

Bases Genètiques de l'Osteoporosi: Estudi del gen *LRP5*.

Lídia Agueda Calpena

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

BASES GENÈTIQUES DE L'OSTEOPOROSI: ESTUDI DEL GEN *LRP5*

Memòria presentada per
Lídia Àgueda Calpena
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
Programa de Genètica 2004-2006

Dra. Susana Balcells Comas

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Lídia Agueda Calpena
2010

CONTINGUTS

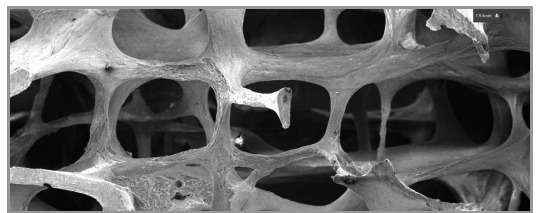
INTRODUCCIÓ	6
1. El teixit ossi.....	8
1.1. Funció i estructura del teixit ossi.....	8
1.2. Les cèl·lules òssies i l'osteogènesi	9
1.3. El remodelat i el control de l'homeòstasi òssia.....	12
2. Elements clau per a la diferenciació i funció dels osteoblasts	15
2.1. El factor de transcripció Runx2.....	16
2.2. La via de Wnt.....	20
3. Exemples de fenotips ossis.....	24
3.1. Dos fenotips ossis monogènics oposats: la síndrome de l'osteoporosi i pseudoglioma (OPPG) i el <i>High Bone Mass</i> (HBM)	24
3.2. L'osteoporosi postmenopàusica	26
3.2.1. Osteoporosi i fractura osteoporòtica: definició i tipus	26
3.2.2. Factors de risc.....	29
3.2.3. Diagnòstic i tractament de l'osteoporosi postmenopàusica.....	29
4. L'estudi genètic d'una malaltia complexa: l'osteoporosi com a exemple.	33
4.1. Conceptes bàsics d'epidemiologia genètica.....	33
4.1.1. Malaltia monogènica <i>versus</i> malaltia complexa	33
4.1.2. La variabilitat genètica	34
4.1.2.1. Tipus de variabilitat genètica	34
4.1.2.2. El desequilibri de lligament i els blocs haplotípics	36
4.1.2.3. Les tècniques de genotipat	38
4.1.2.4. La funcionalitat dels polimorfismes	39
4.2. Mètodes d'estudi de les malalties complexes. Resultats en el camp de l'osteoporosi.	41
4.2.1. L'heretabilitat	42
4.2.2. Els estudis de lligament (linkage)	42
4.2.3. Els estudis d'associació.....	44
4.2.4. Les meta-anàlisis	49
4.2.5. Els estudis d'expressió gènica	50

4.2.6. Els estudis en animals	51
OBJECTIUS	52
RESULTATS	55
<i>CAPÍTOL 1 : A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women.</i>	57
<i>CAPÍTOL 2: Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis.</i>	58
<i>CAPÍTOL 3: Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009. Novel implication of Runx2 in LRP5 transcriptional regulation.....</i>	63
<i>CAPÍTOL 4: Analysis of three functional polymorphisms in relation to osteoporosis phenotypes: replication in a Spanish cohort</i>	93
DISCUSSIÓ	95
1. Evolució dels estudis d'associació en el camp de l'osteoporosi	99
1.1. El primer pas: les estimes d'heretabilitat dels fenotips osteoporòtics.....	99
1.2. Els estudis d'associació directa en els gens candidats clàssics	100
1.3. Nous gens candidats i més polimorfismes. Les estratègies d'associació indirecta.	101
1.4. L'era dels GWAs	103
1.5. El paper de les CNVs en l'osteoporosi	105
2. La força de la mida mostral: les meta-anàlisis.....	106
3. La replicació: Una solució o més preguntes?.....	109
4. "The missing heritability"	112
4.1. El replantejament de la hipòtesi variant comuna / malaltia comuna.....	112
4.2. El paper de les interaccions	115
5. El per què de les associacions trobades: els estudis funcionals	117
6. Aplicacions dels estudis d'associació i perspectives de futur	119
CONCLUSIONS	123
BIBLIOGRAFIA	129
ANNEX	139

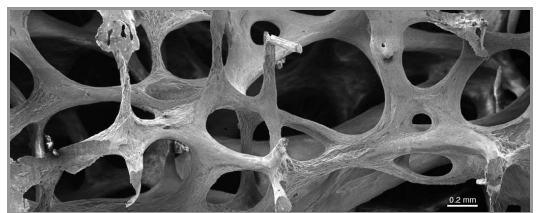
LLISTAT D'ABREVIATURES:

BARCOS	cohort de dones potsmenopàusiques de l'àrea de Barcelona
BMPs	proteïnes morfogèniques de l'os
CBFA1	<i>core binding factor α 1</i>
CCD	displàsia cleido-cranial
CD/CV	<i>common disease / common variant hypothesis</i> ; malaltia comuna / variant comuna
CD/RV	<i>common disease / rare variant hypothesis</i> ; malaltia comuna / variant minoritària
CNVs	<i>copy number variants</i> , variants de nombre de còpia
COL1A1	cadena α 1 del col·lagen tipus I
CHIP	immunoprecipitació de cromatina
DMO/BMD	densitat mineral ossia, <i>bone mineral density</i>
DXA	Absorciometria dual de rajos X
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> , assaig de canvi en la mobilitat electroforètica o estudi de retenció en gel
ESR1 ESR2	receptors d'estrògens 1 i 2
FGF	factor de creixement fibroblàstic
FN	<i>femoral neck</i> , coll del fèmur
GEFOS	Genetic Factors for Osteoporosis, projecte europeu
GENOMOS	Genetic Markers for Osteoporosis, projecte europeu
GWA	<i>genome wide association</i> , associació a nivell de tot el genoma
HapMap	Mapa d'Haplotips del Genoma Humà, projecte internacional
HBM	<i>high bone mass</i> , fenotip d'alta massa òssia
HeLa	línia cel·lular d'adenocarcinoma humà
Kb	quilobase
LCT	lactasa
LD	desequilibri de lligament
LRP5	proteïna 5 relacionada amb el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat
LRP6	proteïna 6 relacionada amb el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat
LS	<i>lumbar spine</i> , columna
MAF	freqüència de l'al·lel minoritari
M-CSF	factor estimulador de colònies de macròfags
MSC	cèl·lules mare mesenquimals
MTHFR	metilentetrahidrofolat reductasa
OPG	osteoprotegerina
OPPG	síndrome de l'osteoporosi-pseudoglioma
OR	<i>odds ratio</i> , oportunitat relativa, raons d'oportunitat
OSE	element específic d'osteoblast
P	nivell de significació
pGL3	vector amb el gen reporter Luciferasa (de Promega)
PTH	hormona paratiroidea
QTL	<i>quantitative trait locus</i> , locus de tret quantitatiu
RANK	membre 11A de la superfamília de receptors del TNF
RANKL	ligand del receptor RANK
RFLP	polimorfisme de fragments de restricció de longitud polimòrfica

RUNX2	<i>runt related transcription factor 2</i> , factor de transcripció 2 relacionat amb el domini runt (Cbfa1)
SAOS-2	línia cel·lular d'osteosarcoma humà
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfisme de canvi puntual de nucleòtid
TCF/LEF	<i>lymphoid enhancer binding factor</i> / factor de transcripció específic de cèlules T
TNFs	factors de necrosi tumoral
U-2 OS	línia cel·lular d'osteosarcoma humà
VDR	receptor de la vitamina D ₃



CONCLUSIONS



- ✓ Existeixen diversos polimorfismes d'*LRP5* associats amb la DMO i amb la fractura en la cohort BARCOS de dones postmenopàusiques espanyoles. Aquests resultats corroboren que *LRP5* és un gen de susceptibilitat per a l'osteoporosi.
- ✓ Concretament, el polimorfisme rs312009 de la seva regió 5' s'ha trobat associat amb DMO lumbar en la cohort BARCOS.
- ✓ El polimorfisme rs2508836, localitzat al primer intró del gen, s'ha trobat associat amb DMO lumbar i femoral.
- ✓ Els polimorfismes rs729635 i rs643892, localitzats a l'intró 1 i 5 respectivament, s'han trobat associats al risc de patir fractura osteoporòtica.
- ✓ Els polimorfismes de canvi d'aminoàcid, Val667Met (rs4988321) i Ala1330Val (rs3736228) no han resultat associats amb cap dels fenotips osteoporòtics avaluats.
- ✓ L'anàlisi per haplotips dels polimorfismes d'*LRP5* no ha proporcionat associacions addicionals, excepte en el cas de l'haplotip "GC" de l'extrem 3' del gen, associat a DMO femoral.
- ✓ A nivell de meta-anàlisi, dins del marc del projecte GENOMOS, els polimorfismes Val667Met i Ala1330Val del gen *LRP5* s'han trobat associats amb DMO lumbar i femoral, i amb el risc de fractura osteoporòtica vertebral o de qualsevol tipus.
- ✓ Tot i que les associacions trobades són altament significatives ($p < 10^{-7}$), la magnitud del seu efecte en la DMO és molt modesta (diferències en els valors de DMO compreses entre el 8 i 20 mg/cm²).
- ✓ L'anàlisi conjunta d'ambdues variants, Val667Met i Ala1330Val, demostra que els seus efectes en els fenotips osteoporòtics són independents.
- ✓ El polimorfisme Ile1062Val del gen *LRP6* no s'ha trobat associat amb cap dels fenotips osteoporòtics estudiats.

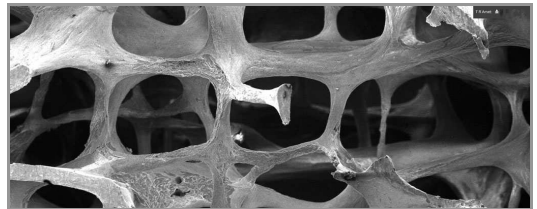
- ✓ Donada la petita magnitud dels efectes d'aquests dos polimorfismes de canvi d'aminoàcid descrits en GENOMOS, la limitació de mida mostral de la cohort BARCOS podria ser la responsable dels resultats negatius en aquesta.
- ✓ Els efectes que hem estat capaços d'identificar per als SNPs associats en la cohort BARCOS (0.02-0.07 g/cm²) i en GENOMOS (0.01-0.02 g/cm²) són petits, i segueixen la mateixa tendència de les associacions de variants comunes amb la majoria dels trets complexos estudiats actualment.

Dels diferents estudis funcionals realitzats en la regió reguladora d'*LRP5* on es troba el polimorfisme rs312009, associat a DMO lumbar, podem extreure'n que:

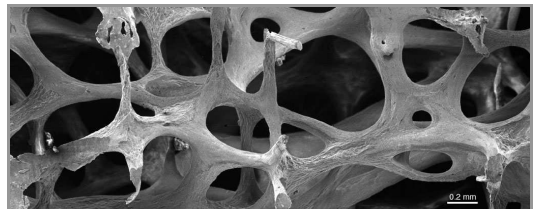
- ✓ El polimorfisme rs312009 es situa en un lloc d'unió per al factor de transcripció Runx2, tal i com demostren els assaigs de retenció en gel. La presència d'un o altre al·lel no afecta a aquesta unió.
- ✓ Els assaigs de gen reporter indiquen que l'al·lel T confereix una major activitat transcripcional a la regió 5' d'*LRP5* en Saos-2 i en U-2 OS.
- ✓ La mutació del nucli d'aquest lloc d'unió de Runx2 també té un efecte diferencial segons l'al·lel en rs312009.
- ✓ Aquestes evidències experimentals recolzen la funcionalitat de l'SNP rs312009; tot i que no podem descartar que altres polimorfismes en desequilibri de lligament amb ell també participin en l'associació trobada.
- ✓ Les regió de 3,3 kb situada a 5' d'*LRP5* és capaç de respondre amb una major capacitat transcripcional (assaig de gen reporter) després de l'expressió exògena de Runx2 en cel·lules HeLa
- ✓ En aquesta regió 5' d'*LRP5* trobem un mínim de 5 llocs d'unió de Runx2, identificats bioinformàticament i confirmats per assaigs de retenció en gel
- ✓ Tots cinc llocs de Runx2 semblen participar en diferent mesura en la resposta a Runx2.

Pel que fa a la replicació en la cohort espanyola BARCOS d'associacions prèviament descrites en altres poblacions, podem dir que:

- ✓ El polimorfisme Ala222Val del gen *MTHFR* es troba associat a fractura vertebral, de manera que els homozigots TT presenten un major risc de patir fractura vertebral (OR 2,3). Així, es replica en població espanyola aquesta associació ja descrita. Aquest mateix polimorfisme no s'ha trobat associat ni amb DMO lumbar ni amb DMO femoral.
- ✓ El polimorfisme Ile1062Val del gen *LRP6* no s'ha trobat associat a cap dels fenotips osteoporòtics analitzats en la nostra cohort.
- ✓ El polimorfisme -13910C>T del gen *LCT* no s'ha trobat associat amb cap dels fenotips osteoporòtics estudiats en la cohort BARCOS. Així es repliquen els resultats prèviament públicats en dones austríaques. Aquest polimorfisme sí que va trobar-se associat amb el pes i l'alçada.
- ✓ La freqüència de l'al·lel T (que confereix persistència de la lactasa) en la cohort BARCOS és del 38,6% i és consistent amb la clina de freqüències que s'observa a Europa.



BIBLIOGRAFIA



- Agueda, L., M. Bustamante, et al. (2008).** "A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women." J Bone Miner Res 23(12): 1954-63.
- Agueda, L., R. Urreizti, et al. (2010). "Analysis of Three Functional Polymorphisms in Relation to Osteoporosis Phenotypes: Replication in a Spanish Cohort." Calcif Tissue Int.
- Ai, M., S. Heeger, et al. (2005). "Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome." Am J Hum Genet 77(5): 741-53.
- Balemans, W., J. P. Devogelaer, et al. (2007).** "Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling." J Bone Miner Res 22(5): 708-16.
- Balemans, W. and W. Van Hul (2007). "The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes." Endocrinology 148(6): 2622-9.
- Bentley, D. R. (2006). "Whole-genome re-sequencing." Curr Opin Genet Dev 16(6): 545-52.
- Bi, W., J. M. Deng, et al. (1999). "Sox9 is required for cartilage formation." Nat Genet 22(1): 85-9.
- Birney, E., J. A. Stamatoyannopoulos, et al. (2007). "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project." Nature 447(7146): 799-816.
- Bodmer, W. and C. Bonilla (2008). "Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases." Nat Genet 40(6): 695-701.
- Bonura, F. (2009). "Prevention, screening, and management of osteoporosis: an overview of the current strategies." Postgrad Med 121(4): 5-17.
- Boyden, L. M., J. Mao, et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med 346(20): 1513-21.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature 423(6937): 337-42.
- Brown, M. A. and E. L. Duncan (1999). "Genetic studies of osteoporosis." Expert Rev Mol Med 1999: 1-18.
- Burton, P. R., M. D. Tobin, et al. (2005). "Key concepts in genetic epidemiology." Lancet 366(9489): 941-51.
- Cohen, M. M., Jr. (2009).** "Perspectives on RUNX genes: an update." Am J Med Genet A 149A(12): 2629-46.
- Cookson, W., L. Liang, et al. (2009). "Mapping complex disease traits with global gene expression." Nat Rev Genet 10(3): 184-94.
- Cordell, H. J. and D. G. Clayton (2005). "Genetic association studies." Lancet 366(9491): 1121-31.
- Cummings, S. R., J. San Martin, et al. (2009). "Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis." N Engl J Med 361(8): 756-65.
- Chen, X. D., P. Xiao, et al. (2009). "Gene Expression Profiling in Monocytes and SNP Association Suggest the Importance of STAT1 Gene for Osteoporosis in Both Chinese and Caucasians." J Bone Miner Res.

- Cho, Y. S., M. J. Go, et al. (2009). "A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits." Nat Genet 41(5): 527-34.
- Day, T. F., X. Guo, et al. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." Dev Cell 8(5): 739-50.
- De la Vega, F. M., K. D. Lazaruk, et al. (2005). "Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System." Mutat Res 573(1-2): 111-35.
- Deng, F. Y., L. J. Zhao, et al. (2010). "Genome-wide copy number variation association study suggested VPS13B gene for osteoporosis in Caucasians." Osteoporos Int 21(4): 579-87.
- Ducy, P., M. Starbuck, et al. (1999). "A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development." Genes Dev 13(8): 1025-36.
- Ducy, P., R. Zhang, et al. (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation." Cell 89(5): 747-54.
- Elefteriou, F. (2008). "Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system." Arch Biochem Biophys 473(2): 231-6.
- Fang, Y., J. B. van Meurs, et al. (2009). "Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis." Calcif Tissue Int 85(2): 85-93.
- Fang, Y., J. B. van Meurs, et al. (2005). "Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study." Am J Hum Genet 77(5): 807-23.
- Ferrari, S. (2008). "Human genetics of osteoporosis." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 22(5): 723-35.
- Frazer, K. A., D. G. Ballinger, et al. (2007). "A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs." Nature 449(7164): 851-61.
- Gabriel, S. B., S. F. Schaffner, et al. (2002). "The structure of haplotype blocks in the human genome." Science 296(5576): 2225-9.
- Geoffroy, V., M. Kneissel, et al. (2002). "High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage." Mol Cell Biol 22(17): 6222-33.
- Glass, D. A., 2nd and G. Karsenty (2007). "In vivo analysis of Wnt signaling in bone." Endocrinology 148(6): 2630-4.
- Glessner, J. T. and H. Hakonarson (2009). "Common variants in polygenic schizophrenia." Genome Biol 10(9): 236.
- Gong, Y., R. B. Slee, et al. (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell 107(4): 513-23.
- Gonzalez, E., H. Kulkarni, et al. (2005). "The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility." Science 307(5714): 1434-40.
- Guo, Y., L. S. Zhang, et al. (2009). "PTH and IL21R May Underlie Variation of Femoral Neck Bone Mineral Density as Revealed by a Genome-Wide Association Study." J Bone Miner Res.

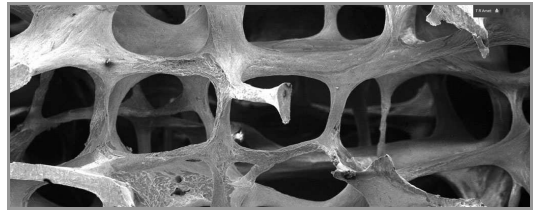
- The HapMap Consortium (2003). "The International HapMap Project." Nature 426(6968): 789-96.
- Harada, S. and G. A. Rodan (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." Nature 423(6937): 349-55.
- Hill, T. P., D. Spater, et al. (2005). "Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes." Dev Cell 8(5): 727-38.
- Holden, A. L. (2002). "The SNP consortium: summary of a private consortium effort to develop an applied map of the human genome." Biotechniques Suppl: 22-4, 26.
- Holmen, S. L., C. R. Zylstra, et al. (2005). "Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition." J Biol Chem 280(22): 21162-8.
- Hu, H., M. J. Hilton, et al. (2005). "Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development." Development 132(1): 49-60.
- Ioannidis, J. P., M. Y. Ng, et al. (2007). "Meta-analysis of genome-wide scans provides evidence for sex- and site-specific regulation of bone mass." J Bone Miner Res 22(2): 173-83.
- Ioannidis, J. P., S. H. Ralston, et al. (2004). "Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes." JAMA 292(17): 2105-14.
- Johnson, M. L., G. Gong, et al. (1997). "Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13)." Am J Hum Genet 60(6): 1326-32.
- Johnson, M. L., N. Lara, et al. (2009). "How genomics has informed our understanding of the pathogenesis of osteoporosis." Genome Med 1(9): 84.
- Jurado, S., X. Nogues, et al. (2010). "Polymorphisms and haplotypes across the osteoprotegerin gene associated with bone mineral density and osteoporotic fractures." Osteoporos Int 21(2): 287-96.
- Kagoshima, H., K. Shigesada, et al. (1993). "The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators." Trends Genet 9(10): 338-41.
- Karsenty, G. (1999). "The genetic transformation of bone biology." Genes Dev 13(23): 3037-51.
- Karsenty, G. (2008). "Transcriptional control of skeletogenesis." Annu Rev Genomics Hum Genet 9: 183-96.
- Kavvoura, F. K. and J. P. Ioannidis (2008). "Methods for meta-analysis in genetic association studies: a review of their potential and pitfalls." Hum Genet 123(1): 1-14.
- Kiel, D. P., S. Demissie, et al. (2007). "Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study." BMC Med Genet 8 Suppl 1: S14.
- Knight, J. C. (2005). "Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits." J Mol Med 83(2): 97-109.
- Koller, D. L., S. Ichikawa, et al. (2010). "Genome-wide association study of bone mineral density in premenopausal European-American women and replication in African-American women." J Clin Endocrinol Metab 95(4): 1802-9.
- Komori, T., H. Yagi, et al. (1997). "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." Cell 89(5): 755-64.
- Krishnan, V., H. U. Bryant, et al. (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." J Clin Invest 116(5): 1202-9.

- Kubota, T., T. Michigami, et al. (2009). "Wnt signaling in bone metabolism." J Bone Miner Metab 27(3): 265-71.
- Kung, A. W., S. M. Xiao, et al. (2010). "Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies." Am J Hum Genet 86(2): 229-39.
- Langdahl, B. L., A. G. Uitterlinden, et al. (2008). "Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study." Bone 42(5): 969-81.
- Li, W. F., S. X. Hou, et al. (2010). "Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation." Hum Genet 127(3): 249-85.
- Li, X., M. S. Ominsky, et al. (2009). "Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis." J Bone Miner Res 24(4): 578-88.
- Liu, F., S. Kohlmeier, et al. (2008). "Wnt signaling and skeletal development." Cell Signal 20(6): 999-1009.
- Liu, W., S. Toyosawa, et al. (2001). "Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures." J Cell Biol 155(1): 157-66.
- Liu, Y. J., H. Shen, et al. (2006). "Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update." J Bone Miner Res 21(10): 1511-35.
- Liu, Y. Z., Y. J. Liu, et al. (2003). "Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update." J Endocrinol 177(2): 147-96.
- Liu, Y. Z., Y. F. Pei, et al. (2009). "Powerful bivariate genome-wide association analyses suggest the SOX6 gene influencing both obesity and osteoporosis phenotypes in males." PLoS One 4(8): e6827.
- Maher, B.** (2008). "Personal genomes: The case of the missing heritability." Nature 456(7218): 18-21.
- Mak, Y. T., G. Hampson, et al. (2004). "Variations in genome-wide gene expression in identical twins - a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis." BMC Genet 5: 14.
- Manolio, T. A., L. D. Brooks, et al. (2008). "A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease." J Clin Invest 118(5): 1590-605.
- Manolio, T. A., F. S. Collins, et al. (2009). "Finding the missing heritability of complex diseases." Nature 461(7265): 747-53.
- Marie, P. (2001). "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste (Differentiation, function and regulation of osteoblast)." MS. Médecine Sciences 17(12): 1252-1259
- Marini, F. and M. L. Brandi (2009). "Pharmacogenetics of osteoporosis: future perspectives." Calcif Tissue Int 84(5): 337-47.
- Marx, J. (2004). "Coming to grips with bone loss." Science 305(5689): 1420-2.
- Matsuo, K. (2009). "Cross-talk among bone cells." Curr Opin Nephrol Hypertens 18(4): 292-7.
- McCarroll, S. A. and D. M. Altshuler (2007). "Copy-number variation and association studies of human disease." Nat Genet 39(7 Suppl): S37-42.

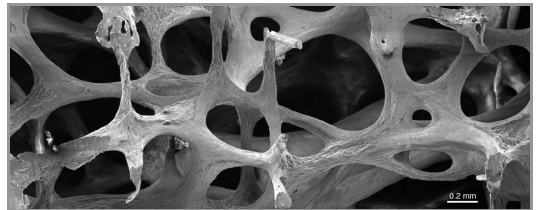
- McCarthy, M. I., G. R. Abecasis, et al. (2008). "Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges." Nat Rev Genet 9(5): 356-69.
- Montana, G. (2006). "Statistical methods in genetics." Brief Bioinform 7(3): 297-308.
- Moore, J. H. and S. M. Williams (2009). "Epistasis and its implications for personal genetics." Am J Hum Genet 85(3): 309-20.
- Morrison, N. A., R. Yeoman, et al. (1992). "Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin." Proc Natl Acad Sci U S A 89(15): 6665-9.
- Mundlos, S., L. F. Huang, et al. (1996). "Cleidocranial dysplasia in mice." Ann N Y Acad Sci 785: 301-2.
- Mundlos, S., F. Otto, et al. (1997). "Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia." Cell 89(5): 773-9.
- NIH** Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy (2001). "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy." JAMA 285(6): 785-95.
- Osteoporosis**, W. S. G. o. t. P. a. M. o. (2000). Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. WHO technical report series. Geneva, WHO.
- Otto, F., H. Kanegane, et al. (2002). "Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia." Hum Mutat 19(3): 209-16.
- Otto, F., A. P. Thornell, et al. (1997). "Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development." Cell 89(5): 765-71.
- Pagani**, F. and F. E. Baralle (2004). "Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers." Nat Rev Genet 5(5): 389-96.
- Patil, N., A. J. Berno, et al. (2001). "Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21." Science 294(5547): 1719-23.
- Peltonen, L. and V. A. McKusick (2001). "Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era." Science 291(5507): 1224-9.
- Plomin, R., C. M. Haworth, et al. (2009). "Common disorders are quantitative traits." Nat Rev Genet 10(12): 872-8.
- Ragoussis**, J. (2009). "Genotyping technologies for genetic research." Annu Rev Genomics Hum Genet 10: 117-33.
- Ralston, S. H., A. G. Uitterlinden, et al. (2006). "Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study." PLoS Med 3(4): e90.
- Redon, R., S. Ishikawa, et al. (2006). "Global variation in copy number in the human genome." Nature 444(7118): 444-54.
- Reich, D. E. and E. S. Lander (2001). "On the allelic spectrum of human disease." Trends Genet 17(9): 502-10.
- Richards, J. B., F. K. Kavvoura, et al. (2009). "Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture." Ann Intern Med 151(8): 528-37.

- Richards, J. B., F. Rivadeneira, et al. (2008). "Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study." Lancet 371(9623): 1505-12.
- Rivadeneira, F., U. Styrkarsdottir, et al. (2009). "Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies." Nat Genet 41(11): 1199-206.
- Rodda, S. J. and A. P. McMahon (2006). "Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors." Development 133(16): 3231-44.
- Sawcer, S. J., M. Maranian, et al. (2004). "Enhancing linkage analysis of complex disorders: an evaluation of high-density genotyping." Hum Mol Genet 13(17): 1943-9.
- Schork, N. J., S. S. Murray, et al. (2009). "Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases." Curr Opin Genet Dev 19(3): 212-9.
- Schroeder, T. M., E. D. Jensen, et al. (2005). "Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts." Birth Defects Res C Embryo Today 75(3): 213-25.
- Sebat, J., B. Lakshmi, et al. (2007). "Strong association of de novo copy number mutations with autism." Science 316(5823): 445-9.
- Shen, H., Y. Liu, et al. (2005). "Nonreplication in genetic studies of complex diseases-lessons learned from studies of osteoporosis and tentative remedies." J Bone Miner Res 20(3): 365-76.
- Sims, A. M., N. Shephard, et al. (2008). "Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes." J Bone Miner Res 23(4): 499-506.
- Stein, G. S., J. B. Lian, et al. (2004). "Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression." Oncogene 23(24): 4315-29.
- Stranger, B. E. and E. T. Dermitzakis (2005). "The genetics of regulatory variation in the human genome." Hum Genomics 2(2): 126-31.
- Stranger, B. E., M. S. Forrest, et al. (2007). "Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes." Science 315(5813): 848-53.
- Styrkarsdottir, U., B. V. Halldorsson, et al. (2008). "Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures." N Engl J Med 358(22): 2355-65.
- Takada, I., A. P. Kouzmenko, et al. (2009). "Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis." Nat Rev Rheumatol 5(8): 442-7.
- Takeda, S. (2008). "Central control of bone remodelling." J Neuroendocrinol 20(6): 802-7.
- Timpson, N. J., J. H. Tobias, et al. (2009). "Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood." Hum Mol Genet 18(8): 1510-7.
- Uitterlinden, A. G., S. H. Ralston, et al. (2006). "The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis." Ann Intern Med 145(4): 255-64.
- Van Meurs, J. B., T. A. Trikalinos, et al. (2008). "Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis." JAMA 299(11): 1277-90.

- Westendorf, J. J., R. A. Kahler, et al.** (2004). "Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases." Gene 341: 19-39.
- Wong, I. P., A. Zengin, et al.** (2008). "Central regulation of bone mass." Semin Cell Dev Biol 19(5): 452-8.
- Wong, K. K., R. J. deLeeuw, et al.** (2007). "A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome." Am J Hum Genet 80(1): 91-104.
- Xiong, D. H., X. G. Liu, et al.** (2009). "Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups." Am J Hum Genet 84(3): 388-98.
- Yadav, V. K., J. H. Ryu, et al.** (2008). "Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum." Cell 135(5): 825-37.
- Yang, T. L., X. D. Chen, et al.** (2008). "Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis." Am J Hum Genet 83(6): 663-74.
- Yoshida, T., H. Kanegane, et al.** (2002). "Functional analysis of RUNX2 mutations in Japanese patients with cleidocranial dysplasia demonstrates novel genotype-phenotype correlations." Am J Hum Genet 71(4): 724-38.
- Zaidi, M.** (2007). "Skeletal remodeling in health and disease." Nat Med 13(7): 791-801.
- Zeggini, E. and J. P. Ioannidis** (2009). "Meta-analysis in genome-wide association studies." Pharmacogenomics 10(2): 191-201.
- Zhang, H., K. Sol-Church, et al.** (2009). "High resolution linkage and linkage disequilibrium analyses of chromosome 1p36 SNPs identify new positional candidate genes for low bone mineral density." Osteoporos Int 20(2): 341-6.
- Zhang, J., L. Feuk, et al.** (2006). "Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome." Cytogenet Genome Res 115(3-4): 205-14.
- Zondervan, K. T. and L. R. Cardon** (2004). "The complex interplay among factors that influence allelic association." Nat Rev Genet 5(2): 89-100.



ANNEX



A continuació es recullen altres articles publicats conjuntament pel grup d'Osteoporosi del departament de Genètica de la Universitat de Barcelona i la unitat URFOA de l'Hospital del Mar de Barcelona; i que guarden relació amb aquesta tesi en tant que tracten aspectes genètics de l'osteoporosi.

Bustamante M, Nogués X, Agueda L, Jurado S, Wesselius A, Cáceres E, Carreras R, Ciria M, Mellibovsky L, Balcells S, Díez-Pérez A, Grinberg D. Promoter 2 -1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck bmd in Spanish postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2007 Oct;81(4):327-32.

Bustamante M, Nogués X, Mellibovsky L, Agueda L, Jurado S, Cáceres E, Blanch J, Carreras R, Díez-Pérez A, Grinberg D, Balcells S. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with bone mineral density and body mass index in Spanish postmenopausal women. *Eur J Endocrinol.* 2007 Nov;157(5):677-84.

Jurado S, Nogués X, Agueda L, Garcia-Giralt N, Urreizti R, Yoskovitz G, Pérez-Edo L, Saló G, Carreras R, Mellibovsky L, Balcells S, Grinberg D, Díez-Pérez A. Polymorphisms and haplotypes across the osteoprotegerin gene associated with bone mineral density and osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2010 Feb;21(2):287-96.

Jurado S, Garcia-Giralt N, Díez-Pérez A, Esbrit P, Yoskovitz G, Agueda L, Urreizti R, Pérez-Edo L, Saló G, Mellibovsky L, Balcells S, Grinberg D, Nogués X. Effect of IL-1beta, PGE(2), and TGF-beta1 on the expression of OPG and RANKL in normal and osteoporotic primary human osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2010 Mar 11, 110:304-310.