

# N-Glykane des Tamm-Horsfall Proteins: Geschlechtsabhängig und durch *Equisetum arvense* Extrakt modulierbar? Eine massenspektrometrische Untersuchung

Boris Mo<sup>1</sup>, Christian Gutheil<sup>2</sup>, Matthias Letzel<sup>2</sup>, Andreas Hensel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Universität Münster, Deutschland; <sup>2</sup> Organisch-Chemisches Institut, Universität Münster, Deutschland

## HINTERGRUND:

Das Tamm-Horsfall Protein (syn. Uromodulin, THP) ist ein hoch mannosyliertes Glykoprotein, welches in der Niere im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife gebildet wird. THP bindet an das Mannose-sensitive Adhäsin FimH uropathogener *E. coli* (UPEC) und verhindert so die FimH-abhängige Adhäsion der Bakterien an Wirtszellen. Demnach ist THP Bestandteil der angeborenen Immunabwehr [1]. Es konnte in einer vorausgegangenen Studie gezeigt werden, dass die THP-Ekretion geschlechtsabhängig ist [2]. Dabei zeigten Frauen eine signifikant höhere THP-Ausscheidung als Männer, wobei Frauen, die regelmäßig hormonelle Kontrazeptiva einnahmen, eine leicht verminderte THP-Ausscheidung zeigten [2]. Darüber hinaus wurde eine Induktion von THP *in vivo* nach oraler Gabe von Cranberry-Extrakt [3] bzw. Schachtelhalm-Extrakt [4] in zwei zuvor beschriebenen und von der Ethikkommission genehmigten biomedizinischen Studien beobachtet.

## MATERIAL UND METHODEN

- 1. Isolierung von THP** aus morgendlichem Mittelstrahlurin von einzelnen gesunden Probanden mithilfe von Zentrifugalfiltereinheiten (50 kDa).
- 2. Denaturierung von THP** mit Guanidiniumchlorid, Dithiothreitol und anschließend **Alkylierung** mit Iodacetamide, zur Aufrechterhaltung der Primärstruktur von THP.
- 3. Entsalzung** mit Größenausschlusschromatographie-Kartuschen (SEC).
- 4. Inkubation** von denaturiertem THP mit **PNGaseF** für 24h bei 37°C (enzymatische Spaltung der N-Glykane vom Protein).

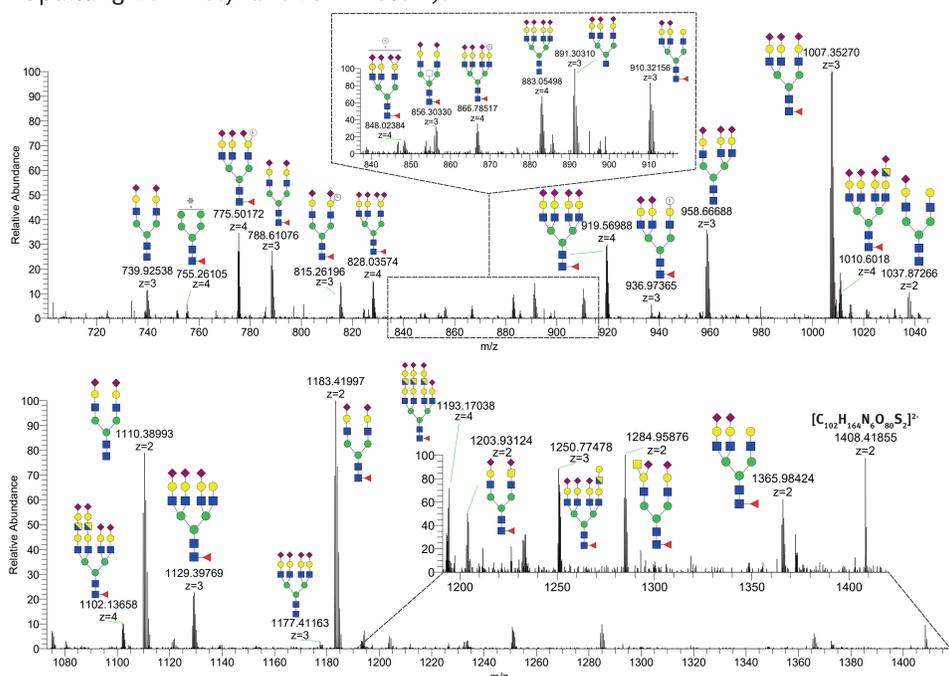


Abbildung 1: Beispiel eines Massenspektrums von den THP N-Glykanen einer gesunden, nicht behandelten männlichen Person. THP wurde aus morgendlichem Mittelstrahlurin isoliert und nach Protokoll denaturiert und deglykosyliert. Respektive N-Glykane konnten mithilfe der gemessenen Masse, des Isotopenmusters und durch das Hinzuziehen der „GlycoModTool“-software identifiziert werden.

## I) GESCHLECHTSABHÄNGIG?

THP, isoliert aus männlichen Probanden (N = 9), zeigten signifikant höhere relative Mengen an fukosylierten und sulfatierten Glykanen (**G30** und **G8**) im Vergleich zu Frauen (n = 10). Frauen zeigten jedoch höhere Mengen an nicht-fukosylierten Glykanen (**G27**) und tendenziell höhere Mengen an mannosylierten Glykanen (**G9**, **2** und **7**). Aufgrund der Tatsache, dass Frauen häufiger an HWI erkranken, kann hier erstmals vermutet werden, dass Frauen evolutionär besser angepasst sind als Männer und daher tendenziell höhere Mengen an mannosylierten Glykanen ausscheiden, um UTI zu verhindern. Die Funktion von Fucose muss in weiteren Arbeiten noch untersucht werden. Sulfat und Sialinsäuren in Glykanen sind verantwortlich für die Veränderung des isoelektrischen Punktes von THP, aber auch für die Bindung von mehrfach geladenen Kationen, welche für die Prävention von Urolithiasis von Bedeutung ist.

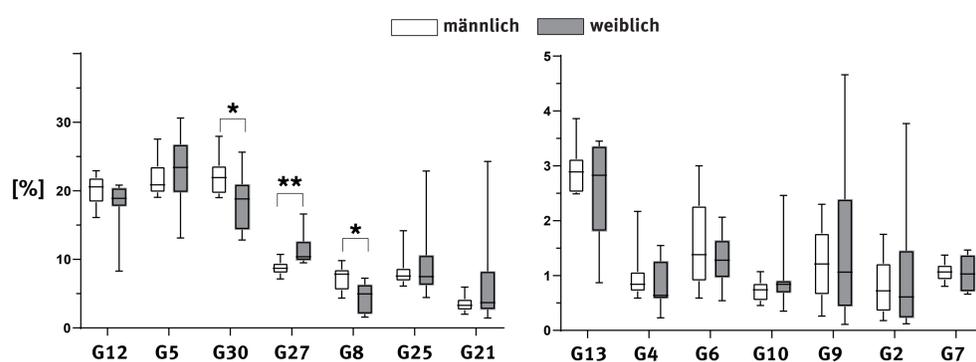


Abbildung 3: Geschlechtsabhängige Unterschiede des THP N-Glykosylierungsmusters: Die relative Quantifizierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. 9 Männer (weiß) und 10 Frauen (grau) waren bereit morgendlichen Mittelstrahlurin zu spenden. Davon waren 10 Urinproben (n = 5+5) weniger als 24h alt und die anderen 9 Urinproben stammen aus dem Tag 0 Urin von der Equisetum Gruppe (Biomedizinische Studie 2021-084-f-S, ca. 12 Monate eingefroren bei -20 °C). Für die statistische Analyse wurde ein Mann-Whitney test durchgeführt (nicht-parametrisch): \* p < 0,05, \*\* p < 0,001

## ZIELSETZUNG:

Für die Bindung von THP an UPEC spielt die Glykosylierung von THP eine wichtige Rolle. Daher sollte zunächst die THP-Glykosylierung bei Männern und Frauen untersucht werden (n = 9+10). Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Stimulation der THP-Ausscheidung durch einen wässrigen Extrakt aus *Equiseti herba* (entsprechend 5,2 g Droge pro Tag, n = 8) ebenfalls Auswirkungen auf die THP-Glykosylierung hat. Zur Beantwortung beider Fragestellungen sollte daher eine massenspektrometrisch-basierte Methode zur Identifizierung und relativen Quantifizierung von THP N-Glykanen entwickelt werden. Die Leitfragen lauten dementsprechend:

- Gibt es eine geschlechtsabhängige Glykosylierung von THP?
- Inwieweit beeinflusst die Einnahme von *Equiseti herba* Extrakt die THP-Glykosylierung?

**5. Erhalt der N-Glykane** durch 10 kDa Zentrifugalfiltereinheiten: THP und PNGaseF verbleiben im Filter. N-Glykane können dann in adequate Verdünnungen mittels hochauflösender massenspektrometrischer Analyse (Exploris120 Orbitrap System mit Schleifeninjektion in MeOH) im negativ Modus detektiert werden (s. Abb.1). Insgesamt wurden 54 verschiedene Glykane identifiziert.

**6. 14 identifizierte Glykane**, welche ca. 80 % der Signalintensitäten im m/z Bereich 700-2000 entsprachen, wurden für eine **relative Quantifizierung** verwendet (s. Abb. 2). Innerhalb eines Massenspektrums (ein Individuum) wurden die drei intensivsten Isotopensignale einer Spezies addiert und die Summe aller 14 Glykane ermittelt und deren jeweiligen Anteile (in %) berechnet. Die daraus resultierende individuelle Glykan-Komposition werden jeweils in einer gruppierten Analyse ausgewertet.

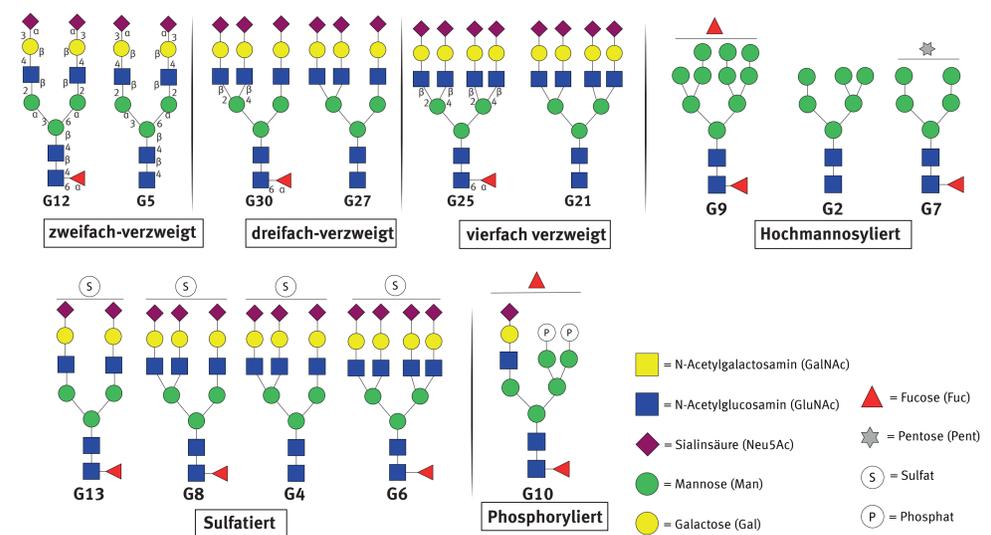


Abbildung 2: 14 selektierte N-Glykane zur relativen Quantifizierung und für den Vergleich verschiedener Glykosylierungsmuster in Proband\*innen. Die Bezeichnungen „Gxyz“ beruhen auf das Vorkommen der jeweiligen Glykane im Massenspektrum und haben daher an sich keine weitere Bedeutung.

## II) DURCH EUISETI HERBA MODULIERBAR?

Diese biomedizinische Studie wurde von der Ethikkommission Westfalen-Lippe in Münster genehmigt und unter der Kennnummer 2021-084-f-S durchgeführt. Die THP-Glykosylierung wurde an Tag 0 (unbehandelte Kontrolle) und nach oraler Gabe eines Schachtelhalmextraktes an Tag 6 untersucht. Es konnte keine Veränderung der THP-Glykosylierung in der Gesamtpopulation aller Proband\*innen (N = 4 + 4), aber auch nicht bei den weiblichen Proband\*innen (nicht gezeigt) festgestellt werden. Männliche Probanden (Abb. 4) zeigten nach p.o. Intervention eine signifikante Reduktion einiger Glykane: **G30** (fukosyliert), **G8** (fukosyliert und sulfatiert), **G13** (fukosyliert und sulfatiert), **G4** (sulfatiert), **G9/2** (hoch mannosyliert) und tendenziell erhöhte Mengen an **G25** (4-fach verzweigt, nicht fukosyliert).

Eine Reduktion mannosylierter Glykane nach p.o. Intervention scheint in Bezug auf die UTI-Prävention tendenziell zum Nachteil zu sein. Allerdings konnte in der vorherigen Studie gezeigt werden, dass der Urin von Proband\*innen nach Behandlung mit *Equiseti herba* Extrakt die *in vitro* Adhäsion von UPEC NU14 an T24 Blasenellen vermindern konnte [4]. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um die physiologische/biochemische Funktion der Fucose in THP-N-Glykanen zu bestimmen. Auch hier konnte ein geschlechtsabhängiger Effekt beobachtet werden.

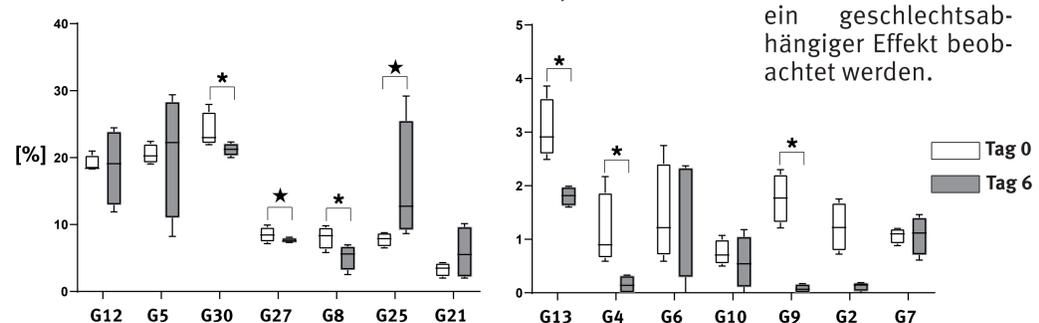


Abbildung 4: Relative Quantifizierung der N-Glykane von THP nach p.o. Einnahme eines *Equiseti herba* Extraktes. A Subgruppen Analyse männlicher Probanden (n = 4) im Vergleich von Tag 0 (weiß) zu Tag 6 (grau). Für die statistische Analyse wurde ein Mann-Whitney test durchgeführt (nicht-parametrisch): \* p < 0,05, \*\* p < 0,001; ★ 0,15 > p > 0,05.