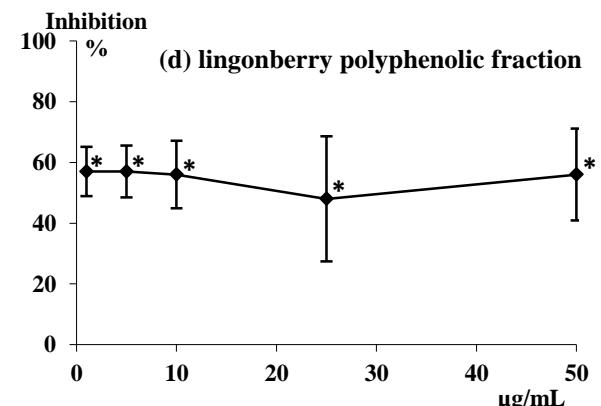
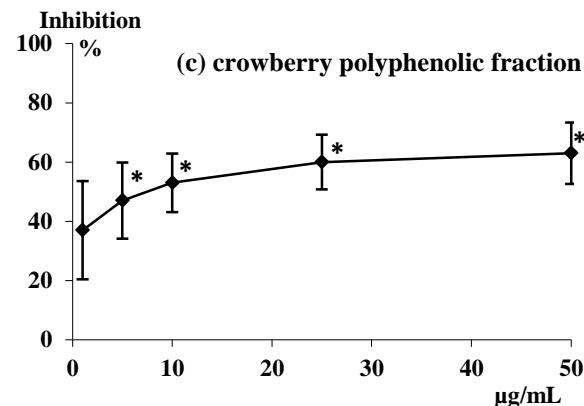
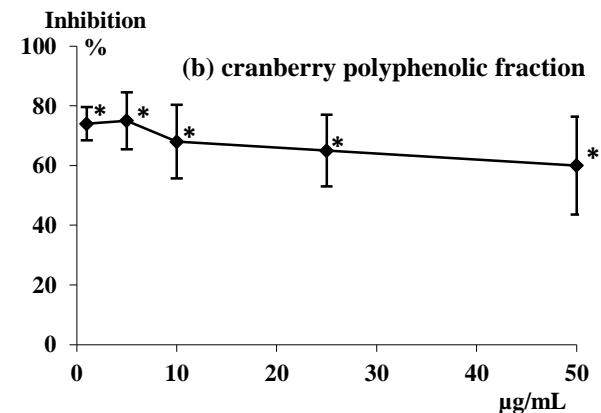
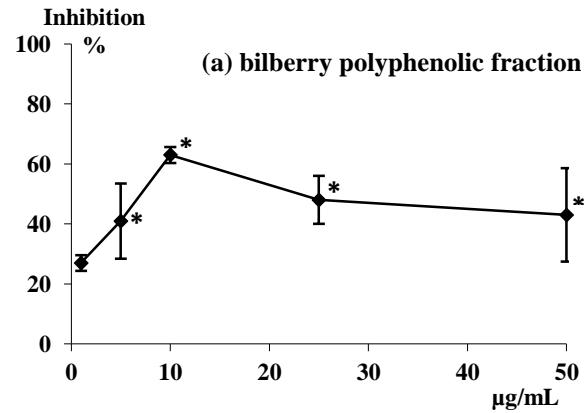


Et-Acet: flavonol glycosides + proanthocyanidins

H<sub>2</sub>O: anthocyanins + polymeric proanthocyanidins

MeOH: anthocyanins + polymeric proanthocyanidins

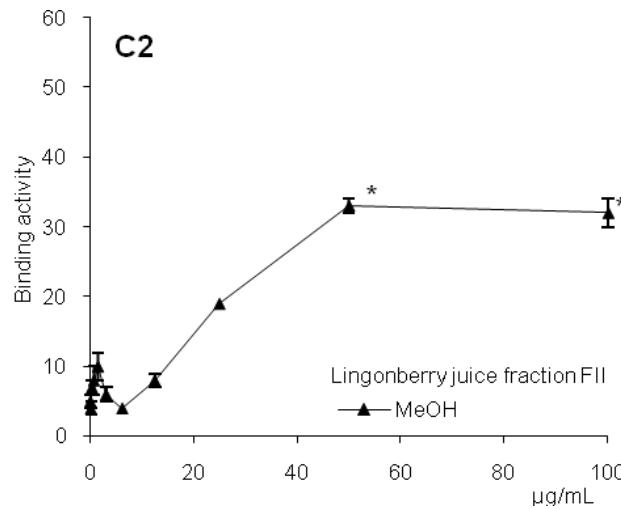
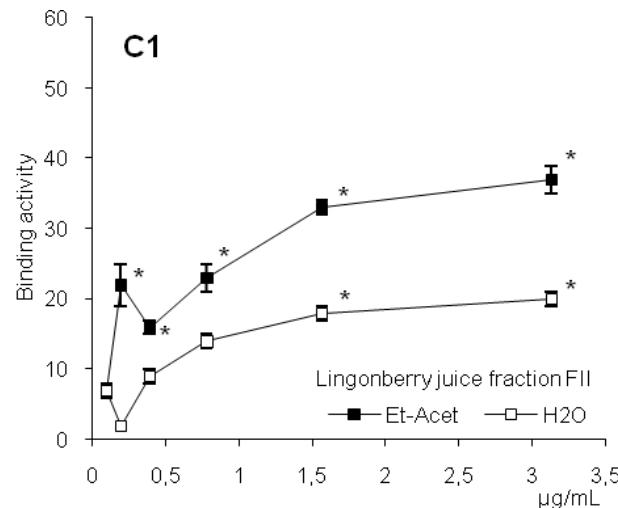
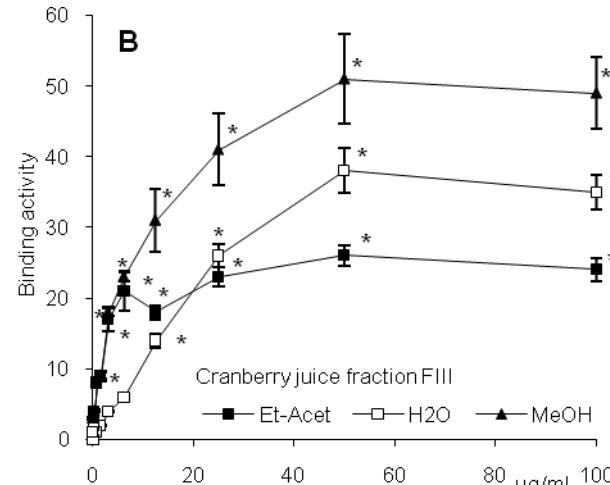
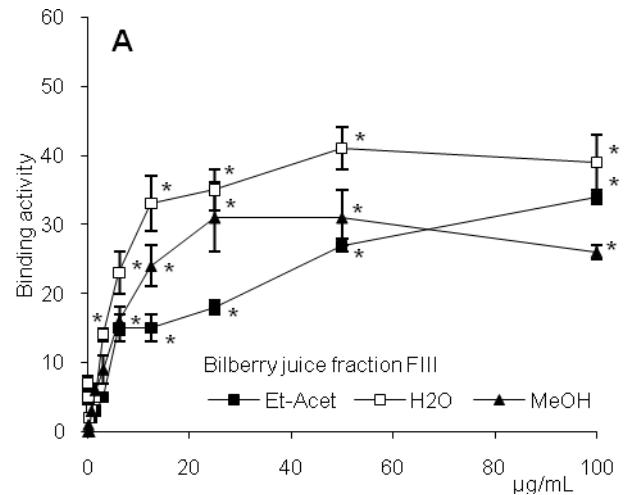
# Sitoutumisen inhibitio epiteelisoluihin(HEC-1B) alafraktiot vs Nm



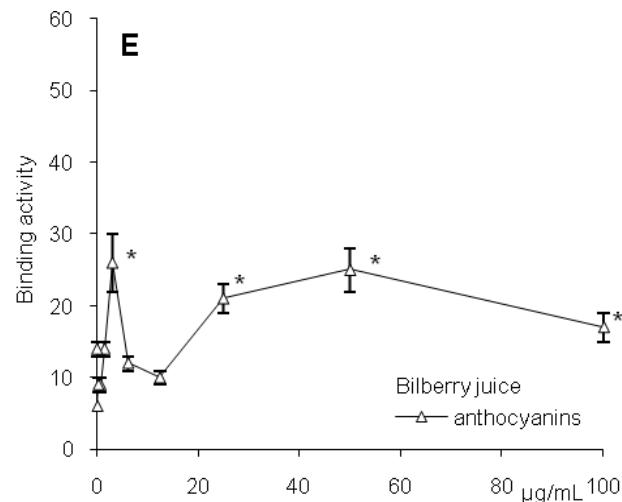
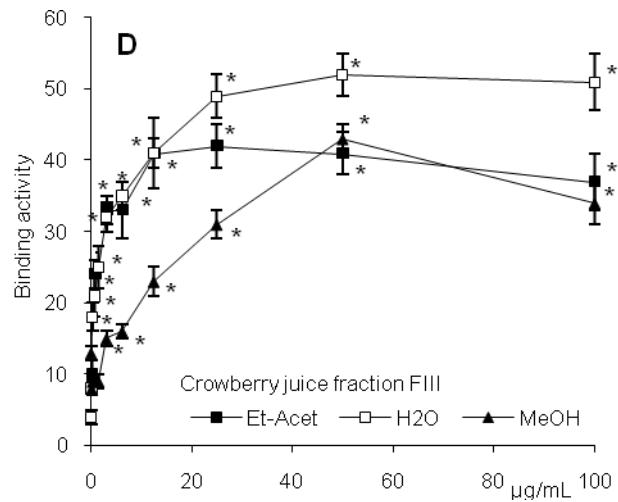
# Alafraktioiden antimikroabisuus *N. meningitidis*-bakteeria vastaan (survival of the bacteria)

Concentration of polyphenols ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Bilberry juice	Cranberry juice	Crowberry juice	Lingonberry juice
1	90%	85%	$\geq 100\%$	$\geq 100\%$
25	100%	90%	100%	100%
50	100%	75%	100%	$\geq 100\%$
Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): 45 %				

# *N.meningitidis*-pilusten sitoutuminen alafraktioihin



# *N.meningitidis*-pilosten sitoutuminen alafraktioihin



(Toivanen *et al.* JAFC 57: 3210-7, 2009)

# Publications

- Huttunen S, Toivanen M, Liu C-H and Tikkanen-Kaukanen C. Anti-infective potential of salvianolic acid B against *Neisseria meningitidis*. BMC Research Notes. 2016; 9:25 DOI:10.1186/s13104-016-1838-4.
- Toivanen M, Huttunen S, Lapinjoki S, Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition of adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions. Phytother Res. 2011; 25:828–32.
- Toivanen M, Ryynänen A, Huttunen S, Duricova J, Riihinens K, Törrönen R, Lapinjoki S, Tikkanen-Kaukanen C. Binding of *Neisseria meningitidis* pili to berry polyphenolic fractions. J Agric Food Chem. 2009; 57:3120–7.
- Hakkarainen J, Toivanen M, Leinonen A, Frängsmyr L, Strömberg N, Lapinjoki S, Nassif X, Tikkanen-Kaukanen C. Human and bovine milk oligosaccharides inhibit *Neisseria meningitidis* pili attachment in vitro. J Nutr. 2005; 135:2445–8.

# Participants

University of Eastern Finland, Finland

*Dept. of Pharm. Chemistry*

**Marko Toivanen, PhD (Pharm)**

**Sanna Pyykönen, MSc**

Satu Arkko, PhD

Jana Duricova, MSc

Seppo Lapinjoki, Professor

*Institute of Public Health and Clinical Nutrition*

Jussi Kauhanen, Professor

Jaakko Mursu, PhD

Food and Health Research Centre

Riitta Törrönen, PhD

Anu Happonen, Msc

Dept of Biosciences

Kaisu Riihinens, PhD

Pasi Soininen, PhD

Reino Laatikainen, Professor

University of Turku, Finland, Dept. Medical Biochemistry and

Molecular Biology

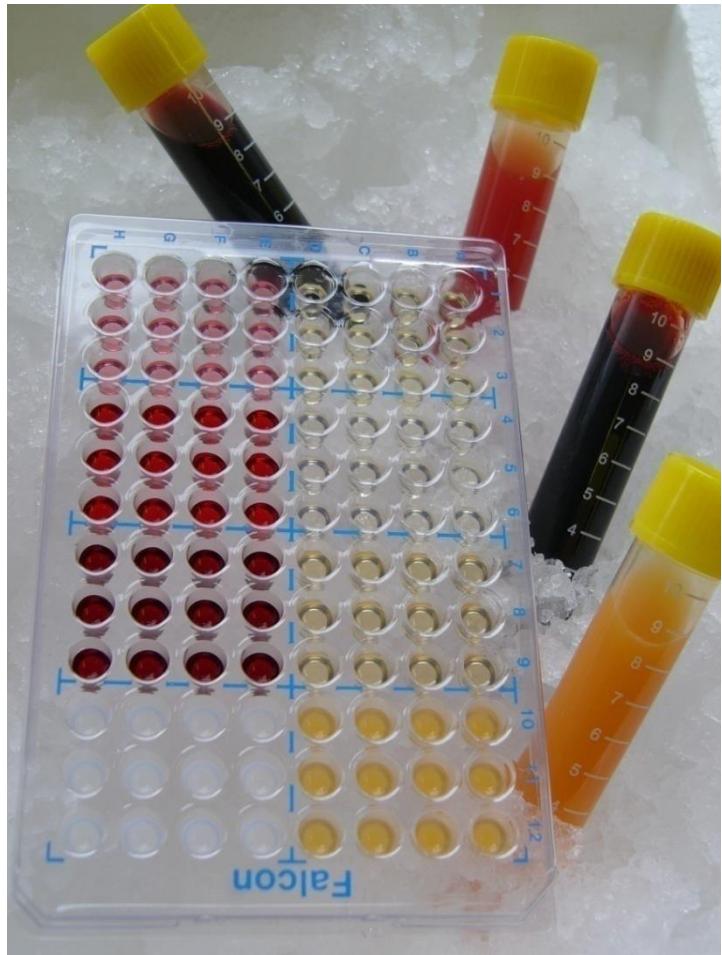
Vuokko Loimaranta, PhD

Sauli Haataja, PhD

Jukka Finne, Professor

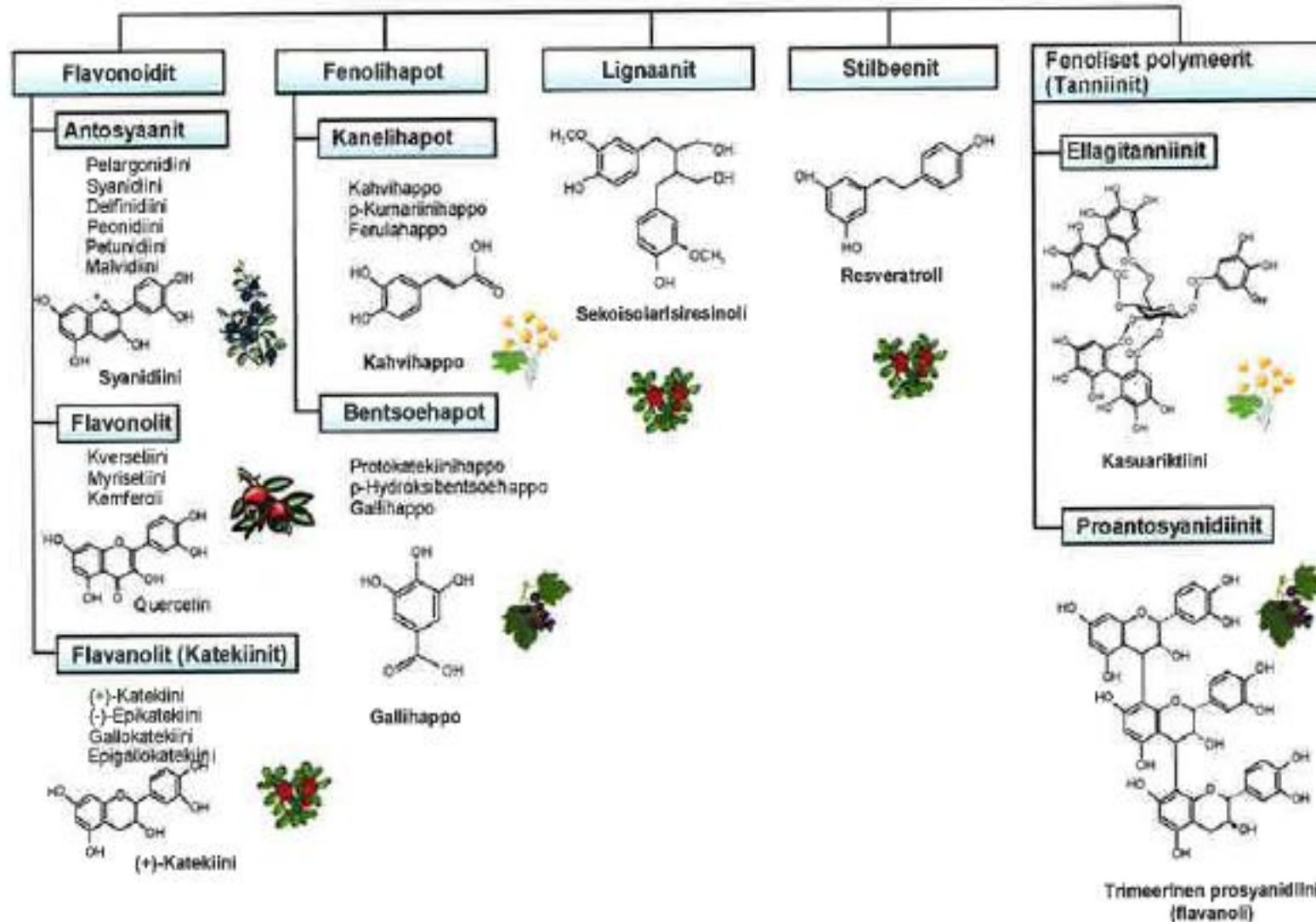
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

Chenhai Liu, Professor



*Kiitos!*

## Marjojen fenoliyhdisteet



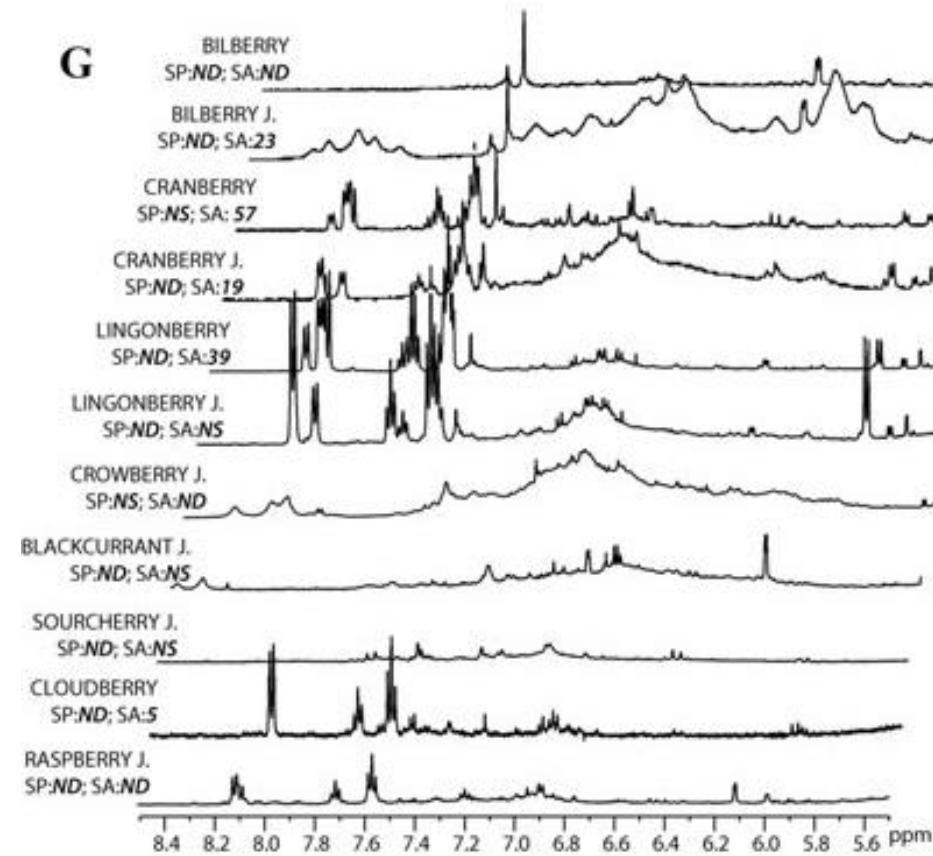
# Sokeri-, proantosyanidiini- ja antosyanidiini-pitoisuudet (molekyylikoko-)marja- ja hedelmäfraktioissa

product	sugars (mg/mL)			proanthocyanidins (mg/g)			anthocyanins (mg/g)		
	F I	F II	F III	F I	F II	F III	F I	F II	F III
<i>Vaccinium myrtillus</i>									
bilberries	43	35	42	tr	1	1	nd	1	nd
bilberry juice	178	160	<b>204<sup>b</sup></b>	3	6	7	tr	14	39
<i>Vaccinium oxycoccus</i>									
cranberries	21	37	31	tr	3	2	nd	1	tr
cranberry juice	83	104	174	1	10	30	nd	1	4
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>									
lingonberries	42	37	42	1	10	1	nd	1	tr
lingonberry juice	113	187	152	4	22	9	nd	3	1
<i>Empetrum nigrum</i>									
crowberry juice	136	177	<b>232</b>	2	14	27	1	16	38
<i>Ribes nigrum</i>									
black currant juice	96	20	27	1	3	2	1	tr	nd
<i>Citrus paradisi</i>									
red grapefruit juice	124	162	212	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Prunus cerasus</i>									
sour cherry juice	139	151	188	1	6	3	tr	2	1
<i>Malus domestica</i>									
apple juice	188	228	<b>177</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Rubus chamaemorus</i>									
cloudberry	43	36	35	nd	nd	nd	tr	nd	nd
<i>Ananas comosus</i>									
pineapple juice	118	91	258	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Rubus idaeus</i>									
raspberry juice	127	153	166	1	4	2	tr	2	1
<i>Solanum lycopersicum</i>									
tomato juice	50	61	65	nd	nd	nd	nd	nd	nd

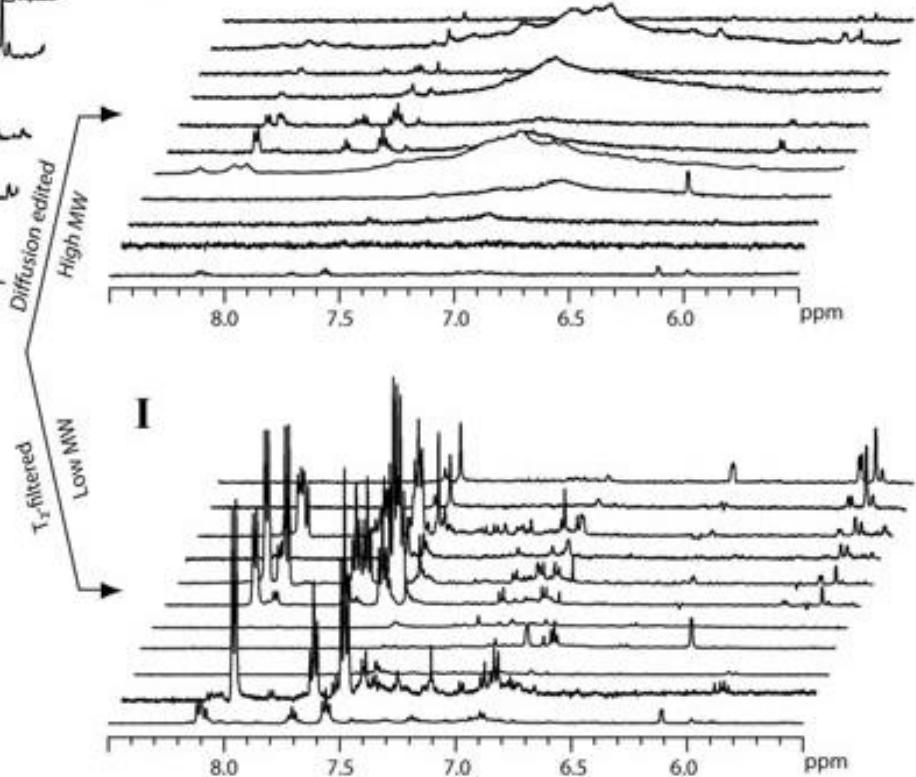
<sup>a</sup> Abbreviations: F I, <10 kDa fraction; F II, 10–100 kDa fraction; F III, >100 kDa fraction; tr, traces; nd, not detected. <sup>b</sup> Juice fractions chosen for further analyses based on biological assay are marked in bold.

# FIII-marjafraktioiden NMR-spektrit

G



H



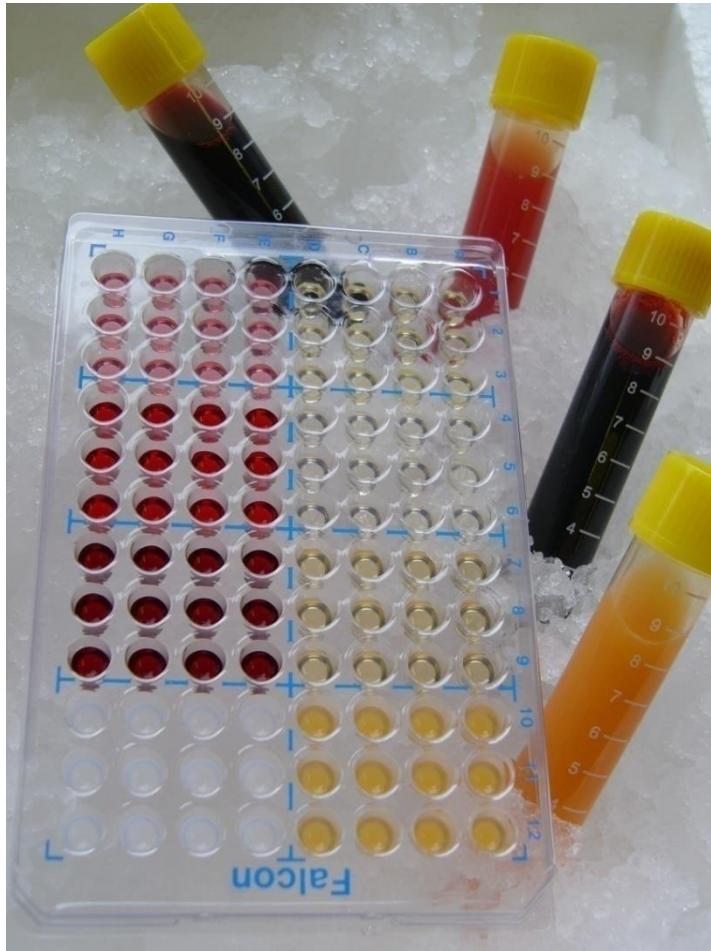
G = standard proton spectra

H = diffusion edited spectra - high MW compounds

I = T<sub>2</sub>-filtered spectra - low MW compounds

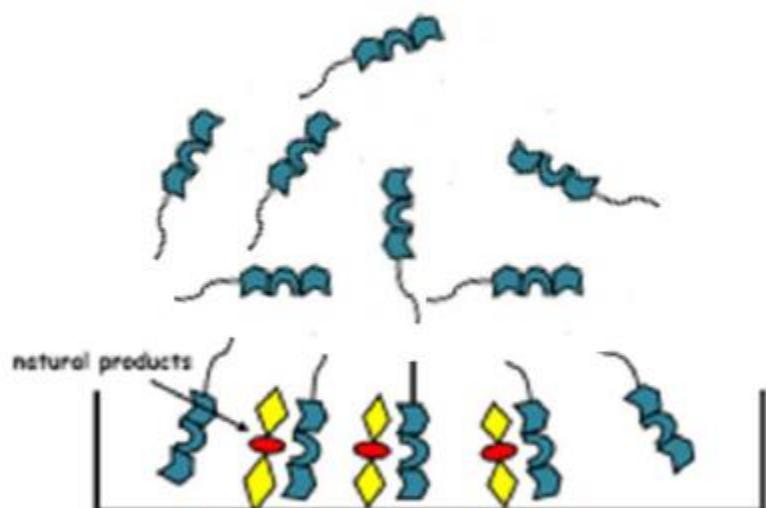
(Toivanen et al, Phytother.Res 2010a)

# Kuoppalevykoe: sitoutuminen marjojen polyfenoli-alafraktioihin

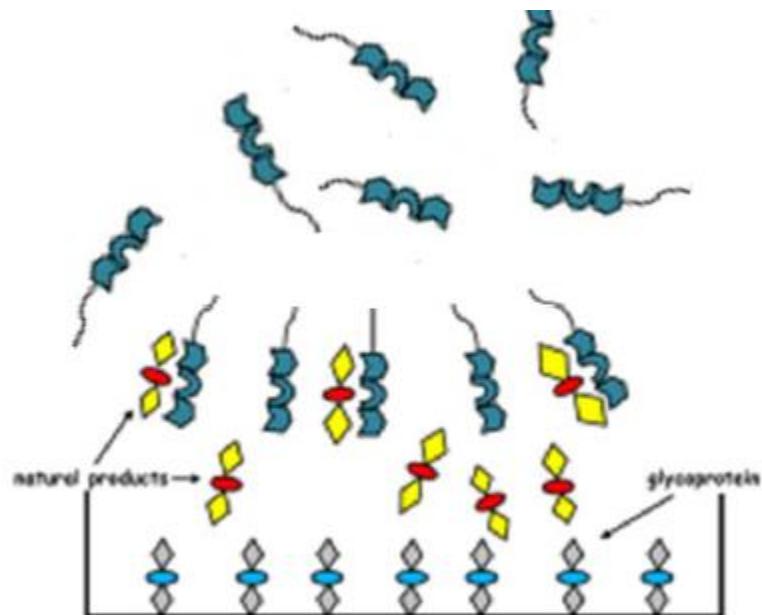


M. Toivanen

# Kuoppalevykokeet

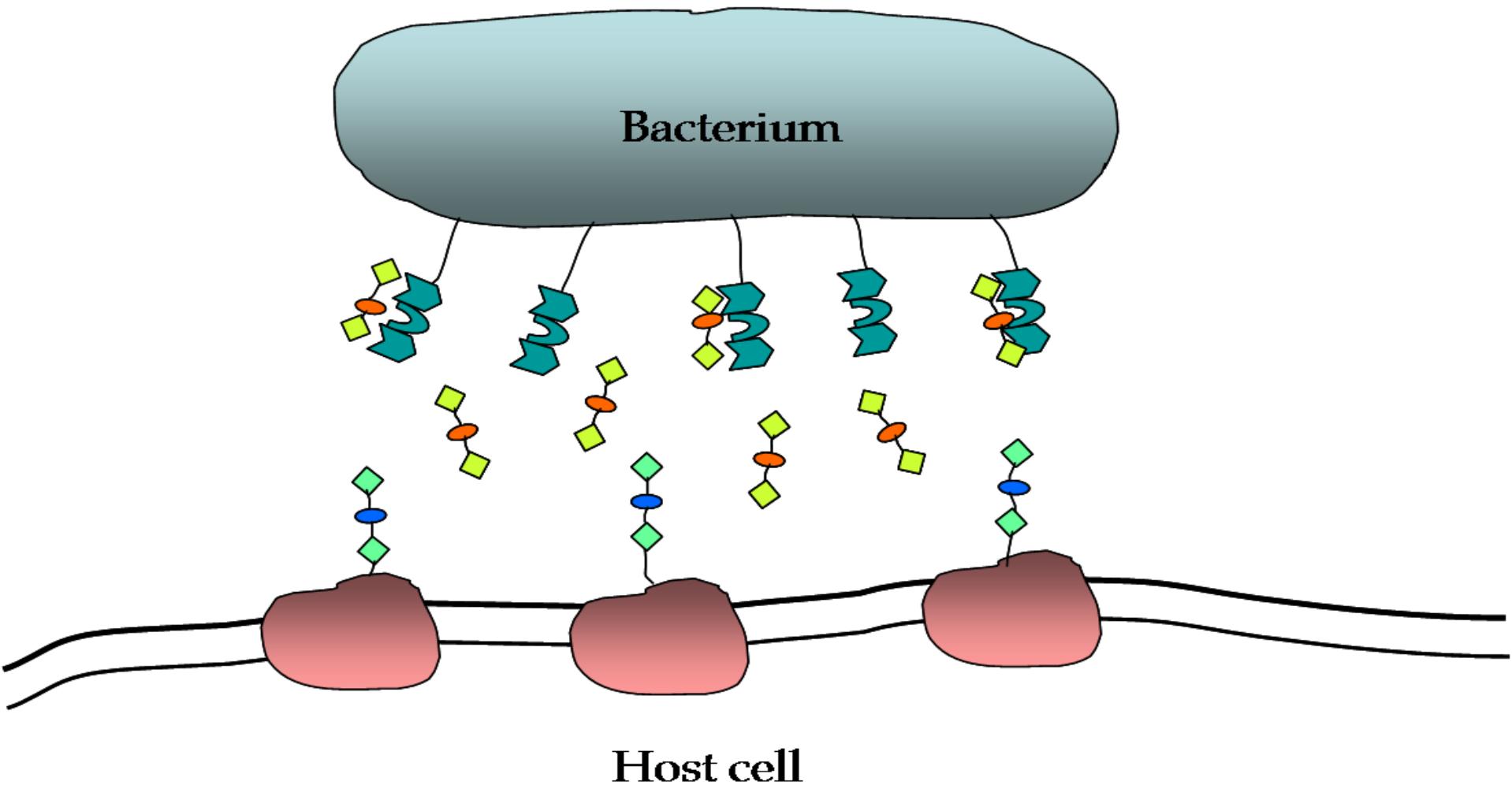


A



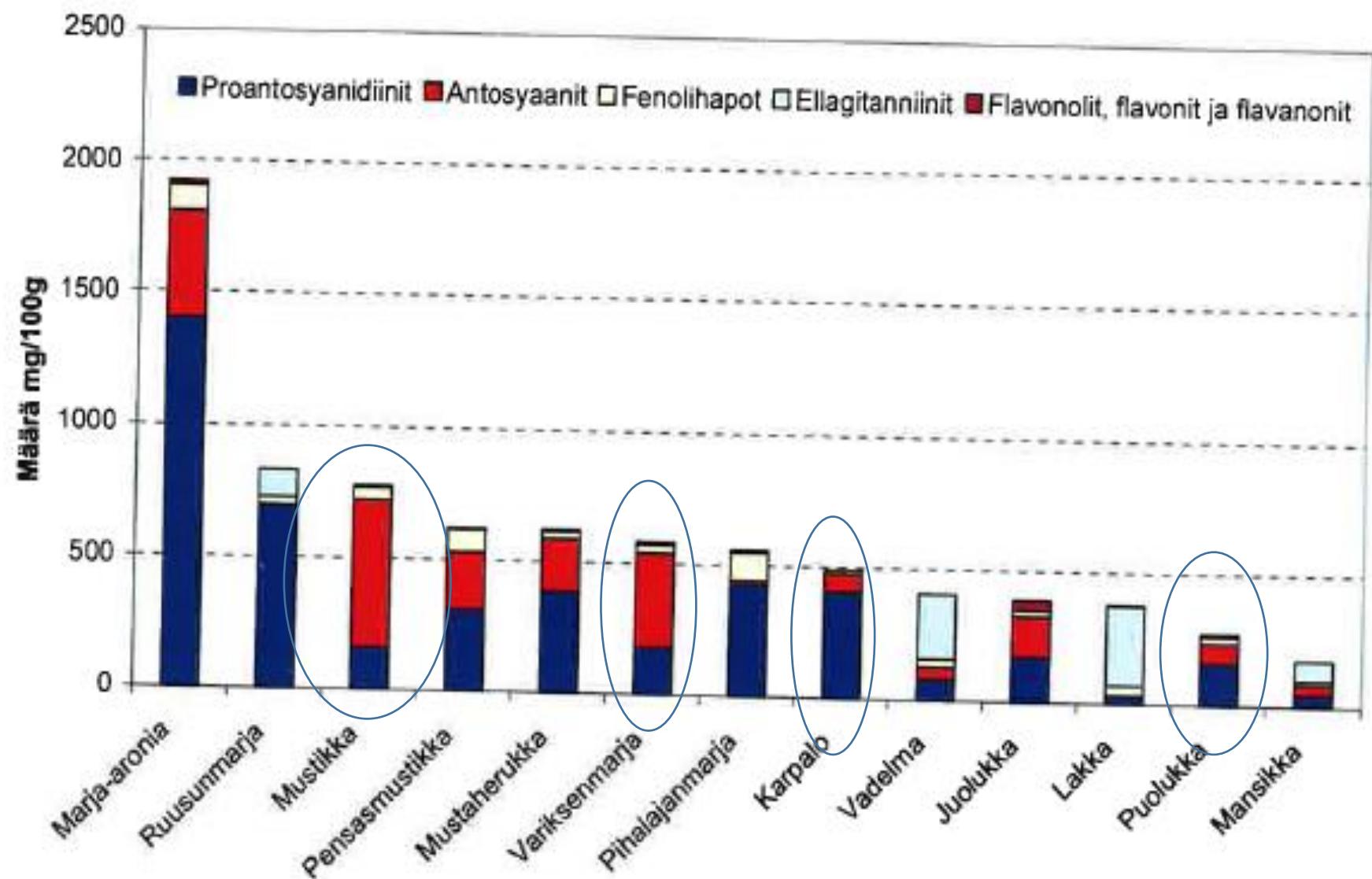
B

# Soluvinjelykokeet



**Host cell**

A. Kleino according to Zopf and Roth, Lancet 1996

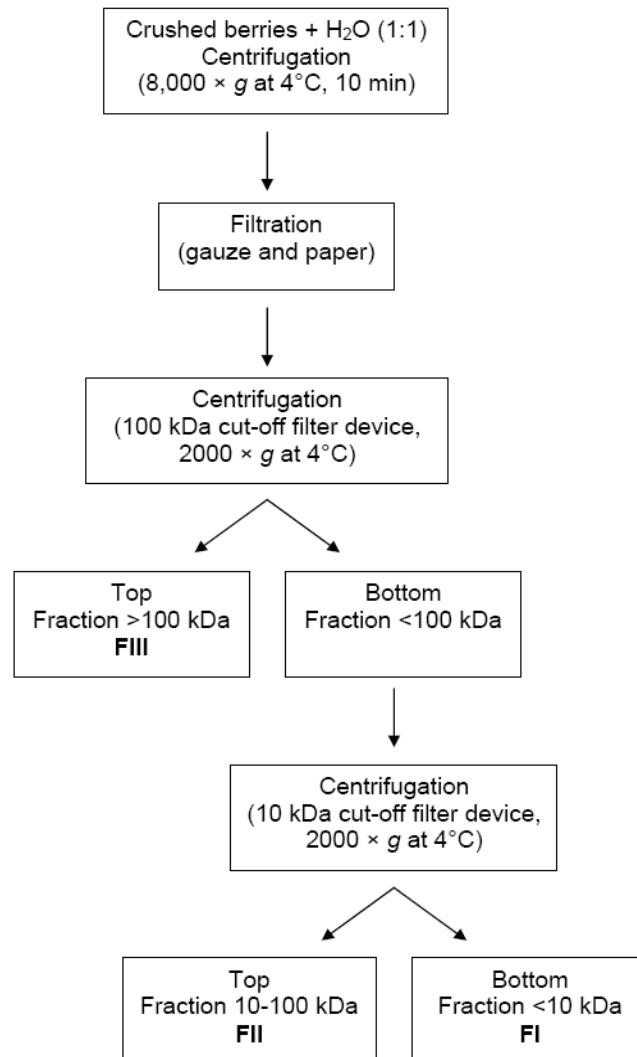


# Muiden tutkimustuloksia

*In vitro* and *in vivo* anti-adhesion activity of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.)

Cranberry material	Bacteria	Examples of diseases in humans	References
<i>In vitro</i>			
A-type proanthocyanidin trimers of cranberry <sup>a</sup> ; Purified proanthocyanidin extracts of cranberry <sup>b</sup> ; Cranberry juice <sup>c</sup>	<i>Eschericia coli</i>	UTI, sepsis	Foo <i>et al.</i> , 2000b <sup>a</sup> ; Howell <i>et al.</i> , 1998 <sup>b</sup> ; Zafriri <i>et al.</i> , 1989 <sup>c</sup>
High molecular weight material of cranberry juice	<i>Helicobacter pylori</i>	gastritis	Burger <i>et al.</i> , 2000
High molecular weight material of cranberry juice	Oral bacteria	dental caries	Weiss <i>et al.</i> , 2002
<i>In vivo</i>			
Cranberry juice	<i>E. coli</i>	UTI, sepsis	Kontiokari <i>et al.</i> , 2001

# Molekyylikokoon perustuva fraktiointi



→ SPE alafraktiointi :  
C-18 patruuna  
eluutio etyylisetaatilla, vedellä &  
metanolilla

# Marjojen polyfenolit aktiivisina yhdisteinä

- Antosyaanit antavat marjoille niiden punaisen, sinisen tai mustan värin; mitä tummempi marja, sitä enemmän flavonoideja
  - Antosyaaneja eniten mustikassa, marja-aroniassa ja variksenmarjassa
- 
- Proantosyanidiinit: tanniineja, hyvin monimuotoisia, muodostuneet katekiineista (dimeereistä polymeerisiin ketjuihin) (A- ja B-tyypit)
  - Tutkitun Amerikan karpalon antiadhesiivisuus liittyy A-tyypin proantosyanidiineihin
  - A-tyyppi on harvinaisempi kuin B-tyyppi
- 
- Harvinaista A-tyypin proantosyanidiinia on myös löydetty kotimaisista marjoista: puolukasta, karpalosta, juolukasta ja mustikasta.

# Marjat

## Vaccinium marjat

- Puolukka (*V. vitis-idaea*)
- Mustikka (*V. myrtillus*)
- Karpalo (*V. oxycoccus*)

## Variksenmarja

(*Empetrum nigrum*)

## Mustaherukka

(*Ribes nigrum*)



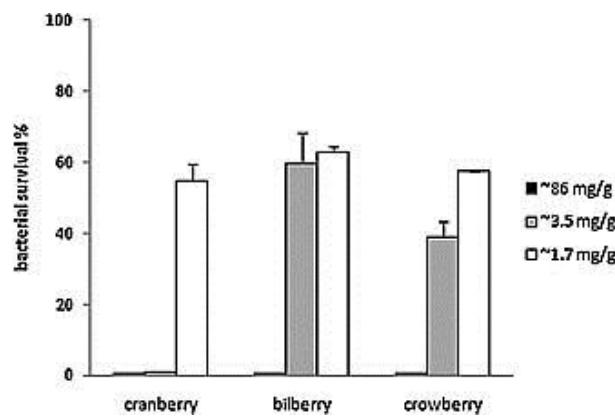
Muita: lakka, vadelma, hapan kirsikka, tomaatti, ananas, verigreippi

*Streptococcus pneumoniae*

## Omia tutkimustuloksia

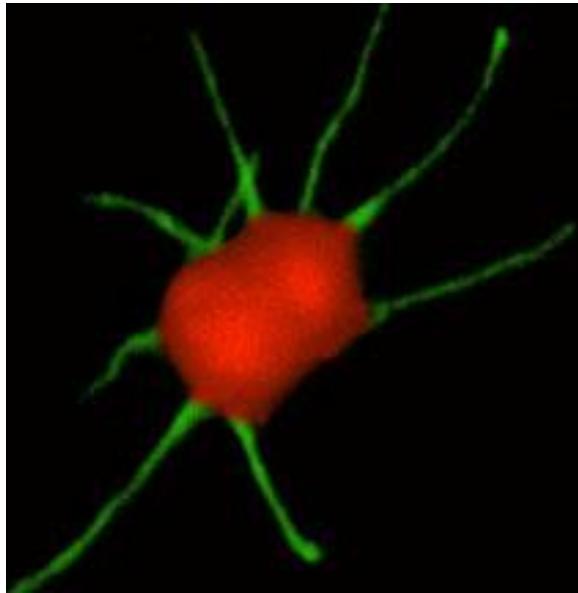


# Antimicrobial Activity of Wild Berry Juice Fractions against *Streptococcus pneumoniae*



**Phytotherapy Research**

Volume 25, Issue 1, pages 122-127, 12 JUL 2010 DOI: 10.1002/ptr.3240  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.3240/full#fig3>



Inserm U570,  
Paris



# Kliiniset kokeet

- Tutkittiin mustikan ja puolukan fenolisia yhdisteitä sisältäviä tuotteita
- 2 pilot-koetta tehty
  - Eettisen toimikunnan puoltava lausunto
  - Lääkärin valvonnassa
  - Kaksoisokko-, placebo-kontrolloituja
- Yhteistyö elintarviketeollisuuden kanssa (tuotteiden valmistus)
  - 1) Mustikan ja puolukan polyfenoleja sisältävä pastilli hammasbakteereja vastaan
  - 2) Mustikkamehututkimus hengitysinfektiota vastaan ja vaikutus nenänielu-kantajuuteen

# Kliiniset kokeet

- Teknisesti onnistuneita
- Ongelmat:
- Tutkittavien rekrytointi ja sitoutuminen (terveet aikuiset)
- Tuotteen maku, suun värijäytyminen
- Kontrollituotteen valmistus vaativaa elintarvikkeella, jotta ei erotu tutkimustuotteesta (väri, maku)
- Tarvittavan tutkimustuotteen ja kontrollituotteen (mehu) määrä suuri
- Pitkääikainen seuranta
- Pieni otos ja lyhyt aika pilottikokeissa, ei tilastollista merkittävyyttä – tarvitaan laajempi koe

# Scientific Collaboration

- INSERM U570 Paris, France (*Neisseria meningitidis* pathogens)
- Umeå University, Umeå, Sweden ( bacterial adhesion)
- University of Illinois at Chicago, USA (NMR analyses, tuberculosis)
- University of Barathon, Kenya (herbal extraction, malaria, other human infectious diseases)
- University of Graz, Austria (berries)
- St. Petersburg State University (human pathogens)

# Merkitys luomussa

## Luonnonaineet antiadheesio terapiassa

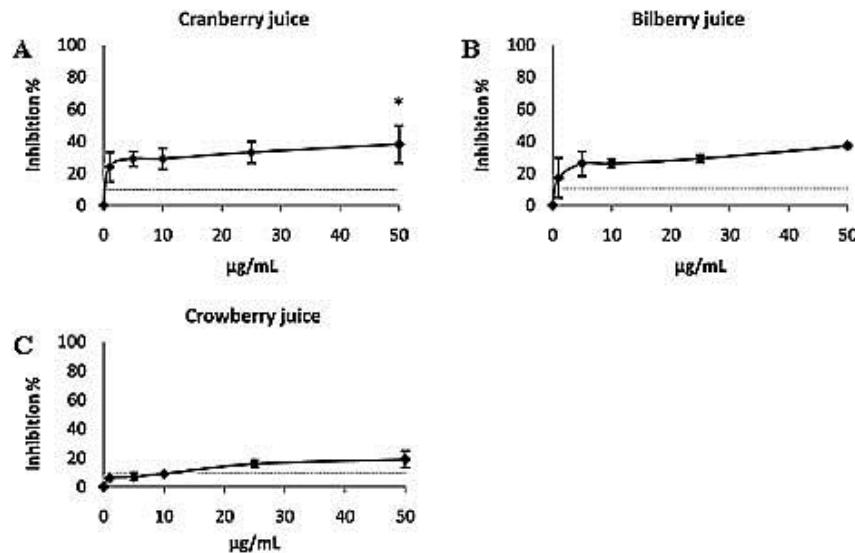
- Esim. luomueläinlääkintä; pyritään korvamaan antibiootit, joiden käyttö on hyvin rajoitettua
  - (anti-infektiiviset rehut)

## Luonnonaineet antimikrobisina yhdisteinä

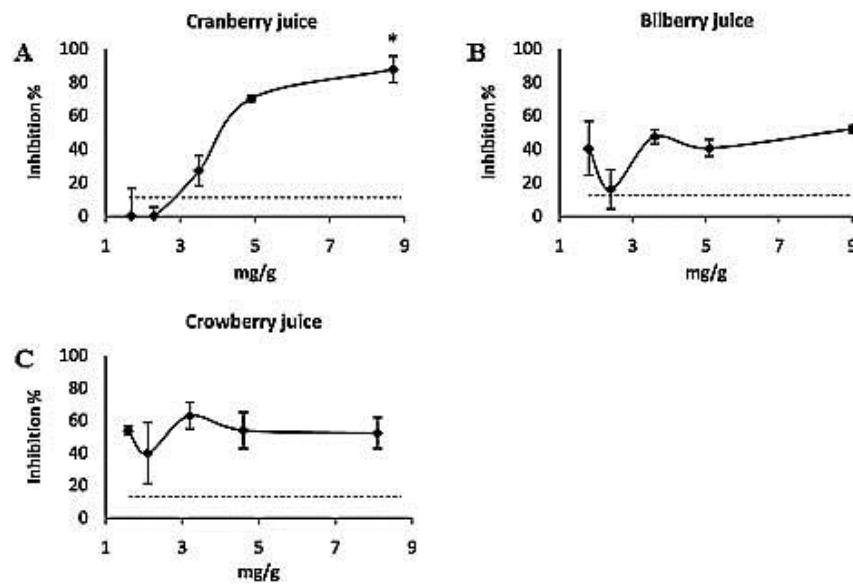
- Esim. luomuravinnon säilönnässä ruokaa pilaavia bakteereita vastaan
- (lihamarinadit; hedelmien pintojen käsittely; lukuisia käyttömahdollisuuksia)

## Antibioottiresistenssin lisääntyminen

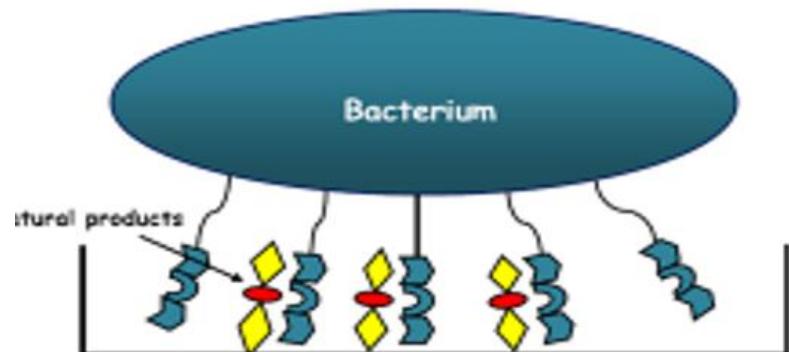
# Inhibition Activity of Wild Berry Juice Subfractions against *Streptococcus pneumoniae* Binding to Human Bronchial Cells



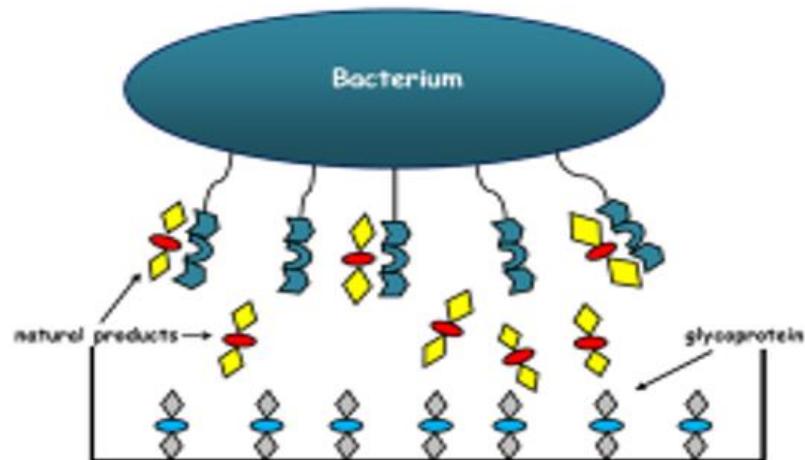
# Inhibition Activity of Wild Berry Juice Fractions against *Streptococcus pneumoniae* Binding to Human Bronchial Cells



# Kuoppalevykokeet



**A**



**B**

# Tutkimuksen tavoitteet

Estää bakteerin tarttuminen nenäielun alueelle  
luonnonaineilla

*Käytännön tavoitteet*

- I    Anti-infektiivinen (funktionaalinen ) elintarvike, ravintolisä
  - Terveille kuluttajille
  - Riskiryhmille (vanhukset, immuunipuutosta sairastavat potilaat, päiväkotilapset, varusmiehet)
  
- II      Anti-infektivinen lääke

# Marjamehutiivisteet tutkimuksissamme

- Kiantama Oy
- Käsittelyt
  - Pektinaasi 2 h 40-45 C Puristus, mekaaninen käsittely
  - Suodatus (levy)
  - Pastorointi, 85 C, 1 min
  - Haihdutus