

## Paper of the month, August 2019

### Management of Tamm-Horsfall Protein for Reliable Urinary Analytics

Proteomics Clin Appl. 2019 Aug 19:e1900018. doi: 10.1002/prca.201900018. [Epub ahead of print]

Xu X, Barreiro K, Musante L, Kretz O, Lin H, Zou H, Huber TB, Holthofer H

---

Im Urin enthaltene extrazelluläre Vesikel (uEVs) sind kleine (30–400nm im Durchmesser), von einer Phospholipid–Doppelmembran umgebene Strukturen, die aktiv von allen Zelltypen des Nephrons und der ableitenden Harnwege sezerniert werden. Sie haben ihren Ursprung entweder im endosomalen Kompartiment oder direkt von Evaginationen der Zellmembran. Die Vielzahl unterschiedlicher uEVs, die man im Urin nachweisen kann, stellen eine Momentaufnahme pathophysiologischer Prozesse in der Niere und im gesamten Körper dar, da EVs in der Niere aus der systemischen Blutzirkulation gefiltert werden. Somit stellt die Analyse der uEVs einen vielversprechenden Ansatz dar, um dynamische molekulare Informationen zu frühen pathologischen Veränderungen unterschiedlicher (renaler) Erkrankungen, Voraussagen zu ihrem Verlauf oder dem Ansprechen auf Therapie zu erlangen. In diesem Zusammenhang hat eine Arbeitsgruppe des STOP-FSGS Konsortiums ein robustes, standardisiertes Protokoll zur Isolation von uEVs etabliert, da ein solches bislang nicht verfügbar war. Insbesondere Tamm–Horsfall Protein (THP; Uromodulin), das häufigste und glykanreiche Glykoprotein im Urin, kann eine große Menge von uEVs binden. THP stellt daher eine störende Kontamination bei der Durchführung von Urinanalysen dar. In der vorliegenden Studie wurden uEVs mittels hydrostatischer Filtrationsdialyse (HFD) isoliert und mit einer definierten Harnstofflösung behandelt, um die Freisetzung von uEVs zu optimieren. Dieses Protokoll garantiert gegenüber gängigen Verfahren eine Anreicherung von isolierten uEVs, wobei gleichzeitig die Kontamination signifikant reduziert wurde, wie transmissions-elektronenmikroskopische, Western blot und Proteom-Analysen zeigten. Laut der Autoren erfüllt das Verfahren die Anforderungen eines klinischen Forschungslabors und erlaubt eine schnelle und einfache Probenaufarbeitung zur weiteren Analyse. Das Management der THP Kontamination kann einfach in jeglichen uEVs Isolierungsprozess integriert werden und bietet erhebliche Vorteile bei verschiedensten nachfolgenden Analyseverfahren. In Anbetracht der zunehmenden Bedeutung von uEVs als Biomarker renaler und systemischer Erkrankungen ist das hier im Detail beschriebene Protokoll von breitem Interesse.

---

**Kommentar von:** Oliver Kretz

## Paper of the month, August 2019

### Management of Tamm-Horsfall Protein for Reliable Urinary Analytics

Proteomics Clin Appl. 2019 Aug 19:e1900018. doi: 10.1002/prca.201900018. [Epub ahead of print]

Xu X, Barreiro K, Musante L, Kretz O, Lin H, Zou H, Huber TB, Holthofer H

---

Urinary extracellular vesicles (uEVs) are small size (30–400nm in diameter) phospholipid bilayered structures actively secreted by all cell types facing the urinary space. Originating either from the endosomal compartment or directly from evagination of the cellular plasma membrane, diversity of extracellular vesicles (EV) found in urine can be considered as a snapshot of physiopathological activity upstream in the kidney and entire body as reflected by EVs filtered from circulation through the kidney. Thus, uEV profiling represents a lucrative platform for novel biomarkers to provide dynamic molecular information for early disease mechanisms, prediction of outcome and response to therapy. In this context members of the STOP-FSGS consortium established a robust, standardized isolation protocol for uEVs which is still missing so far. Particularly, Tamm–Horsfall protein (THP; uromodulin), the most abundant and glycan-rich glycoprotein in the urine can naturally entrap a large portion of uEVs. Thus THP represents an unwanted “contaminant” in urinary assays. In the present study, uEVs were isolated by hydrostatic filtration dialysis (HFD) and treated with a defined solution of urea to optimize release of uEVs. This protocol led to an enrichment of isolated uEVs combined with significantly reduced contamination as confirmed by transmission electron microscopy, Western blotting, and proteomic profiling in mass spectrometry. The authors claim that this method meets the needs of a clinical research laboratory and allows quick and easy sample process before downstream analytics. Management of THP can be easily integrated into EV isolation process done by any method and provides major benefits for comprehensive sample analytics. With regard to the increasing relevance of uEVs as biomarkers for renal or systemic diseases, the protocol provided here in detail could be of broad interest.

---

**Comment by:** Oliver Kretz