

ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ I FUNCIONALS EN GENS CANDIDATS PER A L'OSTEOPOROSI

Memòria presentada per

Mariona Bustamante Pineda

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi dirigida per la Dra. Susana Balcells Comas i pel Dr. Daniel Grinberg Vaisman
al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
de la Universitat de Barcelona

Dra. Susana Balcells Comas

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Mariona Bustamante Pineda

2007

1. ARTICLES RELACIONATS AMB AQUESTA TESI

1.1. BÚSQUEDA DE MUTACIONS EN MEMBRES D'UNA FAMÍLIA LONGEVA DE MALLORCA

Vam tenir coneixement d'un individu de 113 anys i d'altres membres d'avançada edat de la seva família, els quals presentaven un molt bon estat de salut general. Entre les causes de mort durant la tercera edat hi ha les fractures osteoporòtiques, fet que ens va fer pensar que segurament aquests individus presentarien una DMO superior a la normal per a la seva edat.

Tot i que l'osteoporosi i la longevitat són fenotips complexos determinats per una sèrie de polimorfismes, també existeixen fenotips extrems que venen determinats per la presència de certes mutacions o variants rares. Per això, vam genotipar la mutació G171V situada en el gen *LRP5* que dona el fenotip d'alta massa òssia (HBM). També ens vam plantejar realitzar una búsqueda de variants rares en el gen *KLOTHO*, el *knock out* del qual comporta una disminució de la longevitat i problemes ossis.

En analitzar la DMO dels membres de la família vam observar que tot i que aquesta era superior a l'esperada per a individus de la seva edat, alguns membres presentaven osteoporosi o osteopenia. En l'estudi genètic vam observar que cap dels membres de la família presentava la mutació relacionada amb el fenotip HBM, i després de la seqüenciació de la regió transcrita del gen *KLOTHO*, no vam trobar cap mutació.

Com que tant l'osteoporosi com la longevitat són fenotips complexos, diverses variants situades en gens diferents a *KLOTHO* així com també determinades condicions ambientals podrien participar en la determinació d'aquests fenotips.

Referència del treball publicat:

■ Mellibovsky L*, Bustamante M*, Lluch P, Nogues X, Grinberg D, Balcells S, Diez-Perez A. 2007. *Bone mass of a 113 years-old man*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 62(7):794-5.

*Ambdós autors han participat de manera equivalent en el treball presentat.

■ Additional data

Aportació personal a l'article:

Obtenció del DNA a partir de mostres de sang.

Genotipat de la mutació G171V en el gen *LRP5*, i seqüenciació del gen *KLOTHO*.

Participació en l'elaboració del manuscrit de l'article.

Additional data

Material and methods

The pedigree

Figure 1 depicts the family structure of the proband and highlights the participating individuals.

DNA analysis

Genomic DNA was obtained from blood leukocytes using a Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA).

Typing of the G171V in the exon 3 of the LRP5 (HBM phenotype)

The mutation was typed by PCR and sequence with the primers 5'-CTTCTCTTGCCCTGCCCCC-3' (forward) and 5'-TGCTGCCATCCATCCCTG-3' (reverse). The PCR protocol was: 0.4 μ M of each primer, 0.2 μ M of each dNTP, 0.7 U of Taq polymerase (Promega), 2 mM of MgCl₂, and 100 ng of DNA in a final volume of 25 μ l. The program consisted of an initial denaturation step of 1 minute at 94°C, 35 cycles of 40 s at 94°C, 30 s at 59°C and 30 s at 72°C and a final step of 5 minutes at 72°C. The PCR products were purified with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amershan Pharmacia), sequenced with BIGDYE Terminator v2.0 (Applied Biosystems) and detected in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Screening of exons 1-5 of KLOTHO gene

The exons were screened by PCR and sequence with the primers and temperature indicated in the Table 1. The PCR protocol was: 0.4 μ M of each primer, 0.2 μ M of each dNTP, 0.7 U of Taq polymerase (Promega), 1-2.5 mM of MgCl₂, and 100 ng of DNA in a final volume of 25 μ l. The program consisted of an initial denaturation step of 1 minute at 94°C, 35 cycles of 40 s at 94°C, 30 s at the indicated temperature and 30 s at 72°C and a final step of 5 minutes at 72°C. The PCR products were purified with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amershan Pharmacia), sequenced with BIGDYE Terminator v2.0 (Applied Biosystems) and detected in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Results

Table 2 summarizes the results of the sequence analysis of *KLOTHO* in the individuals studied.

Table 1 Primers for the amplification of 17 overlapping fragments from the *KLOTHO* gene

<i>Exon</i>	<i>Size</i>	<i>Fragment</i>	<i>Primers</i>	<i>Temp. (°C)</i>
1	535 bp	A	F1A: AACAGGTGCCTTTCTCCGAC R1A: CAGATGGACGCACCCTTGCC	59
	507 bp	B	F1B: GACGGCTTCCTCTGGGC R1B: GACCTGACCGCCGAAGTG	62
	337 bp	C	F1C: GGTCACCCTGTACCACTGG R1C: CAGTCCACACTTCCCC	58
2	399 bp	A	F2A: TCTGATTTGGGGATTCAAGTATT R2A: GGTCCAAAGCAAAGAGCAA	59
	475 bp	B	F2B: CCCGTATTTATTGATGGTGACT R2B: GCCAAAATGAATGTCTCCAT	58
3	437 bp	A	F3: CCAAACGAGAAGCATTACACTT R3: TAGTGATAGGGCTTGGTGAGAC	59
	564 bp	B	F3: CCAAACGAGAAGCATTACACTT R3 S: CTGCACCCTTCTCTCCAAA	60
4	439 bp	A	F4A: CTCAGGACTGCCCAGGTG R4A: CAGGGCAGTGTAGGGGTTT	60
	429 bp	B	F4B: CCCTGTGGCAGCCTATGG R4B: TCAGCCAGTCCCTCATCACC	62
	535 bp	C	F4C: ATTTGACATTGGCTGGCTG R4C: GGGTGGCAGTGTGTGTTG	56
5	333 bp	A	F5A: TGTGTGACAGAGCAAGACTCC R5A: CGGGTGTGAAAAAACTGC	60
	392 bp	B	F5B: GACAGCAATGGTTTCCCG R5B: CAGGCACTATTCGCATTATTCA	59
	402 bp	C	F5C: AACATTTTGTGGCTTATGACAG R5C: CCCTCTGTCGTCTCTCCTG	57
	447 bp	D	F5D: GGCTTCCCCTCTGTCAAATC R5D: GAAAGGTCATGTCATTCAATCCA	61
	529 bp	E	F5E: GTGGAGGAAAGGAGGAAAAAG R5E: CTGTGTCAGTGAGGTTGGCA	59
	531 bp	F	F5F: CAGGGAAGTCTCTCTATTACACTG R5F: TTGTGATACATTCTGTGGTG	56
	442 bp	G	F5G: TCTCAGAACCCAGAAATAGCC R5G: TGCTCCCATCACATCTTAGG	58

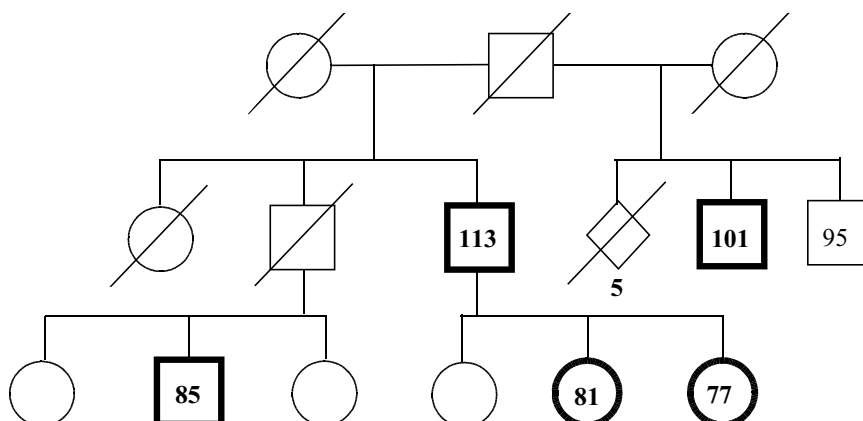


Figure 1. Pedigree of the family. Squares and circles with thick lines indicate individuals analysed in this work. Numbers within pedigree symbols correspond to age. Five step-siblings of the index case who are dead are indicated by only one pedigree symbol with a number 5 below it.

Table 2. Genotypes of the polymorphisms of *KLOTHO* gene of the index case and his family members (Ensembl 2006)

<i>KLOTHO</i>	bp	Identification	Change	SNP	MAF	Index case	Daughter	Daughter (2)	Nephew	Brother
Exon 1	827	rs1052018	P15Q	C/A	-	CC	CC	CC	CC	CC
		rs1052019	F45V	T/G	G=0	TT	TT	TT	TT	TT
		rs2772364	D91D	C/T	-	CC	CC	CC	CC	CC
		rs35239775	L109R	T/G	G=0.014	TT	TT	TT	TT	TT
Exon 2	511	rs9536313	-46 C/G	C/G	G=0.094	CC	-	CC	CC	CC
		rs9536314	F352V	T/G	G=0.038	TT	TG	TT	TT	TT
		rs9527025	C370S	G/C	C=0.110	GG	GC	GG	GG	GG
		rs9527026	K385K	A/G	-	GG	GA	GG	GG	GG
Exon 3	269(M) 320(S)	rs3752472	S514P	T/C	-	CC	CC	CC	CC	CC
Exon 4	1102	rs564481	H589H	C/T	T=0.207	TT	CT	CT	CT	CT
		rs34292549	R620C	C/T	T=0.014	CC	CC	CC	CC	CC
		rs648202	A749A	C/T	T=0.320	CC	CC	CC	CC	CC
		rs36012519	T837T	G/A	A=0.013	GG	GG	GG	GG	GG
		rs649964	A873A	C/T	T=0.035	CC	CC	CC	CC	CC
		rs650439	+22 A/T	A/T	T=0.354	AA	AA	AA	AA	AA
Exon 5	2294	rs35328951	Y1003C	A/G	G=0.013	AA	AA	AA	AA	AA
		-	STOP+743 T/C	T/C	-	TC	TT	TT	TT	TT
Total bp	5054 bp									
Sequenced bp	4994 bp									
% sequenced	98.8%									

M means membrane form and S means soluble form