

Novel functional and genetic findings in Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease

Abstract

Approximately 160 different rare kidney diseases (RKD) are reported to date, however, the molecular basis of the majority (50-80%) of inherited nephropathies are still unknown. The development of effective therapeutic strategies requires fundamental knowledge about the involved genes and molecular pathomechanisms. In my PhD research, I focused on the autosomal dominantly inherited group of tubulointerstitial kidney disease (ADTKD) resulting in end stage renal disease (ESRD) from middle to late adulthood. To date, four causative genes for ADTKD has been identified: UMOD, HNF1 β , REN, and MUC1. However, the genetic and pathophysiologic basis of ADTKD is not well characterized thus far. Screening of potential candidate genes in our cohort of 78 independent families and sporadic cases presenting with typical features of ADTKD (slow progressive kidney failure and hyperuricemia) was performed using different common methods (such as Sanger sequencing, genome-wide linkage analysis, or targeted NGS). Additionally, several functional assays were performed in order to elucidate the underlying pathogenesis. Direct Sanger sequencing revealed the identification of two novel mutations in the REN gene (c.28T>C, p.W10R and c.77C>T, p.T26I). The c.28T>C mutation is located in the hydrophobic region (h-region) of the signal sequence in REN, which is responsible for the transport through the endoplasmic reticulum (ER) membrane. Functional studies proved that this mutant clearly reduced ER cotranslational translocation and processing, which are both necessary for prorenin/renin secretion and activity. Furthermore, we showed that glycosylation and proteolytic in vitro activation of prorenin were not abolished. However, stability of the cytoplasmic accumulated nascent preprorenin was significantly reduced. Out of the only seven causative REN mutations reported so far, c.77C>T (p.T26I) proved to be the first mutation located outside of the REN signal peptide sequence. The propeptide mutation at position 3 beyond the signal peptidase cleavage site might affect the cleavage window and, thereby, slowing down the proteolytic process. Functional analyses proved that ER translocation is affected only slightly, but synthesis of preprorenin to prorenin is decelerated. Proteolytic in vitro activation of prorenin to mature renin was not affected, whereas ER stress and unfolded protein response were induced. It is most likely that both mutant proteins have a dominant toxic effect gradually reducing the viability of renin-expressing juxtaglomerular cells resulting in intra-renal renin-angiotensin system alterations, nephron dropout and progressive kidney failure.

In addition, we identified two multi-generation families showing linkage to the ADTKD-MUC1 locus on chromosome 1q21 by genome-wide linkage analyses. Due to the high complexity of

the MUC1 variable number of tandem repeat (VNTR) region the identification of the underlying genetic mutation (c.428insC) is not possible by direct Sanger sequencing or massive parallel sequencing tools. To specifically identify the insertion of a cytosine into a stretch of seven cytosines in a single copy of the canonical 60mer repeat of the MUC1 VNTR, we established a SNaPshot minisequencing approach based on previously published protocols. The InsC was identified in one of the multi-generation families previously linked to the ADTKD-MUC1 locus and one further family with ADTKD. This probe extension based method is restricted to the identification of this certain mutation. Therefore, I developed a novel targeted NGS approach to specifically enrich the VNTR region using oligonucleotide baits with MUC1 analogue sequences. This approach provides a novel technique to display single repeat units and to identify further mutations next to the cytosine insertion. Moreover, we were able to amplify the complete MUC1 VNTR and showed distinct PCR products for the first time, which were used for single molecule, real time (SMRT) sequencing with the PacBio RS II system. Thereby, we generated single reads spanning the complete MUC1 VNTR structure for the first time. By using both novel approaches we could not identify any further mutations or large structural variations within the VNTR in our second large family showing linkage to the ADTKD-MUC1 locus. The effects of the InsC in the MUC1 gene resulting in a premature stop codon are not well characterized so far. To further investigate the effects on protein level we designed MUC1 wild type and frameshift protein expression constructs. The frameshift protein was not detectable after overexpression in a cell system by Western blot and mass spectrometry analysis. The detection of the frameshift protein in urine samples of affected individuals from ADTKD families was unsuccessful so far as well. However, we observed reduced MUC1 wild type protein levels in urine samples and kidney biopsies from affected individuals indicating a dominant toxic effect of the aberrant protein. In conclusion, my results provide novel insights into the pathophysiology of ADTKD-REN and increase the spectrum of known mutations, as we identified a mutation in the propeptide of renin. In addition, I developed two alternative strategies to identify the only known and so far unknown mutations in the MUC1 VNTR domain causing ADTKD. By using targeted NGS and SMRT sequencing with the PacBio RS II system, we provide novel powerful tools to gain more insight into the VNTR assembly.

Zusammenfassung

Bisher wurden nahezu 160 verschiedene seltene Nierenkrankheiten (RKD) beschrieben. Allerdings konnte die genetische Ursache in der Mehrzahl dieser Nephropathien (50 – 80 %) bislang nicht geklärt werden. Die Entwicklung effektiver therapeutischer Strategien benötigt unabdinglich fundamentales Wissen über die involvierten Gene und die zugrundeliegenden Pathomechanismen in den verschiedenen RKD Subtypen. Während meiner PhD Zeit habe ich mich auf eine Gruppe autosomal dominant vererbter tubulointerstitieller Nierenerkrankungen (ADTKD) fokussiert, die zu terminalem Nierenversagen im mittleren bis späten Erwachsenenalter führen. Bis heute wurden in insgesamt vier verschiedenen Genen kausale Mutationen identifiziert: UMOD, HNF1 β , REN und MUC1. Allerdings sind die genetische Grundlage und vor allem die Pathogenese von ADTKD noch nicht endgültig geklärt.

Die Sequenzierung potentieller Kandidatengene wurde in unserer Kohorte von insgesamt 78 unabhängiger Familien und sporadischen Einzelfällen mit typischem ADTKD Phänotypen (langsam progredientem Nierenversagen und Hyperurikämie) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Methoden, wie Sanger Sequenzierung, genomweite Kopplungsanalysen oder gezielte Sequenzierung der dritten Generation, angewandt. Außerdem wurden verschiedene funktionelle Analysen durchgeführt, um die zugrunde liegende Pathogenese weiter aufklären zu können. Durch direkte Sanger Sequenzierung konnten wir zwei neue Mutationen im Gen REN identifizieren (c.28T>C, p.W10R and c.77C>T, p.T26I). Die c.28T>C Mutation liegt in der hydrophoben Region der Signalsequenz des Proteins, welche für den Transport durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verantwortlich ist. Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass diese Mutation die co-translationale Translokation in das ER und die weitere Prozessierung des Proteins beeinträchtigen. Beide Schritte sind für die Prorenin und Renin Sekretion in das Plasma und die spätere Proteinaktivität von hoher Bedeutung. Weiterhin konnten wir zeigen, dass weder die Glykosylierung von prozessiertem Prorenin noch die proteolytische in vitro Aktivierung durch die Mutation beeinträchtigt sind. Die Stabilität des zytoplasmatisch akkumulierten Preprorenins war jedoch deutlich reduziert. Von den insgesamt sieben bisher bekannten REN Mutationen ist der Basenaustausch von Cytosin nach Tyrosin an Position 77 die erste Mutation, die außerhalb des Signalpeptides gefunden wurde. Die Propeptidmutation an Position 3 nach der Signalpeptidase-Schnittstelle beeinflusst möglicherweise die Erkennungssequenz der Peptidase und führt zu einer verlangsamten proteolytischen Prozessierung. Funktionelle Analysen des mutierten Proteins konnten zeigen, dass die ER Translokation nur geringfügig, die weitere Synthese von Prorenin zu Renin jedoch deutlich beeinträchtigt war. Die proteolytische in vitro Aktivierung von Prorenin zu Renin wird durch die Mutation nicht verhindert, wohingegen ER-Stress als Antwort auf ungefaltete

Proteine ausgelöst wird. Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben beide mutierte Proteine einen dominant toxischen Effekt, wodurch die Lebensfähigkeit der Renin-exprimierenden juxtaglomerulären Zellen reduziert und dadurch intrarenale Änderungen im Renin-Angiotensin-System, Nephronschädigungen, und progredientes Nierenversagen verursacht werden können.

Desweiteren haben wir durch genomweite Kopplungsanalysen zwei Multigenerationfamilien mit Kopplung auf den ADTKD-MUC1 Locus identifizieren können. Aufgrund der hohen Komplexität der „variablen Anzahl von Tandemrepeat“ (VNTR) Region im MUC1 Gen ist die genetische Identifikation der krankheitskausalen Mutation (c.428insC) durch direkte Sanger Sequenzierung oder Sequenzierungsmethoden der dritten Generation bislang nicht möglich. Um spezifisch die Insertion eines Cytosins in einen Abschnitt mit sieben aufeinanderfolgenden Cytosinnukleotiden (InsC) in einer einzigen Kopie des kanonischen 60-Basenpaar Repeats des MUC1 VNTR identifizieren zu können, haben wir basierend auf bereits veröffentlichter Protokolle eine SNaPshot Minisequenzierungs-Methode etabliert. Die InsC konnte in einer der beiden ADTKD-MUC1 kopplungspositiven Multi-Generationen Familie und einer weiteren Familie nachgewiesen werden. Diese Sonden-verlängernde basierte Methode ist allerdings nur auf die Identifizierung der Cytosinininsertion beschränkt. Aufgrund dessen haben wir eine neuartige zielgerichtete next-generation Sequenzierungsstrategie entwickelt, bei der mit Hilfe von MUC1 Sequenz analogen Oligonukleotiden spezifisch die VNTR Region angereichert wird. Mit dieser Methode haben wir eine innovative Technik entwickelt um erstmalig die vollständige Sequenz einzelner Repeateinheiten darstellen und mögliche unbekannt Mutationen identifizieren zu können. Desweiteren haben wir durch PCR Amplifikation erstmalig distinkte Produkte des MUC1 VNTR generieren können, die für eine single molecule, real-time (SMRT) Sequenzierung mit einem PacBio RS II System eingesetzt werden konnten. Dadurch konnten wir Einzelreads generieren, welche die vollständige MUC1 VNTR Struktur erstmalig zusammenhängend abbilden konnten. Mit Hilfe dieser beiden neuen Methoden konnten wir bisher keine weiteren Mutationen oder strukturelle Veränderungen im MUC1 Gen in unserer zweiten Familie mit Kopplung auf den ADTKD-MUC1 Locus nachweisen.

Die Auswirkungen der InsC im MUC1 Gen, die zu einem frühzeitigen Stop-Codon führt, sind bislang nur in geringem Maße charakterisiert worden. Um weiterhin zur Aufklärung der Auswirkungen der Mutation beitragen zu können, haben wir Expressionskonstrukte mit MUC1 Wildtyp Sequenz oder mit der entsprechenden Leserasterverschiebung generieren lassen. Das mutierte Protein war nach Überexpression im Zellsystem mittels Western Blot und massenspektrometrischer Analyse nicht zu identifizieren. Das mutierte Protein war ebenfalls nicht in Urinproben betroffener Individuen aus ADTKD Familien nachzuweisen. Allerdings konnten wir beobachten, dass in den betroffenen Individuen deutlich weniger bis kein Wildtyp

MUC1 Protein zu finden ist. Dies deutet möglicherweise auf einen dominant toxischen Effekt des aberranten Proteins hin.

Zusammenfassend ermöglichen meine Ergebnisse neue Einblicke in die Pathophysiologie des ADTKD Subtypen ADTKD-REN und erweitert das Spektrum bisher bekannter Mutationen, da wir mit der Propeptid Mutation im REN Gen eine vollkommen neuartige Veränderung beschrieben haben. Außerdem haben wir zwei gänzlich neuartige Methoden entwickeln können, die zum einen stabilere und verlässlichere Alternativen zum Nachweis der bisher einzigen ADTKD verursachenden Mutation im MUC1 Gen darstellen. Zum anderen liefern diese beiden Methoden die Möglichkeit weitere bisher unbekannte Mutationen im MUC1 VNTR zu identifizieren, die ebenfalls einen ADTKD Phänotypen hervorrufen könnten. Sowohl mit der zielgerichteten next-generation als auch mit der SMRT Sequenzierung haben wir zwei neue Methoden entwickeln können, die bisher einzigartige Einblicke in die Struktur des MUC1 VNTRs liefern konnten.