



**Università degli Studi di Palermo**

Dottorato di ricerca in: Scienze Urologiche  
Ciclo XXII°  
Settore Scientifico Disciplinare: MED 24

*Sindrome di Birt, Hogg, Dubè: analisi genica  
della componente neoplastica renale.*

Tesi di dottorato della Dott.ssa Giada Sisino

Relatore: Prof. Rainer Barbieri

Coordinatore: Prof. Carlo Pavone

ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	<i>pag3</i>
<i>Aspetti Clinici</i> .....	<i>pag5</i>
<i>Aspetti Genetici</i> .....	<i>pag21</i>
<i>Funzione della follicolina</i> .....	<i>pag26</i>
<b>Scopo della ricerca</b> .....	<i>pag35</i>
<b>Materiali e Metodi</b> .....	<i>pag36</i>
<i>Preparazione di cellule mononucleate</i> .....	<i>pag36</i>
<i>Estrazione di DNA</i> .....	<i>pag37</i>
<i>Estrazione di RNA totale citoplasmatico</i> .....	<i>pag38</i>
<i>Polymerase chain reaction</i> .....	<i>pag39</i>
<i>Preparazione di cellule XL1-Blue competenti</i> .....	<i>pag52</i>
<i>Cloning dei frammenti di DNA amplificati</i> .....	<i>pag53</i>
<i>Trasformazione di cellule competenti</i> .....	<i>pag55</i>
<i>Analisi dei cloni ricombinanti</i> .....	<i>pag 56</i>
<i>RT-PCR</i> .....	<i>pag57</i>
<b>Risultati</b> .....	<i>pag 59</i>
<b>Conclusioni</b> .....	<i>pag70</i>
<b>Bibliografia</b> .....	<i>pag72</i>

# Introduzione

La sindrome di *Birt-Hogg-Dube* (BHDS) è una genodermatosi autosomica dominante, caratterizzata da tumori benigni al follicolo pilifero (fibrofolliculoma), da cisti polmonari, da pneumotorace spontaneo e da neoplasia renale. Mentre la presenza di polipi e cancro al colon, anche se riscontrata in alcuni casi, non è statisticamente significativa da potere essere annoverata come aspetto della sindrome.

La sindrome BHD ha origine da una mutazione germinale nel gene FLCN/BHD che mappa sul braccio corto del cromosoma 17 (17p12p11).

Il prodotto di questo gene è la folliculina, una proteina la cui funzione non è ancora del tutto chiara; ma l'ipotesi più accreditata è che si tratti di un oncosoppressore.

Numerose, sono le mutazioni descritte a carico di questo gene e diversi studi sono attualmente in corso per determinare la relazione tra tali mutazioni e lo sviluppo delle varie manifestazioni della patologia, in particolare il carcinoma renale che rappresenta la patologia più grave.

Ogni paziente può presentare solo alcune delle caratteristiche fenotipiche relative alla sindrome (penetranza incompleta), e queste possono avere un diverso livello di gravità che varia da soggetto a soggetto (espressività variabile).

Si tratta di una malattia rara, che si verifica con un caso ogni 200.000 individui. Le lesioni cutanee si sviluppano solo dopo la pubertà (di solito superati i 25 anni), e questo sintomo ha una forte penetranza (oltre l'85% dei

casi ), ma hanno sempre carattere benigno e non hanno conseguenze sulla salute del soggetto. Anche le cisti polmonari hanno un'alta penetranza nei pazienti affetti da BHD. Il pneumotorace spontaneo, si sviluppa solitamente entro i 40 anni, a differenza delle altre patologie, legate alla sindrome che aumentano le loro probabilità di insorgenza con l'avanzare dell'età.

### *Aspetti Clinici*

Sebbene la maggior parte dei tumori renali insorgono sporadicamente, circa il 4% di essi sono associabili a malattie trasmesse ereditariamente, come la sindrome di *Beckwith-Wiedemann*, associata al tumore di *Wilms*; la sindrome di *Von Hippel-Lindau* associata alla presenza di cellule renali cancerose (RCC), la *Sclerosi Tuberosa*, associata a RCC papillari ereditarie e oncocitoma renale familiare; e la sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*, una patologia

clinica complessa associabile allo sviluppo di neoplasie renali.

Nel 1975, *Hornsten e Knicberg* (1) riscontrarono, in due fratelli, una sindrome caratterizzata sia da *fibromi perifollicolari* presenti su viso, collo e tronco, che da diversi polipi intestinali. Questi fibromi epidermici erano simili in entrambi i fratelli. Anche il padre presentava le stesse lesioni cutanee e una storia clinica che annoverava cisti polmonari e renali. Gli autori, pertanto giunsero alla conclusione che si potesse trattare di una peculiare malattia cutaneo/intestinale ereditaria, non precedentemente descritta in letteratura.

Nel 1977, *Birt, Hogg e Dubè* (2) riportarono il caso di una famiglia, in cui 15 membri su 70 osservati, presentavano delle formazioni papulose multiple a forma di cupola, di colore bianco/giallognolo, di dimensione dai 2 ai 4 mm su volto, testa e collo. Tale fenomeno risultò essere trasmesso in maniera autosomica dominante. Queste molteplici piccole lesioni cutanee, erano intervallate da

veri tumori epidermici, che apparivano anche sulle palpebre superiori e nelle pieghe ascellari.

La analisi istologiche, della biopsie di tali papole, ha rilevato che si trattava di proliferazioni circoscritte del tessuto connettivo specializzato, intorno ai follicoli piliferi, variabilmente dilatati.

Gli autori coniarono il termine di *fibrofolliculoma* per descrivere queste lesioni. Inoltre, fu notato anche che *tricodiscomi* erano presenti in ben 3 dei 5 pazienti, che si erano sottoposti a biopsia. Un'altra caratteristica di queste lesioni era il fatto che si insorgevano in soggetti con oltre 25 anni di età.

In seguito alle osservazioni fatte, gli autori avanzarono l'ipotesi, poi rivelata esatta, che si trattasse di una malattia genetica autosomica.

Successivamente si comprese che le patologie descritte da *Hornsten e Knickeberg (1)* e *Birt et al. (2)* fossero riportabili entrambe ad una stessa sindrome che fu chiamata sindrome *di Birt-Hogg-Dubè (BHDS)* (3-4). Solo

in un secondo momento, dopo che furono identificati più di 30 gruppi familiari, i cui membri erano affetti da questa patologia, fu notato che in molti dei pazienti affetti aumentava l'incidenza di tumori renali, cisti polmonari e pneumotorace spontaneo, aspetti che non era stato menzionato da *Birt et al.*

### ***Patologie renali, associate alla BHDS.***

Come accennato precedentemente nei primi studi di *Hornsten e Knickeberg* e *Birt et al.*, lesioni renali non furono riscontrate o comunque non ricondotte al fatto che potessero essere patologie connesse alla sindrome.

Solo nel 1993, 18 anni dopo la prima descrizione della sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*, l'associazione tra la sindrome e neoplasie renali, fu palese.

Vari tipi istologici di tumori renali, vennero ricondotti alla BHDS, questi comprendevano: i tumori a cellule chiare, i papillomi renali, le RCC cromofobe, l'oncocitoma e i tumori ibridi (6-9)



Nel 1993 *Roth et al.* (7) dimostrarono per la prima volta l'associazione tra la sindrome di *Birt-Hogg-Dubè* e tumori renali bilaterali, attraverso la descrizione di un caso di neoplasia renale.

L'esame istopatologico fatto in seguito alla biopsia, rilevò la presenza di RCC chiare, RCC cromofobe e eosinofile, presenti nello stesso tumore.

Studiando tredici pazienti, ai quali era stata riscontrata la sindrome di BHD, *Toro et al.* (9), riscontrarono che sette di questi, erano affetti da neoplasie renali con oncocitomi e RCC papillari.

In un'analisi di 98 casi di pazienti affetti da BHDS, *Zbor et al.* (6) conclusero che il manifestarsi della malattia era in relazione con l'età del paziente e che almeno il 15% dei casi analizzati, presentavano tra gli aspetti patologici anche tumori renali.

Due caratteristiche fondamentali si possono riscontrare nei tumori renali, correlati alla sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*: nello stesso rene si possono sviluppare più tumori

(tumori multipli) con caratteristiche istopatologiche differenti ed inoltre che, all'interno dello stesso tumore, si possono riscontrare popolazioni cellulari distinte.

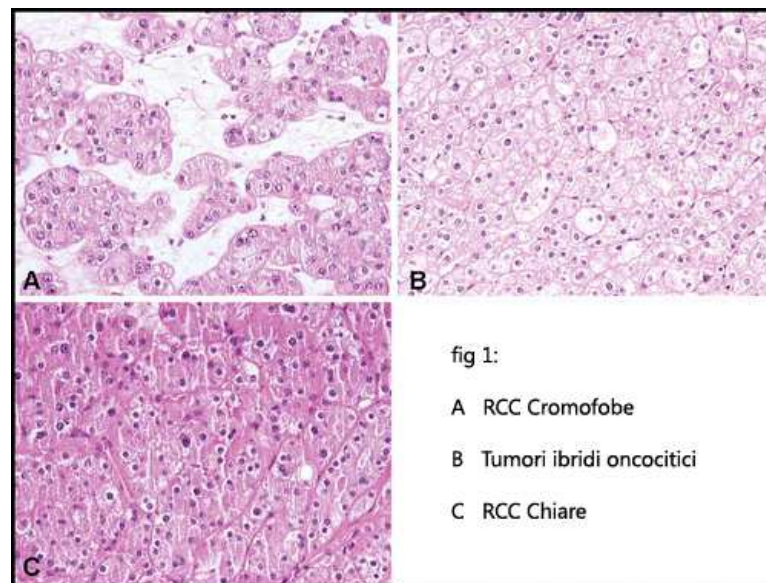
Studi successivi hanno, inoltre, osservato che i tumori renali riscontrati in pazienti con la sindrome di BHD presentavano sia RCC chiare, sia RCC papillari, sia RCC cromofore, oncocitomi ed i così detti ibridi oncocitici. Questi ultimi non erano mai stati descritti fino ad allora, e non sono mai stati riscontrati in associazione ad altre sindromi (10, 11).

Tra i tipi istologici citati l'RCC è tra quelli più diffusi per quanto riguarda i tumori correlati alla BHD (6, 10 e 11). Altra caratteristica dei tumori renali associati alla BHD è che questi si manifestano più precocemente rispetto ai casi di neoplasie sporadiche e molto spesso sono bilaterali.

***RCC cromofobe, oncocitomi e tumori ibridi.***

L'oncocitoma come le RCC cromofobe hanno origine dalle cellule intercalari dei tubuli collettori renali e condividono diverse caratteristiche istologiche (12); infatti sono fortemente simili nella loro espressione genetica, oltre che ad avere somiglianze morfologiche (13). Numerosi casi di neoplasia renale associata alla BHD appartengono a questi tipi istologici.

Infatti nello studio del 1998 di *Zbar et al.* viene riportato che, in 7 dei 14 casi di tumori correlati con la sindrome di BDH esaminati istologicamente, presentavano RCC cromofore (Figura 1A) .



In questi casi, un singolo tumore renale può essere composto da diverse popolazioni cellulari e si definisce tumore ibrido oncocitico (Figura 1B) ed ha caratteristiche istologiche riconducibili sia all'oncocitoma che alle RCC Cromofore.

Nel primo caso documentato di tumore renale associato alla sindrome di BHD, viene descritto come un "adenocarcinoma cromoforo con una popolazione mista di cellule chiare e cellule eosinofile"(7) dunque è possibile che, si trattasse in realtà di un tumore ibrido. Nel 2002 *Pavlovich et al.* (16) studiarono ben 130 tumori renali, in 30 soggetti affetti da BHD e facenti parte di 19 diverse famiglie. L'età media di questi pazienti era di 51 anni e di questi 25 erano maschi e 5 erano femmine, la maggior parte presentava tumori bilaterali multipli associati ad oncocitomi. Gli autori costatarono che il 50% dei tumori, fossero ibridi oncocitici, 32 % fossero formati

da RCC cromofobe e il 9% di cellule chiare, solo 7% erano oncocitomi e il 2% RCC papillari.

I tumori ibridi contenevano un mix di oncocitomi e cellule cromofobe e raramente si riscontravano cellule che presentavano aloni perinucleari.

L'esatto comportamento biologico dei tumori ibridi oncocitici non è ancora stato chiarito totalmente, ma negli studi preliminari di *Tick et al.*(10) e di *Pavlovich et al.* (16) non viene menzionato alcun caso di necrosi tumorale, invasioni vascolari o metastasi distanti .

Recentemente *Mai et al.* (17), esaminarono 5 tumori associati alla BHDS, compresi tra gli 1,8 e i 5 cm e non riscontrarono alcuna necrosi tumorale, mentre invasioni tumorali in vene di media dimensione furono riscontrati solo in un paziente e nessuno dei casi presentava metastasi lontane.

Da queste osservazioni, gli autori conclusero che i tumori ibridi, sia sporadici che associati alla sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*, hanno una prognosi essenzialmente

favorevole, dato che non vi sono casi riportati, in cui questo tipo di tumore si riveli essere aggressivo o maligno.

### *Cellule chiare e RCC papillari*

Anche questi tipi di tumori sono associati alla BHDS. Il primo caso di tumore renale associato alla BHDS, descritto da *Roth et al.* (7) infatti, presentava due tipi di lesioni, una delle quali era composta da cellule chiare (Figura 1C). Anche gli studi epidemiologici che abbiamo precedentemente menzionato (*Zbor et al.*) riportano che 4 dei 14 casi analizzati, presentavano tumori a cellule cancerose chiare. Anche i tumori con RCC papillari sono associabili alla BHDS, ma sicuramente sono meno frequenti rispetto a quelli a cellule chiare (8, 9, 16). Nel lavoro di *Pavlovich et al.* (16) è riportato che pazienti che presentavano RCC chiare spesso, avevano tumori multipli bilaterali e/o la presenza di RCC cromofobe e/o

oncocitomi. Le RCC chiare, tendono ad espandersi maggiormente, rispetto ad altri tumori renali.

L'analisi molecolare di RCC chiare, mostra una delezione di 3 basi a carico del gene VHL (*Von Hippel-Lindau*), dunque, i tumori a cellule cancerose chiare hanno mutazioni addizionali, e di conseguenza sono maggiormente aggressivi, rispetto agli ibridi tumorali o agli RCC cromofobi. *Pavlovich et al.* riscontrarono inoltre lesioni di tipo T3 e metastasi lifonodali in presenza di RCC chiare, in tre dei nove pazienti esaminati, presentavano cellule tumorali con tre nuclei e il resto dei pazienti presentavano cellule tumorali a due nuclei, dunque con caratteristiche del tutto simili ai tumori spontanei con RCC chiare.

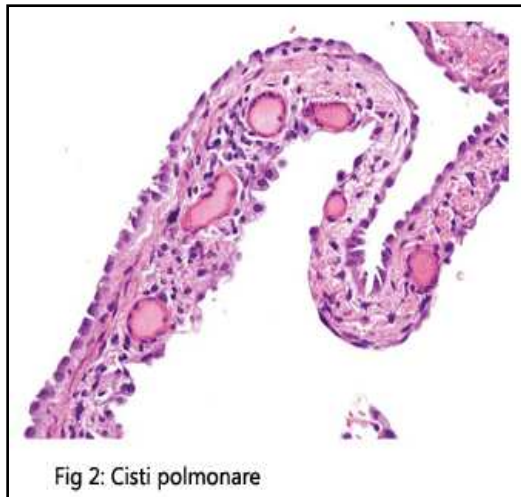
Il comportamento clinico delle RCC chiare e le RCC papillari, in pazienti affetti da BHDS non è stato comunque completamente chiarito, per via dei pochi casi riportati .

## *Patologie Polmonari*

Un'altra importante componente della sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*, ben studiata, sono le patologie polmonari ad essa associate: le cisti polmonari e il pneumotorace spontaneo. *Toro et al* (9) nel 1999, inizialmente descrissero in quattro dei ventotto pazienti, che teneva sotto esame, l'associazione tra la BHDS e cisti al polmone e/o tumori polmonari. Da allora furono numerosi i casi di cisti polmonari e pneumotorace spontaneo, riscontrati nei pazienti affetti da sindrome BHD. *Zbor et al.* (6) determinarono che i casi di pneumotorace spontaneo nei pazienti con BHD erano correlati all'età (insorgono approssimativamente intorno ai 50,3 anni) e che l'incidenza di questo fenomeno, rispetto ai casi spontanei, fosse superiore di ben 32 volte. Istologicamente, le cisti polmonari (Figura 2) sono caratterizzate da dilatazioni di pochi millimetri degli spazi alveolari. La sottile parete cistica è allineata lungo l'epitelio cuboide e alle volte sono presenti fibre o



tessuto muscolare liscio nella parete stessa. Quando le cisti si rompono, con la pressione dell' inalazione si ha il pneumotorace.



### *Patologie cutanee*

Nei primi articoli, *Birt et al.* descrissero i tumori cutanei come unico sintomo della sindrome: furono loro a coniare il termine di *fibrofolliculoma* (Figura 3), per le lesioni che riscontravano in questi pazienti. Questo tipo di tumore è una proliferazione circoscritta, di collagene e fibroblasti, intorno ai follicoli piliferi, con le cellule basali che protendono verso lo stroma fibromucinoso.

Il tricodiscoma è un tumore fibrovascolare, della superficie del derma.

Entrambi i tipi di lesioni aumentano in relazione all'età.

Moltissimi pazienti affetti da sindrome BHD, presentano lesioni cutanee, tanto che inizialmente la sindrome veniva diagnosticata solo se erano presenti almeno 10 lesioni, delle quali alcune, in seguito a biopsia e esame istologico, dovevano risultare dei fibrofolliculomi .

Ancora però non è stata chiarita la natura di queste lesioni, se siano semplici malformazioni del follicolo o di natura neoplastica.

Si è pure ipotizzato che il fibrofolliculoma e il tricodiscoma siano in realtà lo stesso tipo di lesione.

*Arckerman et al* (18) ipotizzarono infatti che si trattasse della stessa patologia a diversi stadi di sviluppo. Ad avvalorare la loro tesi, il fatto che da studi immunofenotipici, risulta che ci siano gli stessi precursori istogenici .

Altri autori ipotizzano che anche gli acrocordoni siano sintomi della BDHS. *De La Torre et al* (19) infatti analizzarono tramite in seguito a biopsia e relative esame istologico acro cordoni insorti in pazienti affetti da BHDS e provarono che tali lesioni avessero aspetti istopatologici del tutto simili a fibrofolliculomi e tricodiscomi. Dunque conclusero che si trattava di variazioni istologiche dello stesso tipo di lesione.



**Fig 3:**  
**Fibrofolliculoma**

### *Altre patologie associabili alla sindrome BHD*

Nei primi studi di *Honstein e Knickeberg*, gli autori descrissero polipi intestinali, in pazienti con lesioni cutanee. Circa 15 anni dopo *Rongioletti et al.* riportarono casi in cui i fibrofolliculomi, trichodiscomi e acrocordoni erano associati alla presenza di polipi intestinali. Uno di questi polipi analizzati presentava displasia epiteliale. Gli autori conclusero che i pazienti affetti da sindrome di BHD, erano predisposti alla formazione di polipi intestinali. Nonostante ciò, in studi epidemiologici più ampi, vengono riportati casi in cui la BHDS non è associata né a cancro al colon né a polipi intestinali, dunque non è accertata la tesi che esista una correlazione con queste patologie.

## *Aspetti genetici*

Il gene coinvolto nella BHDS, chiamato FLCN, mappa nel braccio corto del cromosoma 17 (17p11.2) (21). Mutazioni a suo carico principalmente nella linea germinale, ma anche in quella somatica, possono determinare lo sviluppo della sindrome di *Birt-Hogg-Dubè* (22).

Il gene FLCN è composto da 14 esoni e codifica per una proteina, la follicolina, che risulta essere assai conservata in diverse specie.

L'RNA messaggero che codifica la follicolina, viene tradotto a partire dall'esone 4, ed esistono due trascritti dello stesso gene, un trascritto lungo, di 3.8 Kb e un trascritto più corto, prodotto per splicing alternativo dello stesso messaggero (vedi Figura 4).

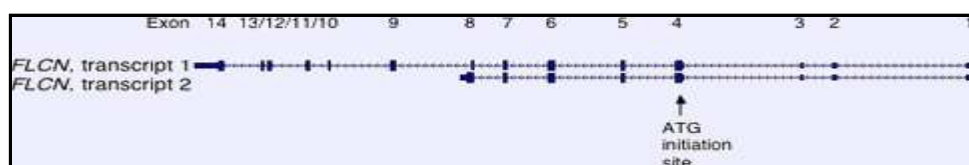


Figura 4

L'mRNA della FLCN risulta espresso in vari tessuti, incluse le cellule stromali, i nefroni distali del rene, le pneumocisti di tipo I, il fegato, la pelle e le sue appendici (23).

Al contrario, una ridotta espressione di FLCN si riscontra nelle cellule renali in caso di tumore associato alla sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*.

Infatti in questi casi oltre che ad una mutazione nella linea germinale, si riscontra spesso una perdita di eterozigosità (LOH) per una mutazione somatica a carico dell'altro allele, che porta allo sviluppo di tumori (24).

I dati fino ad ora riportati fanno quindi pensare che il prodotto del gene FLCN sia un oncosoppressore.

Varie e specifiche mutazioni sono state identificate a carico del gene che codifica la follicolina in pazienti che hanno sviluppato patologie associate alla sindrome BHD.

Nel 2002 *Khoo et al* (25) identificarono 2 distinte mutazioni nella linea germinale a carico di FLCN entrambe sull'esone 11 (c.1733insC w c.1733delC) in ben tre delle quattro famiglie affette da BHDS che avevano esaminato. Inoltre una nuova mutazione somatica c.1732delTCinsAC fu riscontrata nelle cellule cromofobe del carcinoma renale, associato alla sindrome, questo fece supporre fosse necessario un "second hit" per lo sviluppo tumorale. I loro risultati inoltre confermarono che il tratto C8 (cioè un tratto in cui vi sono 8 citosine consecutive) dell' esone11, fosse un *hot spot* mutazionale per il gene BHD.

Nel 2005 *Schmidt et al.* (26) analizzarono 61 famiglie affette dalla sindrome e in queste identificarono mutazioni a carico di BHD sparse in tutte regioni codificanti del gene per la follicolina che includevano: 16 delezioni/inserzioni, 3 nonsense, 3 siti di *splicing* .

La maggior parte delle mutazioni a carico di BHD hanno come risultato la produzione di follicolina tronca. Lo

stesso gruppo studiò 77 tumori su 12 pazienti affetti da sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*, sequenziando il gene riscontrarono che nella maggior parte dei tumori renali, le alterazioni cadevano nell' "hot spot" dell'esone 11 (41/77, dunque il 53%). Le mutazioni somatiche sono distribuite sull' intero gene.

In figura 5 è riportato il risultato di uno studio condotto da *J.R. Toro et al.* e la figura mostra ben 53 mutazioni uniche, individuate sul gene FLCN distribuite negli esoni dal 4 al 14 eccezione fatta per gli esoni 8 e 10 (27).

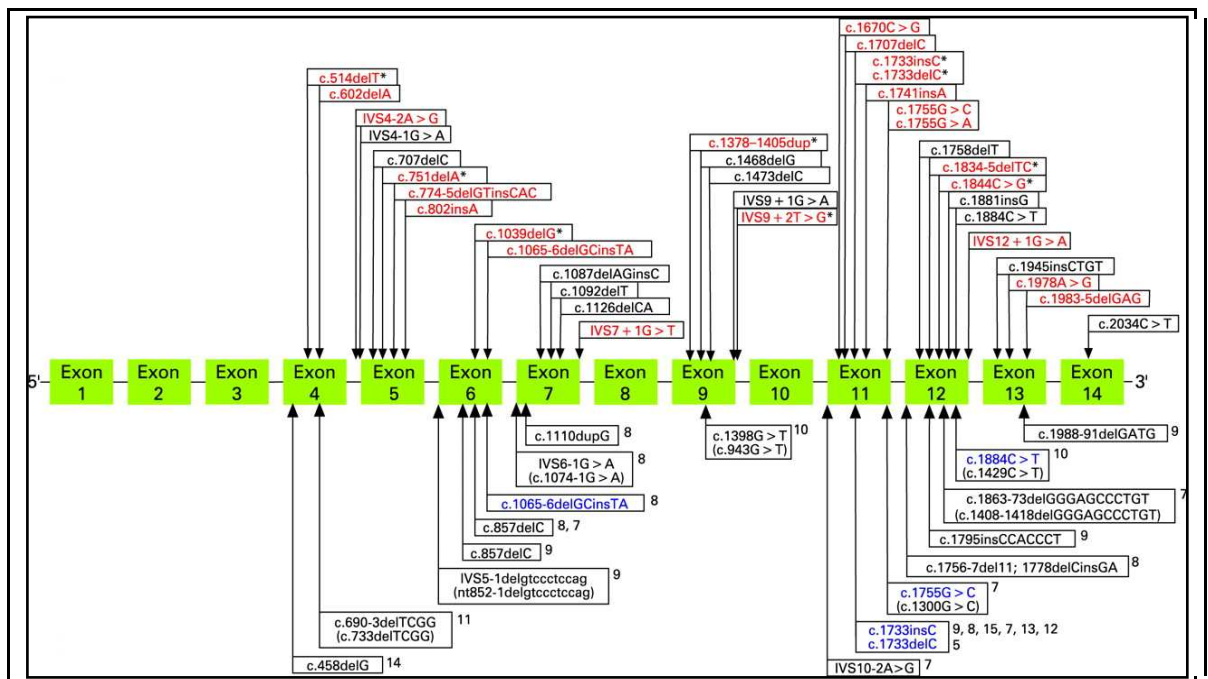


Figura 5



Inoltre si può affermare che la maggior parte delle mutazioni a carico del gene FLCN , nei pazienti affetti da *Birt-Hogg-Dubè*, hanno come risultato una proteina tronca nel tratto carbossi-terminale, dunque una proteina inattiva.

Le mutazioni somatiche del gene BHD in cui avviene la LOH del gene sono state riscontrate nel 70% delle RCC di pazienti affetti dalla sindrome. Questa è un'altra indicazione che la FLCN sia un onco-soppressore e che la mutazione in entrambi gli alleli sia uno dei primi *step* della tumorigenesi, almeno per quanto riguarda i tumori renali.

## *Funzione della follicolina*

La follicolina (FLCN) è una proteina di 64 KDa, che consiste di 679 amino acidi e presenta un dominio centrale *coiled-coil* ricco in acido glutammico, un sito di N-glicosilazione e tre siti di miristoilazione.

E' espressa nella maggior parte dei tessuti adulti, come pelle, polmone e rene. FLCN forma un complesso con le *novel-folliculin-interaction proteins* 1 e 2 (FNIP1 e FNIP2) e con *5'AMP activated protein Kinase* (AMPK) un importante sensore cellulare che regola negativamente la rapamicina (mTOR). (28, 29).

La funzione della follicolina è ancora sconosciuta. I primi ad analizzarla con un approccio genetico furono Singh e i suoi colleghi che dimostrarono in *Drosophila* l'importanza del prodotto del gene BHD, non solo per mantenere le cellule staminali maschili e per la funzione

del volo, ma anche per la sua funzione nel *pathway* di trasduzione del segnale *Jak/Stat* e *decapentaplegico* (30).

*Baba et al.* per primi identificarono una proteina che interagisce con la follicolina, la FNIP1, tramite studi di immunoprecipitazione, in cellule di mammifero. Scoprirono che FNIP1 lega la *kinasi* AMPK, un regolatore negativo di mTOR . Ciò suggerì che la follicolina potesse avere un ruolo nei *pathways* di segnale di AMPK e mTOR.(31)

Studi recenti, suggeriscono che molte sindromi, in cui sono presenti amartomi, possono essere collegate tra di loro, tramite disfunzioni del *pathway* di sensibilità di nutrimento/energia, *target* di regolazione della rapamicina (mTOR) (32-33). Queste sindromi, oltre alla presenza di amartomi, sono caratterizzate dall' aumento della frequenza di insorgenza di tumori.

Mutazioni nella linea germinale, a carico dei seguenti geni, sono state identificate in 4 sindromi, con le caratteristiche sopra citate: LKB1, che mutato è

responsabile della sindrome di *Peutz Jeghers* (34-35); TSC1 e TSC2, legate alla sclerosi tuberosa complessa (TSC) (36) e PTEN la cui mutazione è responsabile della sindrome di *Cowden* (37). La perdita della funzione di tutti questi geni, ha come conseguenza la deregolazione di mTOR, che a sua volta è coinvolto nella regolazione della crescita e della dimensione cellulare attraverso la stimolazione della sintesi proteica (38-39).

BHDS è una sindrome che come quelle sopracitate presenta amartomi, ed ha una certa somiglianza fenotipica con la TSC , questi indizi diedero il via ad alcune speculazioni , secondo le quali, BHD poteva avere un ruolo diretto nel *pathway* di segnale legato ad mTOR.

*Baba et nel 2006* (31), per accertarsi della funzione della FLCN, studiarono la sua interazione con altre proteine tramite esperimenti di immuno-precipitazione e identificarono una proteina di 130KDa che interagisce con la follicolina, questa proteina la FNIP1 a sua volta interagisce con AMPK, una proteina fondamentale per la

sensibilità cellulare a nutrimento/energia. E' stato inoltre dimostrato che FLCN è fosforilata, la fosforilazione è facilitata dalla presenza di FNIP1 ed è soppressa quando viene inibita la cascata di mTOR .

Inoltre tramite un trattamento che inibisce AMPK, viene ridotta anche la fosforilazione di FNIP1 e il risultato è la defosforilazione di FLCN, stesso risultato, si ha quando i livelli di FNIP1 sono ridotti.

La FNIP1 è una proteina molto conservata tra le specie, questo suggerisce che ha una funzione importante per la vita cellulare. FLCN interagisce con FNIP1, sia in vivo che in vitro, tramite l'estremità Carbossi-terminale, è interessante pertanto il fatto che tutte le mutazioni che portano allo svilupparsi della BHDS, hanno come risultato la produzione di FLCN tronca, incapace di legarsi a FNIP1, e ciò compromette la funzione della proteina stessa.

E' stata identificata AMPK come una proteina che interagisce con FNIP1. Così come, ci sono interazioni tra

LKB1-AMPK-TSC1/2-mTOR e PI3K-AKT-TSC1/2-mTOR e mutazioni che impediscono queste interazioni, che vanno a deregolare il *pathway* di sensibilità nutrimento/energia con conseguente sviluppo di amartomi e gravi patologie.

Un *deficit* di energia cellulare attiva AMPK fosforilata da LKB1 e dalla *calmodulina Kinase kinase* (40-41) che saranno energeticamente regolate da mTOR tramite la fosforilazione di TSC2 (42-43) e che inibiscono il trasferimento di proteine e la crescita cellulare. PTEN blocca mTOR tramite l'inibizione dell'attivazione di PI3K e AKT, indotti da segnali di *growth factors*, grazie a recettori di membrana (44) (figura 6).

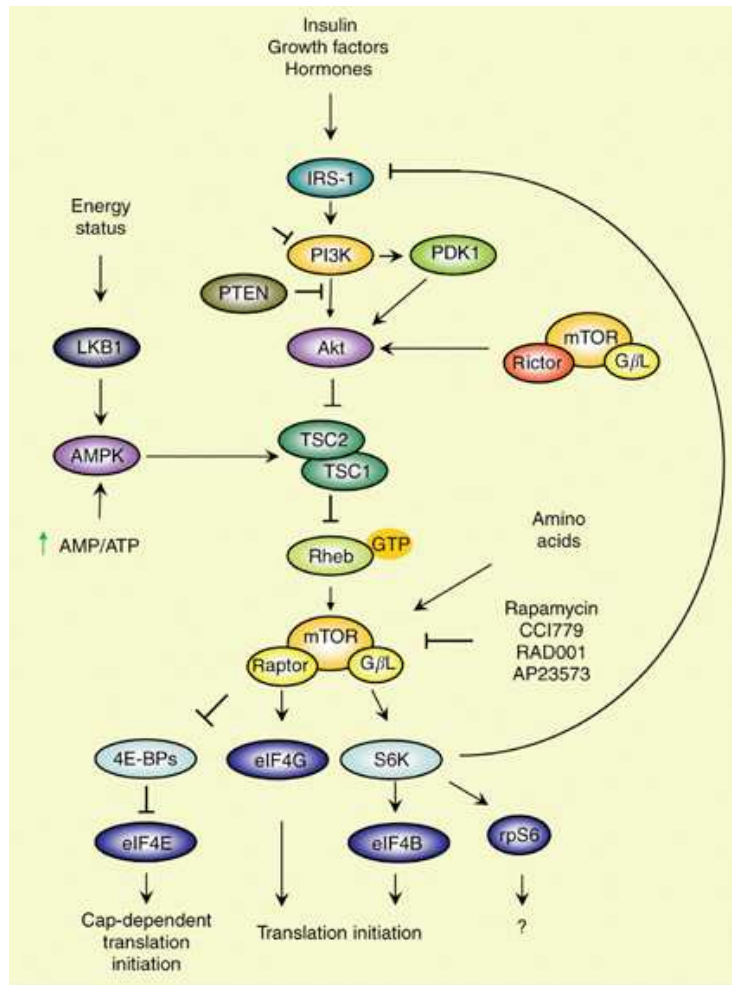


Figura 6. Schema del pathway di mTOR

Quando vi è una mutazione che porta alla deregolazione di questo *pathway* vi sono conseguenze sulla crescita cellulare e la sintesi proteica che a loro volta hanno come conseguenza la comparsa amartomi.

Anche la sindrome di *Birt-Hogg-Dubè*, difatti, predispone oltre che a neoplasia renale, anche ad amartomi dei follicoli piliferi. Dato che, come abbiamo detto,

l'interazione tra FLCN-FNIP1-AMPK suggeriva un ruolo di FLCN nel *pathway* di sensibilità energia/nutrimiento regolato da AMPK e mTOR.

*Baba et al.* studiarono il possibile meccanismo molecolare che porta al fenotipo della sindrome BHD. Trovarono che la fosforilazione di FLCN è facilitata da FNIP1 ed è dipendente da mTOR e da AMPK, dunque è ovvia un'interazione tra FLCN/FNIP1 e il *pathway* di segnale mTOR /AMPK. *Baba et al.*, inoltre, dedussero che FLCN ha multipli siti di fosforilazione e questa fosforilazione, che avviene tramite AMPK, necessita di una ulteriore fosforilazione tramite il segnale mTOR e che l'inibizione di AMPK comporta la diminuzione dei livelli di espressione di FNIP1, e la over-espressione di FNIP1 facilita la fosforilazione di FLCN tramite sia mTOR che AMPK (Figura 7). L'attivazione di AMPK, tramite il 2-deoxyglucosio, può sopprimere l'attività di mTOR in cellule nulle per il gene FLCN, ciò indica che FLCN non



è necessaria per la soppressione di mTOR da parte di AMPK.

Questo indica che la follicolina non è un regolatore a monte di AMPK, mentre cellule nulle per FLCN hanno un'attività di mTOR differente rispetto a quelle in cui il gene è presente quando viene usato un siero privo di aminoacidi .

FNIP1 e FLCN in base a questi esperimenti fatti da *Baba e al.* nel 2006, hanno un ruolo nella modulazione del *pathway* di segnale di mTOR e AMPK (31).

*Hasumi et al.* (44) nel 2008 hanno identificato, una nuova proteina che interagisce con la follicolina, la FNIP2, analoga a FNIP1, che anch'essa molto conservata tra le specie .

FNIP2 interagisce con la metà carbossi-terminale della follicolina e con AMPK (regolatore negativo di mTOR) .

Hanno inoltre scoperto e sottolineato, che FNIP1 e FNIP2 possono formare tra di loro dei multimeri indipendentemente dalla follicolina, suggerendo che

potrebbero avere una funzione indipendente da FLCN. Queste proteine inoltre sono espresse in maniera diversa nei diversi tessuti umani, ciò indica che forse hanno dei ruoli tessuto/specifici nei normali segnali cellulari. Inoltre i livelli elevati di espressione sia FNIP1 e FNIP2 nelle varianti istologiche dei tumori renali associati alla sindrome di BHD, possono suggerire che entrambi hanno un ruolo nell'oncogenesi di questi tumori (44).

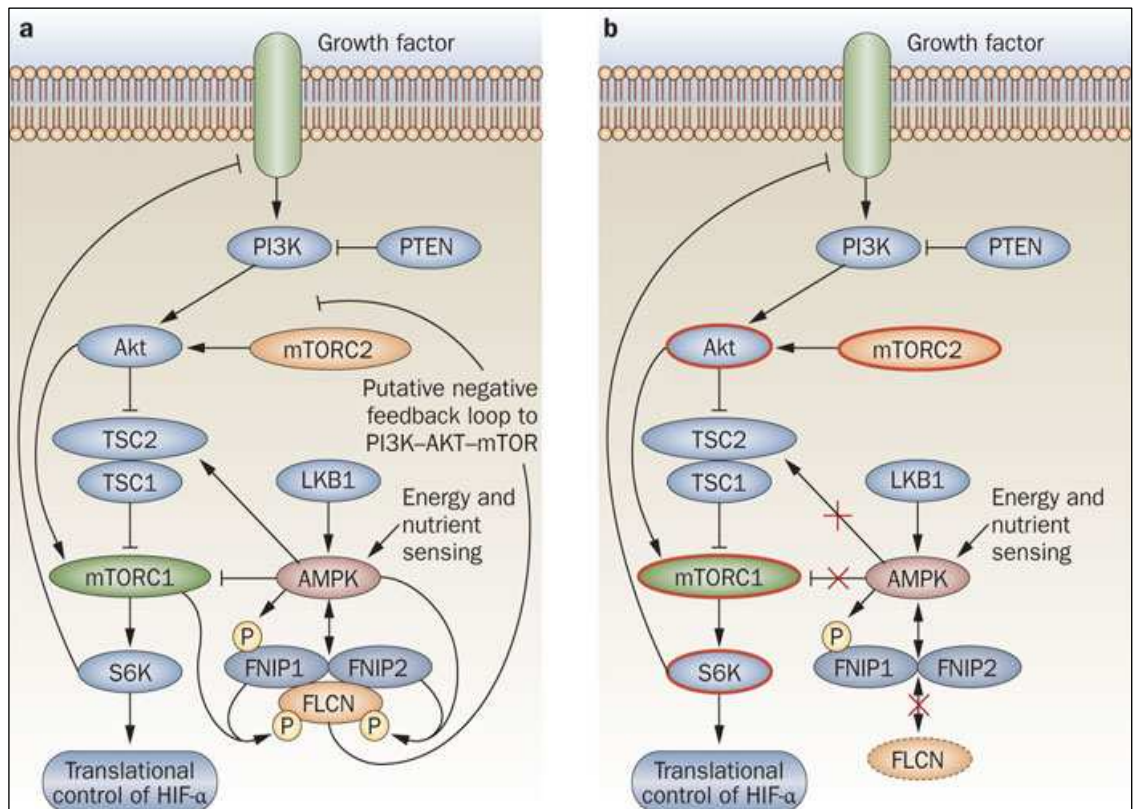


Figura 7. Ruolo della FLCN nel Pathway di mTOR

## *Scopo della ricerca*

E' stato individuato un soggetto che annoverava, nella sua storia clinica, neoplasie a carico di entrambi i reni, sviluppatesi in tempi diversi.

La bilateralità del tumore, in tale paziente, ha fatto ipotizzare che si trattasse di un caso di sindrome di *Birt Hogg Dubè* (BHDS).

Dall'esame istologico risultava inoltre, che si trattava di tumore a cellule chiare e a RCC cromofore, altro indizio che faceva sospettare una possibile associazione con la sindrome di BHD.

Si è ritenuto dunque opportuno individuare, in tale soggetto, eventuali mutazioni a carico del gene BHD (FLCN), sia per confermare tale diagnosi che per individuare eventuali nuove mutazioni.

# Materiali e Metodi

## *1. Preparazione di cellule mononucleate.*

Circa 20 ml di sangue periferico eparinato è stato utilizzato per l'isolamento delle cellule mononucleate. Il sangue intero è stato stratificato su un cuscinetto di ficoll e quindi centrifugato a 2000 rpm per 20'. Il *buffy coat* risultante, costituito dalle cellule mononucleate, è stato raccolto, e le cellule sono state sottoposte a due lavaggi con PBS(4,3mM NaHPO<sub>4</sub>; 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), intervallati da centrifugazioni effettuate a 1800 rpm per 10'.

## ***2. Estrazione di DNA***

Il DNA è stato estratto con la tecnica del *salting out*, dopo digestione con Proteinasi K (ptK) del lisato cellulare di campioni di cellule mononucleate di sangue periferico in presenza di EDTA sodico e portato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per favorirne la lisi.

Dopo 3-4 lavaggi con tampone SE 10x (NaCl 0,075M, EDTA 0,025M PH 8) e centrifugazione a 4100 rpm per 10 minuti, l'emolizzato è stato incubato a  $37^{\circ}\text{C}$  *over-night*, in continua agitazione, in una soluzione contenente SE 1x, SDS 10%, ptK 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Dopo l'incubazione i campioni vengono trattati con una soluzione iper-satura di NaCl 6M che riduce la solubilità dell'acido nucleico e ne facilita la precipitazione.

Dopo centrifugazione in centrifuga da tavolo alla massima velocità per 10', il supernatante ottenuto, che viene raccolto per precipitazione per aggiunta di 2 volumi di etanolo assoluto freddo.

La concentrazione e la purezza del DNA recuperato e risospeso in acqua milliQ è stata verificata sia per lettura ad uno spettrofotometro (260nm e 280 nm) che attraverso elettroforesi su gel 0.8% di agarosio in tampone TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.002 M EDTA) a 3 V/cm.

### ***3. Estrazione di RNA totale citoplasmatico.***

Dopo un lavaggio in PBS 1x (4,3mM NaHPO<sub>4</sub>; 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), le cellule sono state risospese in RSB100 (10mM Tris-HCl pH 7,4; 100mM NaCl; 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; digitonina 40 µg/µl concentrazione finale). La presenza di digitonina provoca la rottura delle membrane cellulari lasciando intatto l'involucro nucleare. Questo evita che la componente citoplasmatica possa essere contaminata da DNA.

Dopo centrifugazione a 2000 x g per 8', la fase citoplasmatica digitonina-solubile, è stata processata

secondo il protocollo Trizol Reagent (Invitrogen) (45) per estrarre RNA totale esclusivamente citoplasmatico.

#### ***4. Polymerase chain reaction***

Le reazioni di amplificazione per PCR sono state preparate tutte sulla base del seguente protocollo: 30 ng di DNA template; dNTP 200  $\mu$ M; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; primers 1pmol/ $\mu$ l; Taq 0.025 U/ $\mu$ l in presenza del tampone fornito dalla casa produttrice (Invitrogen).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate su Termocycler Perkin Elmer 9600, utilizzando le coppie di *primer* di volta in volta necessarie, insieme alle opportune condizioni di *annealing* richieste dai *primer* utilizzati.

La reazione di amplificazione dell'esone 1 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

**5'-CGC GCC TGG GTG TCG GC -3' (FLCN-ES1dir)**

**5'-ACT TGG TTA ATG GGC GTG CCC -3' (FLCN-ES1rev)**

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

59.8°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 2 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

**5'-TCA TGC TAC GAA GGC CTC TAA T -3' (FLCN-ES2dir)**

**5'-TGG AGT AAG GGG TAG CAG GAC -3' (FLCN-ES2rev)**



Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

56.4°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 3 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

**5'-GTC TCC CTC TCT GAC TCC CAC -3' (FLCN-ES3dir)**

**5'-GGA AGA AGC AAA GGA CGA TGT -3' (FLCN-ES3rev)**

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

55.9 °C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 4 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primers* specifici:

5'-TG GGG AAC TGG CGG GTG -3' (FLCN-ES4dir)

5'-TCG CCT TTC TTG ACT TCC CG -3' (FLCN-ES4rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

57.4°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 5 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-GAA CAA CCT CTG GCA ATC TCT -3' (FLCN-ES5dir)

5'-CGC AAT TCT GGA CAA GGG A -3' (FLCN-ES5rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

54.7 °C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 6 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-GTT GGA AGC TTG ATC ACA GGA -3' (FLCN-ES6dir)

5'-GGC CTC AAC CTC AGC ACA GA -3' (FLCN-ES6rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

58.32°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 7 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-TGC TGT TGG GAA TGA TTG GA -3' (FLCN-ES7dir)

5'-CAG AGG CAG CAA GCA AAC AC -3' (FLCN-ES7rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

53.3°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 8 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-TCC TCC CAT CCA TCT ATT GAA G -3' (FLCN-ES8dir)

5'-GCT CGT TCT GGG CTG ATT CA -3' (FLCN-ES8rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

56.4 °C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 9 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-GCA ACA GGG AGC AGG GAG CA -3' (FLCN-ES9dir)

5'-CCC ACC GAG GAG GCT GTC AG -3' (FLCN-ES9rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

61.5°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 10 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-GGG AAG GGA GAG AAA AAC CA -3' (FLCN-ES10dir)

5'-CCC CAG TGG AGA CCG TGT -3' (FLCN-ES10rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

55.3 °C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 11 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

**5'-AGG GCT TGG ACC GGG CTG CA -3' (FLCN-ES11dir)**

**5'-GGC CTC CTC TCC ACA ACC CA -3' (FLCN-ES11rev)**

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

61.5°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*



La reazione di amplificazione GLI ESONI 12-13 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-AAG CAT TGA TTT GGG CCA GT -3' (FLCN-ES12-13dir)

5'-TCG GCT CCT CCC TCA GTG G -3' (FLCN-ES12-13rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

53.3°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

La reazione di amplificazione dell'esone 14 è stata effettuata, utilizzando i seguenti *primer* specifici:

5'-GCT GTG CCA AAG CCG TGT CA -3' (FLCN-ES14dir)

5'-AACTGCAGC AAA AGG TAC CCT CA -3' (FLCN-ES14rev)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

58.6°C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

Le reazione di amplificazione per verificare che le mutazione cadessero in alleli diversi è stata effettuata utilizzando i seguenti *primer* specifici e le seguenti condizioni:

5'- CTTTTCATGGACAGGGCT -3' (WT1)

5'- GACCTCCATTAAATACGTCA-3' (WT2)

5'- TTCCTTTTCACCGGTCACCTT -3' (M1)

5'- AACCTCCATTAAATACGTCAG -3' (M2)

Condizioni di amplificazione:

95°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

95°C per 45" Denaturazione

56.4 °C per 1' *Annealing*

72°C per 1' *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

Amplificazione degli inserti contenuti all'interno di presunti cloni ricombinanti.

Le reazioni sono state effettuate, utilizzando i seguenti *primer* specifici posizionati alle estremità del sito di *cloning* del vettore Topo-TA:

5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'; (SP6)

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; (T7)

Condizioni di amplificazione:

94°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

94°C per 30" Denaturazione

52°C per 30" *Annealing*

72°C per 30" *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

## ***5. Preparazione di cellule XL1-Blue***

### ***competenti***

Cellule di *Escherichia coli* di ceppo XL1-Blue in crescita esponenziale (0.3 O.D.) in brodo di coltura LB (1% Bactotripton, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl) sono state raccolte per centrifugazione a 4500 rpm in centrifuga da tavolo, e risospese in  $1/3 V_i$  di soluzione Tfb I (10mM RbCl<sub>2</sub>;

50mM MnCl<sub>2</sub>; 30mM K-acetato; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerolo; pH 5.8) sterile, fredda, e incubate per 90' in ghiaccio.

Dopo incubazione, le cellule sono state centrifugate a 4000 rpm per 10' a 4°C, quindi risospese in 1/10 V<sub>i</sub> di soluzione TfB II (10mM MOPS, pH 7.0; 10mM RbCl<sub>2</sub>; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerolo ), sterile, fredda.

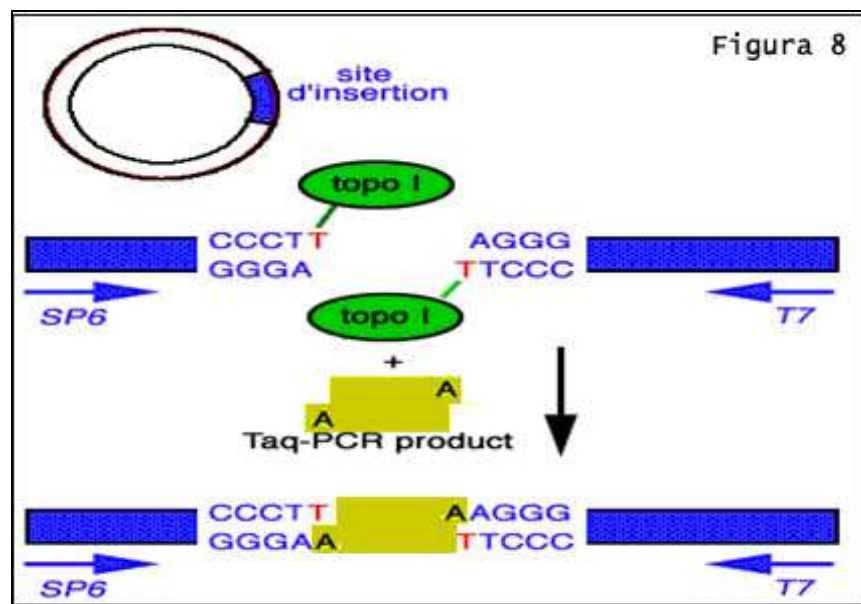
La sospensione cellulare in TfB II è stata ripartita in aliquote da 100 µl ciascuna, che sono state immediatamente utilizzate, e ovvero conservate in freezer a -80°C.

## ***6. Cloning dei frammenti di DNA amplificati in vettore Topo-TA***

E' noto che l'attività terminal transferasica della DNA Taq polimerasi genera una singola estensione 3' adenilata quando la reazione di allungamento ( a 72°C )

sui prodotti da P.C.R. viene prolungata per alcuni minuti. Questa caratteristica consente il *cloning* diretto di tali prodotti su vettori che presentano *overhangs* di timina come il vettore Topo- TA.

La procedura è descritta nella figura che segue:



Le reazioni di *cloning* sono state effettuate secondo il seguente protocollo:

20ng del prodotto di PCR ed 1µl di Topo-TA vector sono stati mescolati ed incubati per 5' a temperatura ambiente. Quindi la miscela è stata posta in ghiaccio ed

utilizzata per trasformare cellule XL1-Blue rese competenti.

## ***7. Trasformazione di cellule competenti***

La miscela di ligasi in Topo-TA è stata usata per trasformare cellule XL1-Blue competenti secondo il seguente protocollo:

ad una aliquota di cellule batteriche competenti (100  $\mu$ l), ottenute come descritto in precedenza, è stata aggiunta la miscela di ligasi, e la sospensione è stata incubata in ghiaccio per 30'.

La sospensione è stata quindi sottoposta a *shock* termico a 42°C per 90", indi nuovamente incubata su ghiaccio per 2'.

Sono stati quindi aggiunti alla sospensione 300 $\mu$ l di LB, e la miscela è stata incubata a 37°C per 1h.

Sono stati quindi aggiunti 40  $\mu$ l di IPTG e 40 $\mu$ l di X-Gal.

La sospensione batterica trasformata è stata poi piastrata su LB agar (1.5% Bacto agar in LB) contenente ampicillina (40 µg/ml) e tetraciclina (14 µg/ml).

Le piastre sono state quindi incubate per 12h a 37°C.

### ***8. Analisi dei cloni ricombinanti***

Le colonie considerate positive per i plasmidi ricombinanti sono state raccolte per "*picking*" da ciascuna piastra, inoculate in beute contenenti 10ml di LB in presenza di ampicillina (40µg/ml) e tetraciclina (14µg/ml), e incubate per 12 h a 37°C.

La sospensione batterica ottenuta è stata centrifugata a 4.500 r.p.m. in centrifuga da tavolo ed il *pellet* cellulare risultante è stato utilizzato per l' estrazione dei singoli plasmidi secondo il protocollo di estrazione "Nucleospin plasmid" (Amhersham).



I plasmidi così ottenuti sono stati analizzati per elettroforesi in gel di agarosio 0.8% a 3 V/cm, ed una aliquota di circa 2 ng/ciascuno è stata usata come *template* in reazioni di amplificazione per P.C.R. in presenza degli oligonucleotidi Sp6 e T7, posizionati all'estremità del sito di cloning del vettore Topo-TA, allo scopo di confermare la presenza dell'inserto desiderato all'interno del suddetto vettore.

Le condizioni di reazione usate sono state descritte in precedenza .

## **9. RT-PCR**

Circa 10mg di RNA estratto da sangue periferico è stato utilizzato in reazioni di reverse transcription utilizzando la Super script II reverse transcriptase come indicato dai produttori (Invitrogen) utilizzando dei primer poli-T (22 nucleotidi).

I cDNA ottenuti sono quindi stati usati in reazioni di PCR usando i seguenti primer:

5'- AGTCGGACATGTGCGAGG -3'

5'- CTGCCCTGGCCGTGAAGG-3'

Con il seguente protocollo di amplificazione:

94°C per 5' Denaturazione iniziale

30 cicli di:

94°C per 30" Denaturazione

56°C per 30" *Annealing*

72°C per 30" *Extension*

seguiti da una tappa finale di:

72°C per 20' *Extension*

## Risultati

Dai campioni di sangue, prelevati dal paziente in questione, ho isolato gli elementi bianchi con procedure *standard* (vedi Materiali e Metodi), e da queste cellule è stato estratto il DNA genomico (figura 9).

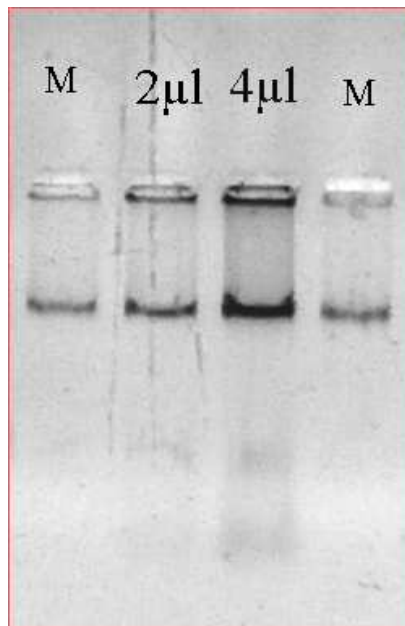


Figura 9. Analisi per elettroforesi su gel di agarosio del DNA genomico del soggetto con sospetta BHDS

Ho proceduto quindi con l'amplificazione di diverse regioni del gene che codifica per la follicolina, avvalendomi di oligonucleotidi sintetici costruiti sulla sequenza di introni del gene BHD, in modo da amplificare sia gli interi esoni, che parte degli introni.

E' infatti riportato in letteratura che alcune mutazioni che cadono su questo gene possono essere localizzate nelle sequenze di riconoscimento dei siti di *splicing*, che si trovano nelle regioni introniche.

Considerati i dati riportati in letteratura, dunque, il fatto che gran parte delle mutazioni fino ad oggi riscontrate sul gene che codifica per la follicolina (*hot spot* mutazionale) si trovano nell'esone 11, ho analizzato in prima battuta, questo esone, nel genoma del soggetto in esame.

Ho quindi utilizzato il frammento di DNA ottenuto in reazioni di amplificazione, e mostrato nell'analisi elettroforetica di Figura 10.

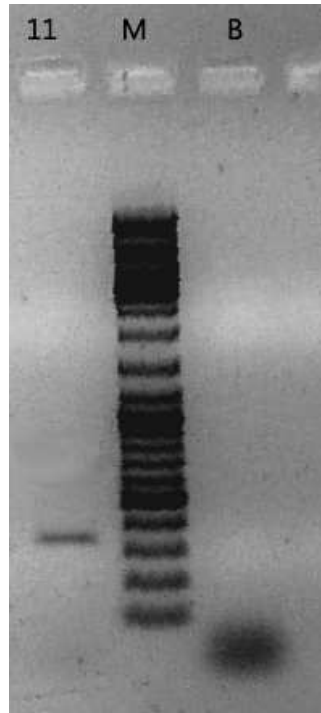


Figura. 10. Analisi dell'amplificato dell'esone 11

Il frammento amplificato corrispondente alla regione codificante dell'esone 11, del soggetto in esame è stato, quindi, il primo ad essere clonato, utilizzando come vettore plasmidico il vettore TopoTA e trasformando cellule competenti di *E. coli* con il plasmide ricombinante.

Ho quindi eseguito la PCR *colony*, delle colonie batteriche che si supponeva contenessero il plasmide

ricombinante, e gli inserti contenuti nei plasmidi considerati positivi sono stati sequenziati.

La sequenza ottenuta è stata dunque confrontata con quella *wild type* riportata in letteratura, ottenendo come risultato una completa omologia di sequenza, indicando che il DNA dell'individuo analizzato non possedeva alcuna mutazione nell'esone 11.

Ho così portato avanti nello stesso modo l'analisi di altri esoni.

Tutti i frammenti risultati da queste analisi, sono stati clonati in vettore *topoTA*.

Così come in precedenza fatto con l'esone 11, dopo aver clonato il DNA ottenuto da queste amplificazioni, ho analizzato per *sequencing* queste regioni, confrontando la sequenza ottenuta con le corrispondenti regioni *wild type*.

Tutte le sequenze corrispondevano a quella di controllo, tranne la regione amplificata che comprendeva l'esone 5.

Questa regione infatti presentava una delezione (descritta in Figura 11) di una sequenza di 12 bp, (dal nucleotide 10854 al nucleotide 10865 della sequenza *wild type* riportata in banca dati), che coinvolgeva 7 paia di basi dell'introne a monte dell'esone 5, e 5 paia di basi dell'esone 5 stesso.



Figura 11. Confronto tra la sequenza amplificata che comprende una estremità dell'esone 5 del gene FLCN, con la corrispondente sequenza *wild-type*.

Trattandosi di una mutazione germinale, ho verificato, se tale mutazione, colpiva anche i parenti più prossimi del soggetto in questione.

Nessuno dei congiunti del soggetto in esame presenta alcuna patologia connessa con la sindrome. Sangue periferico era stato estratto dai tre fratelli e dalla madre del soggetto malato e da tali campioni di sangue, dopo

aver isolato gli elementi bianchi è stato estratto il DNA .  
Dunque ho fatto una P.C.R. sui singoli campioni di DNA,  
utilizzando *primers* per l'amplificazione della sola  
regione mutata e *primers* per la corrispondente regione  
*wild type*, dimostrando che nessuno dei congiunti del  
soggetto possiede mutazione germinale riscontrata.

Per tale ragione supponiamo che il soggetto abbia  
ereditato l'allele mutato dal padre, ormai deceduto.

L'analisi in banca dati (EMBL sequence data bank) della  
sequenza mutata ottenuta dal soggetto analizzato mi ha  
permesso di verificare che quella da me trovata è una  
mutazione mai in precedenza descritta.

Tale mutazione dovrebbe avere come conseguenza la  
sintesi di un RNA messaggero (mRNA) più corto del  
corrispondente messaggero *wild type*, in quanto  
porterebbe alla delezione dell'intero esone 5, venendo a  
mancare elementi del sito di *splicing* accettore al 5'  
dell'esone 5.



Ho verificato quindi la presenza del trascritto del gene mutato nel citoplasma delle cellule bianche con una reazione di retro-trascrizione e successiva amplificazione. A tal scopo sono stati costruiti due oligonucleotidi sintetici, uno all'estremità 3' dell'esone 4 e l'altro all'estremità 5' dell'esone 6, in modo da amplificare la regione di cDNA della follicolina che contiene l'esone 5.

In figura 12, riporto l'analisi di tali amplificati, in cui si notano due bande, una con dimensioni compatibili con l'amplificato che contiene l'esone 5, e dunque corrispondente al trascritto del *wild tipe*; e l'altra, che ha invece un peso molecolare nettamente minore, essendo mancante della regione dell'esone 5, corrisponde quindi al mRNA del gene mutato.

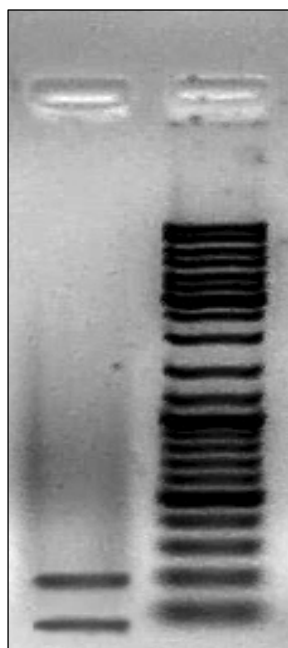


Figura 12

Il passo successivo, una volta individuata la mutazione germinale, è quello di andare a ricercare la mutazione somatica, il così detto "*second hit*", nelle cellule neoplastiche renali. Ho dunque analizzato un campione bioptico, conservato a  $-20^{\circ}$ , proveniente da uno dei tumori del paziente, questo è stato micro-dissezionato manualmente, per meglio separare il tessuto tumorale da quello normale. Il DNA estratto dalle cellule tumorali, è stato amplificato tramite PCR con i *primers* che

individuavano i vari esoni. Gli amplificati clonati in topoTA sono stati successivamente sequenziati.

Da tale analisi ho riscontrato una seconda mutazione, a livello somatico, che cade anch'essa nell'esone 5 e si tratta dell'inserzione di una A nella regione codificante.

Tale mutazione, c802 insA, mostrata in Figura 13 è già stata descritta in letteratura.



Figura 13

Per verificare, che si tratti realmente di un *second hint*, cioè che il gene di entrambi gli alleli produce una proteina inattiva, mi sono servita delle sequenze *wild tipe* e mutate per costruire specifici oligonucleotidi sintetici da utilizzare come primers in reazioni di amplificazione specifica per P.C.R.. Questi oligonucleotidi ( le cui

sequenze sono descritte in Materiali e Metodi) sono stati costruiti in modo tale che:

M1 si leghi al tratto contenente la mutazione germinale (delezione di 12bp) e ma non si leghi alla corrispondente regione del *wild type*;

M2 si leghi al 3' del tratto con la mutazione somatica, dunque dove si trova l'inserzione della A, in quanto anche il *primer* termina al 3' con l'inserzione, quindi permette l'amplificazione solo del mutato e non del *wild type*;

WT1 appaia solo con la sequenza *wild tipe*, corrispondente a quella mutata riconosciuta da M1;

WT2 leghi solo la regione *wild tipe*, corrispondete alla sequenza mutata riconosciuta da M2.

Ho eseguito dunque 4 reazioni di amplificazione utilizzando rispettivamente le seguenti coppie di *primers*:

- 1) WT1 e M2
- 2) M1 e WT2

3) WT1 e WT2

4) M1 e M2

La Figura 14 mostra l'analisi elettroforetica dei prodotti ottenuti nell'amplificazione.

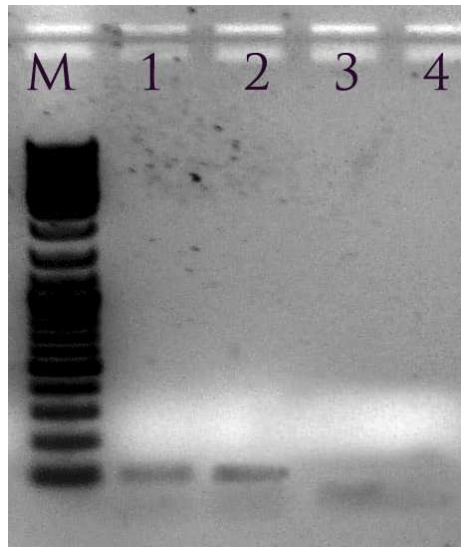


Figura 14:Analisi elettroforetica delle reazioni di amplificazione, come descritte nel testo.

Solo le reazioni 1 e 2 (WT1/M2 e M1/WT2) hanno dato un prodotto di amplificazione.

Questo significa che le mutazioni da me identificate a carico del gene che codifica per la follicolina, del paziente studiato, cadono su differenti alleli.

# Conclusioni

Dall'analisi genetica, oggetto di questa tesi, risulta che il soggetto in esame è affetto da sindrome Birt-Hogg-Dubè in quanto riporta due differenti mutazioni nel gene che codifica per la follicolina.

Le due mutazioni da me identificate nel soggetto in esame cadono ciascuna su un allele, come dimostrato dall'esperimento mostrato in Figura 14.

Il risultato più importante da me ottenuto in questo lavoro, è sicuramente l'identificazione di una mutazione, la delezione di 12 paia di basi nella regione 5' dell'esone 5, che coinvolgono alcuni nucleotidi del sito accettore dello splicing che interessa l'introne 4, a monte dell'esone 5, che non è mai stata descritta in precedenza. Tale mutazione risulta essere a carico della linea germinale.

La seconda mutazione che è stata trovata in uno dei due tumori del paziente in questione, è stata già descritta in letteratura. Questa essendo somatica, conferma l'ipotesi di Knudson secondo la quale occorre una seconda mutazione nell'allele *W.T.* per sviluppare la malattia.

Tale evidenza indicherebbe inoltre una funzione oncosoppressiva di tale proteina, come peraltro indicato in altri lavori.

# Bibliografia

1. Hornstein, O. P. and M. Knickenberg . Perifollicular fibromatosis cutis with polyps of the colon: a cutaneo-intestinal syndrome sui generis. Arch Dermatol Res 1975. 253:161-175.
2. Birt, A. R. , G. R. Hogg , and W. J. Dubé . Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. Arch Dermatol 1977. 113:1674-1677.
3. Schmidt LS, Warren MB, Nickerson ML, Weirich G, Matrosova V, Toro JR, Turner ML, Duray P, Merino M, Hewitt S, Pavlovich CP, Glenn G, Greenberg CR, Linehan WM, Zbar B. Birt-Hogg-Dubé syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2. Am J Hum Genet 2001;69:876-82
4. Schulz, T. and W. Hartschuh . Birt-Hogg-Dube syndrome and Hornstein-Knickenberg syndrome are the same: different sectioning technique as the cause of different histology. J Cutan Pathol 1999. 26:55-61.



5. Ubogy-Rainey, Z. , W. D. James , G. P. Lupton , and O. G. Rodman . Fibrofolliculomas, trichodiscomas, and acrochordons: the Birt-Hogg-Dube syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1987. 16:452-457.
6. Zbar, B. , W. G. Alvord , and G. Glenn . et al. Risk of renal and colonic neoplasms and spontaneous pneumothorax in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002. 11:393-400.
7. Roth, J. S. , A. D. Rabinowitz , M. Benson , and M. E. Grossman . Bilateral renal cell carcinoma in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1993. 29:1055-1056.
8. Takahashi, A. , T. Hayashi , O. Yoshida , K. Uede , F. Furukawa , and T. Shuin . Renal cell carcinoma in the Birt-Hogg-Dube syndrome: report of a case [in Japanese]. *Hinyokika Kyo* 2001. 47:719-721.

9. Toro, J. R. , G. Glenn , and P. Duray . et al. Birt-Hogg-Dube syndrome: a novel marker of kidney neoplasia. Arch Dermatol 1999. 135:1195-1202.
10. Tickoo, S. K. , V. E. Reuter , and M. B. Amin . et al. Renal oncocytosis: a morphologic study of fourteen cases. Am J Surg Pathol 1999. 23:1094-1101.
11. Weirich, G. , K. Junker , and P. G. O. Salles . et al. Comparative genomic hybridization analysis of renal oncocytomas, chromophobe renal cell carcinomas, and tumors with hybrid histology: hybrid oncocytic tumors [abstract]. Mod Pathol 2002. 15:186.
12. Storkel, S. , J. N. Eble , and K. Adlakha . et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1, Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer 1997. 80:987-989.
13. Takahashi, M. , X. J. Yang , and J. Sugimura . et al. Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. Oncogene 2003. 22:6810-6818.

14. Durrani, O. H. , L. Ng , and W. I. I. I. Bihrlle . Chromophobe renal cell carcinoma in a patient with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *J Urol* 2002. 168:1484-1485.
15. Welsch, M. J. , A. Kronic , and M. M. Medenica . Birt-Hogg-Dube Syndrome. *Int J Dermatol* 2005. 44:668-673.
16. Pavlovich, C. P. , M. M. Walther , and R. A. Eyler . et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Am J Surg Pathol* 2002. 26:1542-1552.
17. Mai, K. T. , P. Dhamanaskar , E. Belanger , and W. A. Stinson . Hybrid chromophobe renal cell neoplasm. *Pathol Res Pract* 2005. 201:385-389.
18. Ackerman, A. B. , V. B. Reddy , and H. P. Soyer . Fibrofolliculoma/Trichodiscoma. In: Ackerman AB, Reddy VB, Soyer HP, eds. *Neoplasms With Follicular Differentiation*. Philadelphia, Pa: Ardor Scribendi; 2001:221-244.
19. De la Torre, C. , C. Ocampo , I. G. Doval , A. Losada , and M. J. Cruces . Acrochordons are not a component of the Birt-

Hogg-Dube syndrome: does this syndrome exist? Case reports and review of the literature. *Am J Dermatopathol* 1999. 21:369-374.

20. Rongioletti, F. , R. Hazini , G. Gianotti , and A. Rebora . Fibrofolliculomas, trichodiscomas and acrochordons (Birt-Hogg-Dube) associated with intestinal polyposis. *Clin Exp Dermatol* 1989. 14:72-74.

21. Frantzen, B. , C. Rose , T. Schulz , E. B. Brocker , and H. Hamm . Hornstein-Knickenberg and Birt-Hogg-Dube syndrome: report of a case with spontaneous pneumothorax and aplasia of the left internal carotid artery [in German]. *Hautarzt* 2001. 52:1016-1020.

22. Warren MB, Torres-Cabala CA, Turner ML, Merino MJ, Matrosova VY, Nickerson ML, Ma W, Linehan WM, Zbar B, Schmidt LS. Expression of Birt-Hogg-Dubé mRNA in normal and neoplastic human tissues. *Mod Pathol* 2004;17:998-1011.

23. Vocke C, Yang Y, Pavlovich CP, Schmidt LS, Nickerson ML, Torres-Cabala CA, Merino MJ, Walther MM, Zbar B, Linehan

WM. High frequency of somatic frameshift BHD gene mutations in Birt-Hogg-Dubé-associated renal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:931-5

24. Khoo SK, Giraud S, Kahnoski K, Chen J, Motorna O, Nickolov R, Binet O, Lambert D, Friedel J, Levy R, Ferlicot S, Wolkenstein P, Hammel P, Bergerheim U, Hedblad M-A, Bradley M, Teh BT, Nordenskjold M, Richard S. Clinical and genetic studies of Birt-Hogg-Dubé syndrome. *J Med Genet* 2002;39:906-12

25. Schmidt LS, Nickerson ML, Warren MB, Glenn GM, Toro JR, Merino MJ, Turner ML, Choyke PL, Sharma N, Peterson J, Morrison P, Maher ER, Walther MM, Zbar B, Linehan WM. Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;76:1023-33.

26. J R Toro, M-H Wei, G M Glenn, M Weinreich, O Toure, C Vocke, M Turner, P Choyke, M J Merino, P A Pinto, S M Steinberg, L S Schmidt, W M Linehan BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dubé

syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports *J Med Genet* 2008;45:321-331 Published Online First: 30 January 2008 doi:10.1136/jmg.2007.054304

27. Okimoto K, Kouchi M, Kikawa E, Toyosawa K, Koujitani T, Tanaka K, Matsuoka N, Sakurai J., Hino A novel "Nihon" rat model of a Mendelian dominantly inherited renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:1096-9

28. Lingaas F, Comstock KE, Kirkness EF, Sorensen A, Aarskaug T, Hitte C, Nickerson ML, Moe L, Schmidt LS, Thomas R, Breen M, Galibert F, Zbar B, Ostrander EA. A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German shepherd dog. *Hum Mol Genet* 2003;12:3043-53

29. Singh SR, Zhen W, Zheng Z, Wang H, Oh SW, Liu W, Zbar B, Schmidt LS, Hou SX. The *Drosophila* homolog of the human tumor suppressor gene BHD interacts with the JAK-STAT and Dpp signaling pathways in regulating male germline stem cell maintenance. *Oncogene* 2006;25:5933-4

30. Baba M, Hong SB, Sharma N, Warren MB, Nickerson ML, Iwamatsu A, Esposito D, Gillette WK, Hopkins RF, 3rd, Hartley JL, Furihata M, Oishi S, Zhen W, Burke TR, Jr, Linehan WM, Schmidt LS, Zbar B. "Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signalling". Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:15552-7

31. Baba M, Furihata M, Hong SB, Tessarollo L, Haines DC, Southon E, Patel V, Igarashi P, Alvord WG, Leighty R, Yao M, Bernardo M, Ileva L, Choyke P, Warren MB, Zbar B, Linehan WM, Schmidt LS. Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys. J Natl Cancer Inst.2008;100:140-154. doi: 10.1093/jnci/djm288

32. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, et al. (1998) Nature 391:184-187.

33. Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL (2004) Genes Dev18:1533-1538

34. Cheadle JP, Reeve MP, Sampson JR, Kwiatkowski DJ (2000) Hum Genet 107:97-114.
35. Eng C (2003) Hum Mutat 22:183-198.
36. Harris TE, Lawrence JC, Jr (2003) Sci STKE 2003:re15.
37. Fingar DC, Blenis J (2004) Oncogene 23:3151-3171.
38. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D (2003) Curr Biol 13:2004-2008.
39. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:3329-3335.
40. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL (2003) Genes Dev 17:1829-1834
41. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC (2004) Cancer Cell 6:91-99.



42. Cantley LC, Neel BG (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:4240-4245.
43. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T (2002) Nat Cell Biol 4:658-665
44. Hisashi Hasumi, Masaya Baba, Seung-Beom Hong, Yukiko Hasumi, Ying Huang, Masahiro Yao, Vladimir A. Valera, W. Marston Linehan, and Laura S. Schmidt<sup>1</sup>, "Identification and characterization of a novel folliculin-interacting protein FNIP2" *Gene*. 2008 May 31; 415(1-2): 60-67. doi:10.1016/j.gene.2008.02.022.
45. Chomczynski et al. *Anal. Biochem.* (1987) ; 162(1),156-159.
46. Sambrook et al. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.