

Molecular studies of FLCN-related diseases

Citation for published version (APA):

Luijten, M. N. H. (2014). *Molecular studies of FLCN-related diseases*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20141212ml>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20141212ml](https://doi.org/10.26481/dis.20141212ml)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Birt-Hogg-Dubé syndrome (BHD; OMIM #135150) is an autosomal dominant disorder predisposing to benign facial tumours called fibrofolliculomas, lung cysts, pneumothorax and renal cancer. BHD is a rare disorder; approximately 200 families have been diagnosed worldwide. The syndrome is caused by mutations in the *FLCN* gene, most of which truncate its protein product, folliculin (FLCN). Current therapeutic options for BHD patients are limited and can only treat symptoms, not the underlying cause. To develop BHD-specific treatment and strategies to prevent renal cancers from developing, it is crucial to unravel BHD pathophysiology and FLCN's function in cellular physiology.

FLCN is highly conserved throughout evolution, suggesting an important biological role. The protein is thought to act as a tumour suppressor and has been implicated in the regulation of various signalling pathways and cellular processes. However, how *FLCN* mutations cause cellular defects that lead to the BHD phenotype remains to be determined.

An emerging aspect of the BHD phenotype is cyst formation in organs including the lungs, liver, pancreas and kidney. Development of cystic organs is one of the hallmarks of a large group of disorders, the so-called ciliopathies, caused by malfunctioning of the primary cilium. This “cellular antenna” projects from the apical cell surface of non-proliferating epithelial cells. It is involved in chemo- and mechanosensation and provides transduction of various signalling pathways, including the Hedgehog pathway, the canonical Wnt pathway and the non-canonical Wnt pathway under control of planar cell polarity (PCP). The latter is of special interest, as PCP regulates oriented cell division in the kidney, leading to lengthening of the kidney tubules without changes in tubular diameter. Disruption of PCP causes cyst formation. As the BHD phenotype is clinically similar to the ciliopathies, we investigate the role of FLCN in the primary cilium in **Chapter 2**. We show that FLCN localises to primary and motile cilia and associated structures. Alteration of FLCN levels causes changes in ciliogenesis, polarised growth of kidney cells and canonical Wnt signalling. Expression of FLCN-K508R mutant protein does not affect ciliogenesis in monolayer and only mildly affects polarised growth, suggesting that the mutant protein has lost a large part of its functionality. Together these data show that BHD is a novel ciliopathy caused by malfunctioning of the primary cilium. As defective ciliogenesis has been reported to result in cyst formation, these data explain how loss of FLCN leads to a cystic phenotype in BHD patients.

Determining protein interaction may give an insight into the cellular functions of a protein of interest. Thus, novel interactors for FLCN were identified, including folliculin interacting protein 1 (FNIP1). *In vitro*, FNIP1 was shown to support the

role of FLCN in various pathways, suggesting that FLCN and FNIP1 have a similar function.

It is therefore surprising that humans with a *FNIP1* mutation only have a relatively mild skin phenotype, described in **Chapter 4** as familial multiple discoid fibromas (FMDF; OMIM %190340). We identify a heterozygous mutation in *FNIP1* in FMDF patients and show that the mutant *FNIP1* mRNA is broken down by nonsense-mediated decay, suggesting that FMDF is caused by FNIP1 haploinsufficiency. FMDF patients develop skin lesions resembling those found in BHD but they have different histopathology, are often localized on the ears and are of childhood onset, while the BHD lesions typically appear after the age of 25. Moreover, we found no evidence for pulmonary or renal complications, which could be due to tissue-specific compensation by FNIP2 or functional redundancy between FNIP1 and FNIP2. Alternatively, loss of a single *FNIP1* allele might simply be tolerated in these tissues, possibly as a result of higher baseline FNIP1 levels compared to skin.

Although we show that FNIP1 localises to the primary cilium, similar to FLCN, our data presently do not support ciliary dysfunction as a major contributing factor to FMDF development. Thus, the cellular mechanism that causes FMDF remains to be determined.

In vitro studies have certain limitations, primarily because cultured cells are maintained in an artificial environment in which interactions between cells and tissues cannot be mimicked. Therefore, we aimed to study the function of FLCN and FNIP1 in an animal model. Studies using experimental animals have shown that FLCN is required for embryonic development, but the exact developmental role of the protein is difficult to examine in available animal models as homozygous *FLCN* knockout causes embryonic lethality in mammals. Mice with homozygous knockout of *Fnip1* are viable, although development of particular immune cell subsets is affected. However, how this translates to the FMDF lesions is currently unclear. Thus, we sought a different animal model that would allow us to examine the role of FLCN and FNIP in development.

Zebrafish (*Danio rerio*) are very well suited to study the pathophysiology of both developmental defects and carcinogenesis, because of their *ex vivo* development enabling easy visualisation and manipulation, their large offspring production and their similar tumour formation to humans. In addition, many ciliopathies have been modelled in zebrafish and these models show similar phenotypes. Therefore, we characterise zebrafish loss of function models for Flcn and Fnip1 in **Chapter 3 and 4** in order to learn more about the function of these proteins.

Zebrafish *flcn* and *fnip1* have similar expression patterns throughout development as determined by whole mount *in situ* hybridization. Both genes are expressed in the eye, fin bud, somites and regions of the brain. Zebrafish Flcn and

Fnip1 loss of function models show that both proteins are required for zebrafish embryogenesis, as their deficiency causes a severe developmental phenotype characterised by brain oedema, problems with tail circulation and a larger yolk and thinner yolk extension in 2-day old morphants. Although part of these morphant phenotypes is reminiscent of ciliopathy zebrafish models, we did not detect any obvious defects in the appearance of cilia in either pronephros or central canal after extensive whole mount immunofluorescent studies using acetylated alpha tubulin antibodies in the *flcn* and *fnip1* morphants. However, the normal appearance does not rule out the possibility that the cilia that were detected in the morphants might not be functional.

Alternatively, these phenotypes may be caused by cell cycle defects. In zFucci transgenic embryos, the G1 phase of the cell cycle is fluorescently labelled red and S, G2 and M are labelled green. zFucci *flcn* morphants have a decreased amount of cells in S-M phase and a corresponding increase in G1 cells, particularly in the retina and compartments of the brain including the tectum. It remains to be determined if Flcn directly regulates the cell cycle in these embryos or whether these defects are secondary, possibly resulting from metabolic defect caused by Flcn deficiency.

Although its exact function is not completely understood, it has become clear that FLCN is vital for cellular physiology. FLCN regulates ciliogenesis, orientation of the mitotic spindle and canonical Wnt signalling. Malfunctioning or loss of primary cilia has been reported to drive cyst formation, explaining how loss of FLCN leads to a cystic phenotype in BHD patients. However, it remains to be determined how loss of FLCN leads to cancer. Recent studies on the crystal structure of FLCN's carboxyl-terminus and on FLCN's role in regulating lysosomal GTPases suggest that FLCN may be a major regulator of vesicle transport through a GAP and/or GEF function towards small GTPases of the Ras superfamily, including RhoA, Rab and Ran. This hypothesis would not only explain how FLCN affects ciliogenesis, but also why FLCN deficiency has such widespread cellular consequences. Further research is required to investigate this hypothesis and unravel the cellular role of FLCN and its interactors, including FNIP1. However, even if complete understanding of the function of FLCN and FNIP1 is lacking, potential therapeutic targets may be identified, using the novel zebrafish loss of function models described in this thesis. In addition, investigation of BHD pathophysiology may provide a unique opportunity to study the aetiology of clinical manifestations common in the general population, such as renal cyst formation and renal cell carcinoma. As FLCN is an ancient and crucial component of the cellular machinery, elucidating its functions will provide biological insights that are certain to profoundly affect other field of inquiry.

Samenvatting

Birt-Hogg-Dubé syndroom (BHD) is een erfelijke ziekte, vernoemd naar de drie Canadese artsen Arthur Birt, Georgina Hogg en William Dubé. BHD is zeldzaam; wereldwijd zijn er slechts 200 families bekend met dit syndroom. Tachtig procent van de BHD patiënten ontwikkelt goedaardige tumoren in de vorm van huidkleurige bultjes op het gezicht, de nek en het bovenlichaam. Daarnaast heeft 80% van de patiënten longcysten, die kunnen leiden tot klaplongen. Het meest bedreigende voor BHD patiënten is echter een verhoogd risico van 20-30% op nierkanker.

BHD wordt veroorzaakt door veranderingen in het DNA, zogenoemde mutaties, van het *FLCN* gen. Een gen is een functioneel stuk DNA waar een eiwit van gemaakt wordt. Bijna alle cellen van het menselijk lichaam bevatten twee kopieën van elk gen, één kopie afkomstig van de moeder en één van de vader. BHD erft dominant over, wat inhoudt dat mensen de ziekte ontwikkelen zodra ze van hun vader óf van hun moeder een gemuteerde kopie krijgen. Bij de geboorte is dan in alle cellen van het lichaam één gemuteerde en één normale *FLCN* kopie aanwezig. Niet alle BHD families hebben dezelfde mutatie in het *FLCN* gen. Ongeveer 100 verschillende BHD-veroorzakende mutaties zijn beschreven. Van het *FLCN* gen wordt het eiwit folliculine (*FLCN*) gemaakt en de meeste mutaties leiden tot de productie van een verkort *FLCN* eiwit.

De behandeling van BHD patiënten bestaat momenteel uit symptoombestrijding. De huidtumoren en nierkanker kunnen operatief worden verwijderd, maar er is een grote kans dat ze terugkomen. Om specifieke behandelingen te ontwikkelen of om mogelijk de symptomen te kunnen voorkomen, is het van groot belang dat we weten wat *FLCN* precies doet en hoe mutaties in *FLCN* BHD veroorzaken.

Door eiwitten van verschillende diersoorten digitaal met elkaar te vergelijken hebben we gezien dat *FLCN* in de loop van de evolutionaire ontwikkeling behouden is gebleven, wat suggereert dat het een belangrijke functie heeft. Omdat in de niertumoren van BHD patiënten zowel de *FLCN* kopie van de moeder als van de vader een mutatie heeft, wordt aangenomen dat *FLCN* onder normale omstandigheden tumorvorming blokkeert (i.e. tumor suppressor). Wanneer gedurende het leven van BHD patiënten de gezonde *FLCN* kopie ook gemuteerd raakt, valt deze blokkering weg en kunnen tumoren ontstaan. Hoe deze blokkering precies werkt binnen cellen en waarom hij wegvalt als *FLCN* gemuteerd raakt proberen we te ontrafelen met het onderzoek in dit proefschrift.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift wordt beschreven dat BHD patiënten niet alleen in hun longen cysten ontwikkelen, maar ook in andere organen waaronder de lever, de alvleesklier en de nieren. Een soortgelijke cystenvorming wordt gezien bij een grote groep andere ziekten bekend als de ciliopathiën, die allemaal door hetzelfde mechanisme veroorzaakt worden. Bij de ciliopathiën werken de trilharen

(cilia) niet meer goed. Bijna alle cellen van het menselijk lichaam hebben één trilhaar, een soort cellulaire antenne, die vanaf het celmembraan uitsteekt naar de omgeving van de cel. Deze trilhaar stelt de cel in staat omgevingsignalen op te vangen en hierop te reageren door signalering in de cel aan te passen. Studies met muizen hebben aangetoond dat wanneer deze trilharen niet meer goed werken cysten kunnen ontstaan. Omdat BHD patiënten ook cysten krijgen, is in **Hoofdstuk 2** onderzocht of FLCN een rol speelt bij het functioneren van deze trilharen.

Dit onderzoek heeft aangetoond dat FLCN aanwezig is in verschillende soorten trilharen. Daarnaast hebben we minder trilharen gedetecteerd op cellen waarin FLCN kunstmatig verlaagd of verhoogd is. Om te bestuderen of FLCN een rol speelt in het functioneren van de trilharen, gebruiken we een model om de communicatie tussen cellen en hun omgeving te simuleren. Daarvoor worden niercellen in collageen gekweekt. De cellen vormen dan sferoiden, balvormige structuren met in het midden een holle ruimte waar trilharen in steken. Manipulatie van FLCN in deze kweken leidt tot kleinere sferoiden met minder trilharen en kleinere holtes, waar nog cellen in zitten. Het inbrengen van mutant FLCN in deze systemen heeft geen effect op de vorming van trilharen en sferoiden, wat suggereert dat het mutante eiwit niet functioneel is.

Deze data laten zien dat BHD een nieuwe ciliopathie is, die wordt veroorzaakt door verstoring van de trilharen. Omdat eerder onderzoek heeft aangetoond dat door defecte trilharen cysten kunnen ontstaan, kan dit verklaren waarom BHD patiënten cysten krijgen.

Een alternatieve manier om de functie van het eiwit FLCN te achterhalen is te bepalen aan welke andere eiwitten FLCN bindt. Wanneer van deze zogenoemde bindingspartners de functie bekend is, kan dit mogelijk informatie geven over wat FLCN doet. De afgelopen jaren zijn verschillende bindingspartners van FLCN geïdentificeerd, waaronder folliculin interacting protein 1 (FNIP1). In experimenten met celkweek lijkt het alsof FNIP1 zich hetzelfde gedraagt als FLCN.

Het is daarom verrassend dat mensen met een mutatie in het *FNIP1* gen alleen maar huidtumoren krijgen, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**. In een aantal families met familiale multipele discoïde fibromen (FMDf), die allen van één voorouder af blijken te stammen, hebben we een mutatie in één kopie van het *FNIP1* gen gevonden. Deze mutatie zorgt ervoor dat productie van het eiwit wordt verminderd. De patiënten krijgen dan huidtumoren die op het eerste gezicht lijken op de BHD tumoren. Echter, onder de microscoop zien deze tumoren er anders uit. Een ander onderscheid kan gemaakt worden in het moment van ontstaan. Mensen met FMDf ontwikkelen huidtumoren al tijdens de kindertijd, terwijl de BHD huidtumoren na het 35ste levensjaar ontstaan. Daarnaast hebben FMDf patiënten, voor zover bekend, geen afwijkingen aan de longen of nieren. Hieruit blijkt dat FLCN en FNIP1 in mensen niet dezelfde functie hebben. Mogelijk is FNIP1 niet zo

CHAPTER 7

belangrijk in de longen en nieren, of kan verlies ervan worden opgevangen door andere eiwitten.

Net als FLCN bevindt FNIP1 zich ook in de trilharen, maar kunstmatige vermindering van FNIP1 in cellen leidt niet tot een verandering van het aantal trilharen. Hoe verminderde productie van FNIP1 leidt tot ontwikkeling van de huidtumoren is nog niet bekend.

Wetenschappelijk onderzoek met cellen (*in vitro*) heeft enkele beperkingen. Cellen worden onder kunstmatige omstandigheden gekweekt en de interactie tussen verschillende weefsels kan niet worden bekeken. Daarom is het nuttig FLCN en FNIP1 in een diermodel (*in vivo*) te bestuderen.

FLCN is belangrijk voor de embryonale ontwikkeling van zoogdieren. Muizen, ratten en honden waarbij de beide kopieën van het *FLCN* gen een mutatie hebben, sterven tijdens de ontwikkeling. Het is moeilijk te achterhalen waarom dit precies gebeurt, omdat de embryo's zich dan nog in de baarmoeder bevinden. Muizen waarbij beide kopieën van het *FNIP1* gen gemuteerd zijn worden wel geboren, maar hebben een verstoring in bepaalde cellen van het afweersysteem. Hoe zich dit vertaalt naar FMDF bij mensen is onduidelijk.

Zebravissen zijn zeer geschikt voor onderzoek naar zowel de embryonale ontwikkeling als naar kanker. Tumorstorming in vissen lijkt op die in mensen. Daarnaast produceren zebravissen grote aantallen nakomelingen. De moeder zet de eieren af in het water (zoals kikkerdril) waarna de vader ze bevrucht. Doordat ze buiten het lichaam van de moeder groeien, is de ontwikkeling van zebravis embryo's gemakkelijk onder een microscoop te bekijken en te manipuleren. De embryo's ontwikkelen zich razendsnel; binnen twee dagen zijn de voorlopers van de belangrijkste organen al te zien. Daarnaast zijn voor een aantal van de ciliopathiën zebravismodellen gemaakt, die op elkaar lijken. Daarom worden in **Hoofdstuk 3 en 4** zebravis modellen voor het verlies van FLCN en FNIP1 gekarakteriseerd.

Eerst hebben we bepaald of en waar in het zebravis embryo Flcn en Fnip1 aangemaakt worden. Tijdens de ontwikkeling worden beide eiwitten geproduceerd in dezelfde structuren, waaronder voorlopers van de vinnen, bepaalde delen van de hersenen, het oog en de somieten (voorlopers van de wervelkolom, de ribben, een deel van de huid en de rugspieren). Daarnaast hebben we gezien dat Flcn en Fnip1 allebei nodig zijn voor de embryonale ontwikkeling van de zebravis. Verstoring van de productie van Flcn of Fnip1 in bevruchte eicellen veroorzaakt problemen in twee dagen oude embryo's, waaronder vochtophoping in de hersenen, verstoorde bloedsomloop in de staart en een vergrootte dooierzak. Een deel van deze problemen wordt ook gezien bij zebravismodellen voor ciliopathiën, maar er werden geen afwijkingen in de trilharen van deze embryo's gedetecteerd. Mogelijk functioneren de trilharen niet goed, ondanks dat ze er normaal uit zien.

Het zou ook kunnen zijn dat de verstoring van embryonale ontwikkeling als gevolg van verminderd Flcn of Fnip1 het resultaat is van een verstoorde celdeling. De Fucci transgene zebravis lijn heeft kunstmatig aangepast DNA, waardoor de cellen van deze vissen in verschillende fasen van de celcyclus een andere kleur fluorescent licht uitstralen. Fucci zebravis embryos met verminderd Flcn hebben een lager aantal delende cellen in S, G2 en M fase en een verhoogd aantal niet-delende cellen in G1 fase, voornamelijk in het oog en in delen van de hersenen. Het is momenteel niet bekend of Flcn zelf de celcyclus reguleert of dat deze defecten indirect zijn doordat Flcn bijvoorbeeld het metabolisme beïnvloedt.

Wat FLCN precies doet is niet bekend, maar het is de afgelopen jaren wel duidelijk geworden dat FLCN van groot belang is voor het normaal functioneren van cellen. Zo reguleert FLCN de trilharen en vorming van sferoïden. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat wanneer de trilharen niet goed werken, cysten kunnen ontstaan. Dit verklaart waarom mensen met *FLCN* mutaties cysten krijgen, maar niet waarom mutatie van *FLCN* kanker veroorzaakt. Recente studies suggereren dat FLCN het transport van andere eiwitten tussen verschillende delen van de cel verzorgt. Omdat dit transport van groot belang is voor allerlei cellulaire processen, waaronder de opbouw van de trilharen, zou deze hypothese niet alleen verklaren waarom de trilharen aangedaan zijn, maar ook waarom in cellen met verminderd FLCN een groot aantal andere processen verstoord zijn. Meer onderzoek is nodig om te kijken of deze hypothese klopt en om te achterhalen wat de echte functie is van FLCN en zijn bindingspartners, waaronder FNIP1. Zelfs als we niet precies weten wat FLCN en FNIP1 doen is het misschien mogelijk om nieuwe behandelingen te ontwikkelen voor BHD en FMDF met behulp van de zebravismodellen beschreven in dit proefschrift. Omdat zebravissen veel nakomelingen produceren die eenvoudig zijn bloot te stellen aan geneesmiddelen door deze slechts aan hun omgevingswater toe te voegen, zijn deze modellen zeer geschikt om op grote schaal medicijnen te testen. Hierbij worden mogelijk middelen gevonden die de problemen veroorzaakt door verlaagd FLCN of FNIP1 kunnen verhelpen. Deze medicijnen kunnen wellicht gebruikt worden om BHD/FMDF patiënten te behandelen.

Ondanks dat BHD een zeldzame ziekte is, is het van groot belang dat we erachter komen hoe BHD ontstaat. Een aantal van de symptomen van BHD, zoals cystenvorming en nierkanker, komt namelijk veel vaker voor bij de algemene bevolking. Daarom zal dit onderzoek naar alle waarschijnlijkheid ook inzicht geven in deze veelvoorkomende medische problemen. Aangezien FLCN een oeroud onderdeel is van de cel, zal het onderzoeken van zijn functie ongetwijfeld inzichten opleveren die ook voor andere vakgebieden van belang zullen zijn.