

# Búsqueda de variantes del gen *LRP4* en mujeres con alta masa ósea y en pacientes con malformación de Chiari tipo I

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2021000100004>

**Martínez-Gil N, Grinberg D, Balcells S**

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB). Instituto de Investigación San Joan de Déu (IRSJD). Barcelona (España)

Fecha de recepción: 22/12/2020 - Fecha de aceptación: 01/03/2021

Trabajo premiado con una beca para asistir al ASBMR de 2019 (Orlando, EE.UU.)

## Resumen

**Objetivo:** *LRP4* es un facilitador esencial en la inhibición específica de esclerostina de la vía canónica de Wnt. Mutaciones en *LRP4* se han asociado a diversas patologías entre las cuales se incluyen la patología de crecimiento óseo, esclerosteosis y la malformación de Chiari tipo I (MCI).

**Material y métodos:** Se ha re-secuenciado el gen *LRP4* en dos pequeñas cohortes de pacientes con el fenotipo de alta masa ósea (HBM) y con MCI con el objetivo de encontrar variantes causales.

**Resultados:** Entre las mutaciones encontradas destacamos: 1) una mutación de cambio de sentido (*missense*) en un paciente con MCI, que no cosegrega con el fenotipo en la familia; 2) una mutación intrónica no descrita previamente (c.3364+16A>C) en una mujer con HBM; y 3) una mutación intrónica en una mujer con HBM cuya frecuencia en población control europea es muy baja.

**Conclusiones:** Aunque no hemos encontrado variantes en *LRP4* que expliquen el fenotipo HBM o MCI en los pacientes estudiados, animamos a otros investigadores a que analicen el gen *LRP4* en sus pacientes ya que es un buen candidato funcional de ambos fenotipos.

**Palabras clave:** *LRP4*, HBM, malformación de Chiari tipo I, densidad mineral ósea, esclerostina.

## INTRODUCCIÓN

La vía de Wnt es una vía de señalización involucrada en una gran variedad de procesos, incluidos el desarrollo y la homeostasis ósea<sup>1</sup>. De acuerdo con esto, se han identificado mutaciones en diversos componentes de la vía de Wnt que causan diferentes enfermedades musculoesqueléticas<sup>2</sup>. La vía canónica de Wnt se inicia con la formación de un complejo heterotrimérico entre un co-receptor, LRP5/6, un ligando, WNT, y un receptor, FZD, lo que produce una acumulación de la  $\beta$ -catenina que, una vez en el núcleo, activará la transcripción de numerosos genes diana importantes para el hueso<sup>1</sup>. Esta activación está finamente regulada por una serie de inhibidores extracelulares como DKK1 y esclerostina que se unen a LRP5/6 impidiendo la formación del complejo heterotrimérico. Para que DKK1 y escleros-

tina ejerzan su actividad inhibitoria, deben formar otro complejo heterotrimérico con LRP5 y KREMEN1/2 o LRP4, respectivamente. Aunque en el caso de DKK1 la presencia de KREMEN no parece ser necesaria para llevar a cabo una correcta inhibición, sí que es indispensable la presencia de LRP4 para la función inhibitoria de esclerostina<sup>3,4</sup>.

En humanos se han descrito mutaciones en *LRP4* que causan diferentes enfermedades que no solo afectan a la masa ósea, sino también a la regulación de las extremidades y del riñón entre otras, dependiendo de la posición donde tiene lugar la mutación<sup>2</sup>. En concreto, mutaciones en la cavidad central del tercer propulsor  $\beta$  ( *$\beta$ -propeller*) causan esclerosteosis, caracterizada por una sindactilia variable e hipercrecimiento óseo progresivo, particularmente severo en el esqueleto facial y crá-



neo. Estos pacientes presentan un incremento en la vía de Wnt en osteoblastos, generando un aumento de la formación ósea<sup>4-6</sup>. Además de estas mutaciones, en 2017, Merello y cols.<sup>7</sup> describieron una mutación en el segundo dominio  $\beta$ -*propeller* (p.Thr851Arg) que cosegregaba con el fenotipo en una familia con malformación de Chiari tipo I (MCI). Ésta es una malformación del sistema nervioso central caracterizada por un desplazamiento caudal de las amígdalas cerebelosas, que genera síntomas muy variados tanto en el inicio como en la gravedad (Orphanet, <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>). Aunque algunos pacientes con MCI pueden ser asintomáticos, otros pueden presentar cefalea suboccipital y dolor cervical, entre otros. Es interesante resaltar que esta malformación fue descrita en un paciente que presentaba un fenotipo de alta masa ósea (*High Bone Mass*: HBM) debido a mutaciones de ganancia de función en *LRP5*, abriendo así una posible relación entre la MCI, el fenotipo HBM y la vía de Wnt<sup>8</sup>. Teniendo en cuenta el papel de *LRP4* sobre la vía de Wnt y el importante papel que tiene esta vía en la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) y en el desarrollo del cráneo, hipotetizamos que mutaciones en *LRP4* podrían ser los causantes del fenotipo HBM de mujeres con este fenotipo o de causar la enfermedad en pacientes con MCI. En este trabajo hemos realizado una re-secuenciación del gen *LRP4* en una cohorte de 10 mujeres con el fenotipo HBM y en una cohorte de 12 pacientes con MCI.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cohortes estudiadas

La cohorte HBM estudiada está descrita en el trabajo de Sarrión y cols.<sup>9</sup>. Brevemente, se trata de 10 mujeres con fenotipo HBM, donde este fenotipo se define como la suma de los valores de *Z-score* de columna y de fémur igual o superior a 4.

La cohorte MCI estudiada consta de 12 pacientes con MCI no relacionados, diagnosticados y tratados en el Hospital del Mar de Barcelona. El diagnóstico de MCI se basa en la posición de las amígdalas cerebelosas mediante resonancia magnética cerebral (Achieva 3.0 T, Philips, Amsterdam, Países Bajos) con una herniación igual o superior a 5 mm en una imagen ponderada en T1 sagital media en presencia de signos o síntomas que indiquen compresión neural en la unión cráneo-vertebral, siringohidromielia, disfunción cerebelosa o hipertensión intracraneal. Además, se dispone de información de 8 familiares de 4 de los pacientes con MCI.

### Re-secuenciación de *LRP4*

El ADN genómico de los casos de MCI y sus parientes y de las mujeres HBM se aisló de leucocitos de sangre periférica utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cuanto a la re-secuenciación, específicamente, hemos amplificado los exones que codifican para las mutaciones causantes del síndrome de Cenani-Lenz (p.D137N, p.C160Y, p.D449N, p.T461P, p.L473F, p.D529N, p.L953P, p.C1017R, p.R1277H, p.E1233K) y el tercer dominio  $\beta$ -*propeller* donde se localizan las mutaciones causantes del síndrome miasténico y de la esclerosteosis. La amplificación de cada uno de estos fragmentos se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Los fragmentos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de

agarosa y su purificación se hizo en MultiScreen™ Vacuum Manifold 96-well plates (Merck Millipore). Los productos de PCR purificados fueron secuenciados mediante el método de Sanger en el servicio de genómica del CCiTUB (Genómica, Parc Científic, Barcelona, España). El kit de marcado utilizado fue BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher), la detección y la electroforesis se realizaron en los secuenciadores capilares automáticos 3730 Genetic Analyzer y 3730xl Genetic Analyzer (ThermoFisher). El diseño de los cebadores se basó en la secuencia consenso ENSG00000134569 (*LRP4*; GRCh37.p13) y la secuencia de los mismos se presenta en la tabla 1.

### Análisis bioinformático y predicciones *in silico* del efecto de las variantes

Para identificar y caracterizar todas las variantes, hemos usado información de la base de datos Ensembl GRCh37.p13 y ENCODE. La frecuencia del alelo minoritario (MAF) de cada una de las variantes está extraída de la población europea no finlandesa de gnomAD v2.1.1. Hemos utilizado SIFT, (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) y PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para testar el efecto de las variantes de cambio de aminoácido (*missense*). La base de datos GTEx ([www.gtexportal.org/home/](http://www.gtexportal.org/home/)) se ha utilizado para identificar variantes que actúan como eQTLs.

## RESULTADOS

### Re-secuenciación de *LRP4* en mujeres con fenotipo HBM y en pacientes con MCI

En la re-secuenciación de *LRP4* hemos identificado 12 variantes, de las cuales una es una variante no descrita anteriormente (c.3364+16A>C; tabla 2). Esta variante se ha encontrado en heterocigosis en la mujer HBM2 que presenta una suma de *Z-score* (columna y fémur) de 4,6. Seis de las 12 variantes identificadas se encuentran tanto en la cohorte de mujeres con fenotipo HBM como en la cohorte de pacientes con MCI, con una frecuencia similar en ambas cohortes a la de población europea. Además, hemos encontrado 4 variantes solamente presentes en la cohorte HBM y 2 variantes únicamente presentes en la cohorte MCI. Todas las variantes descritas, exceptuando rs558515201 y la variante c.3364+16A>C, aparecen como eQTL de diferentes genes y tejidos en la base de datos GTEx. En concreto las variantes rs17790156, rs61898529, rs2306028, rs964551 y rs2306032 son eQTL de *LRP4*.

## DISCUSIÓN

En diferentes estudios se ha destacado el papel del gen *LRP4* en la determinación de la DMO, ya que mutaciones en el mismo generan un fenotipo de sobrecrecimiento óseo. Además, también se lo ha asociado a la MCI en un trabajo de secuenciación de todo el exoma<sup>7</sup>. En el presente trabajo hemos re-secuenciado las regiones del gen que contienen mutaciones asociadas a diferentes patologías. En él solo hemos encontrado una mutación *missense* en *LRP4* en una paciente con MCI que no cosegrega con el fenotipo en la familia, descartando así su patogenicidad (Figura 1). Es interesante destacar que hemos encontrado una variante no descrita previamente (c.3364+16A>C) y la variante rs55851521, que presenta una muy baja frecuencia en la población europea (MAF=0,00006480), en heterocigosis en dos mujeres con HBM. Además, las variantes rs3751097 y rs540384558, presentes tanto en pacientes HBM como

**Tabla 1. Cebadores utilizados en la re-secuenciación de *LRP4***

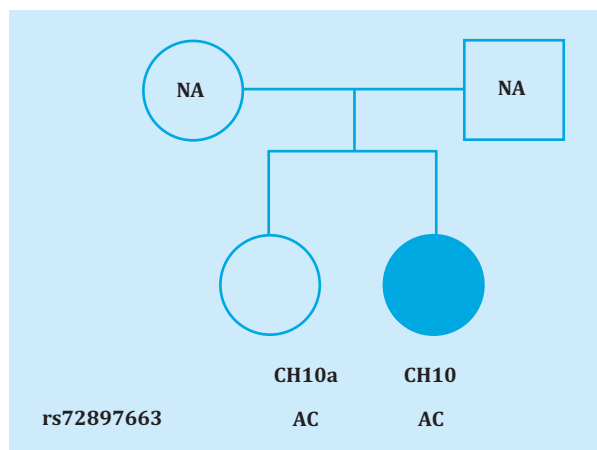
Cebador	Directo	Reverso
LRP4_Frag1	GGGCTTTAAGTCAGGCTTCC	CAACCCAACAGCCTGAGGT
LRP4_Frag2	GAGTGGGAGGACGACAGAAG	TTGCAAACCACTGGCCTATT
LRP4_Frag3	ATAGTGCCTGGCCCAAAAA	GCCAGCTACACCACACTTT
LRP4_Frag4	TCGCCTTAAATTATGGTTGC	ACCACTGGGTTAGGGTCTCC
LRP4_Frag5	AGTGGGAGAGCTGCTTTCTG	CCATCTGCAAGGAAGGAAGA
LRP4_Frag6	TGCGTTTTCTTGATTTCCT	GATGCAAGCTTCTCTCCAC
LRP4_Frag7	AAGGTTGAGATAATGCACATGAA	ACAGGTCACCGTCTTTCTGG

**Tabla 2. Variantes encontradas en la re-secuenciación de *LRP4* en mujeres con fenotipo HBM y en pacientes con MCI. Los genotipos de la primera columna se indican con los nucleótidos de la cadena codificante del gen *LRP4*, que es la reversa respecto de la que se usa de modo estándar para indicar las SNVs genómicas. Por ello, por ejemplo, el alelo A de c.431-12G>A equivale al alelo T de rs139371503, e igualmente para las demás variantes**

LRP4	Número rs	Tipo	MAF			Efecto
			EUR	HBM	MCI	
c.431-12G>A	rs139371503	I	0,011 (T)	0,05 (T)	-	eQTL
c.1309+24G>A	rs3751097	I	0,101 (T)	0,2 (T)	0,125 (T)	eQTL
c.1309+87_1309+91dup	rs540384558	I	0,038 (dup)	0,05 (dup)	0,083 (dup)	eQTL
p.Asn501His	rs72897663	M	0,044 (G)	-	0,042 (G)	eQTL T;B
p.Lys546=	rs10838631	S	0,011 (T)	0,05 (T)	-	eQTL
c.2507-73C>T	rs558515201	I	<0,01 (A)	0,05 (A)	-	
c.2507-204C>T	rs61898529	I	0,093 (A)	-	0,042 (A)	eQTL
c.2612+104T>A	rs17790156	I	0,09436 (T)	0,2 (T)	0,125 (T)	eQTL
c.3004+18C>A	rs2306028	I	0,127 (T)	0,1 (T)	0,042 (T)	eQTL
c.3364+16A>C	-	I	-	0,05 (C)	-	
c.3536+22C>A	rs964551	I	0,227 (G)	0,15 (G)	0,083 (G)	eQTL
c.3700-21C>G	rs2306032	I	0,329 (G)	0,25 (G)	0,21 (G)	eQTL

MAF: frecuencia del alelo minoritario; EUR: población europea no finlandesa de gnomAD v2.1.1.; HBM: fenotipo de alta masa ósea; MCI: malformación de Chiari tipo I; dup: duplicación; M: variante *missense*; I: variante intrónica; S: variante sinónima; eQTL: descrito como eQTL en Gtex; T: tolerado por SIFT; B: benigno por Polyphen-2.

**Figura 1. Pedigrí de la familia de la paciente de MCI CH10. NA: no se dispone de datos de los progenitores. Los genotipos se indican con los nucleótidos de la cadena codificante del gen *LRP4*, que es la reversa respecto de la que se usa de modo estándar para indicar las SNVs genómicas. Por ello, el alelo C equivale al alelo G de rs72897663**



MCI, se encuentran en un elemento regulador en *cis* categorizado como *distal enhancer-like signature* por ENCODE. Por otro lado, de manera contraria a lo esperado, hemos encontrado en ambas cohortes una frecuencia ligeramente menor para el alelo minoritario de la variante rs2306032 que ha sido definido como protector en un estudio de asociación de genoma completo con la DMO total<sup>10</sup>.

Hay que tener en cuenta el bajo número de pacientes como una limitación del presente trabajo. Esto podría explicar tanto la ausencia de variantes causales en el gen *LRP4* en estas dos cohortes como los resultados contrarios a los esperados en la frecuencia alélica en el SNP rs2306032. Es por esto que incrementar el tamaño de las cohortes nos permitiría un conocimiento más profundo del papel de *LRP4* sobre estos fenotipos.

En conclusión, si bien *LRP4* es un gen indudablemente importante para la biología ósea, no hemos encontrado ninguna variante que pueda estar explicando el fenotipo HBM ni MCI. A pesar de estos resultados negativos, es interesante tener en cuenta a *LRP4* en la selección de genes candidatos que puedan explicar fenotipos de HBM o causantes de MCI.



**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-92.
- Huybrechts Y, Mortier G, Boudin E, Van Hul W. WNT signaling and bone: lessons from skeletal dysplasias and disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:165.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.* 2002;417(6889):664-67.
- Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, et al. Bone overgrowth-associated mutations in the *LRP4* gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem.* 2011;286 (22): 19489-500.
- Fijalkowski I, Geets E, Steenackers E, Van Hoof V, Ramos FJ, Mortier G, et al. A novel domain-specific mutation in a sclerosteosis patient suggests a role of *LRP4* as an anchor for sclerostin in human bone. *J Bone Miner Res.* 2016; 31(4):874-81.
- Bukowska-Olech E, Sowińska-Seidler A, Szczałuba K, Jamsheer A. A novel biallelic splice-site variant in the *LRP4* gene causes sclerosteosis 2. *Birth Defects Res.* 2020;112(9):652-9.
- Merello E, Tattini L, Magi A, Accogli A, Piatelli G, Pavanello M, et al. Exome sequencing of two Italian pedigrees with non-isolated Chiari malformation type I reveals candidate genes for cranio-facial development. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(8):952-9.
- Whyte MP, Reinus WH, and Mumm S. High-bone-mass disease and *LRP5*. *N Engl J Med.* 2004;350(20):2096-9.
- Sarrión P, Mellibovsky L, Urreiziti R, Civit S, Cols N, García-Giralt N, et al. Genetic analysis of high bone mass cases from the BARCOS cohort of Spanish postmenopausal women. *PloS One.* 2014;9(4):e94607.
- Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesni A, Ahluwalia TS, et al. Life-course genome-wide association study meta-analysis of total body BMD and assessment of age-specific effects. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):88-102.