



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Aproximaciones genómicas y estudios funcionales de variantes genéticas asociadas con trastornos esqueléticos con baja y alta masa ósea

Juan David Patiño-Salazar

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.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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.

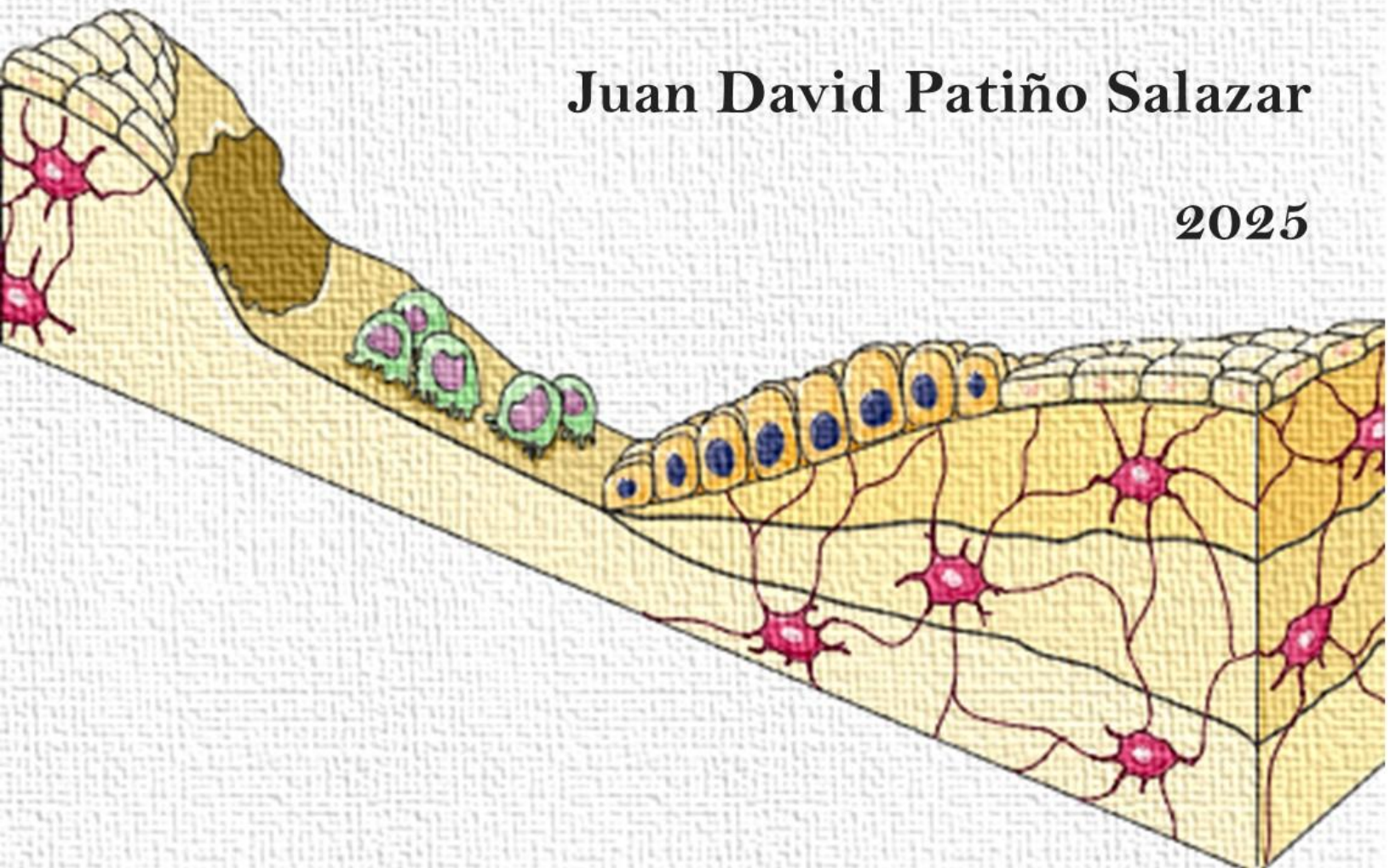
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

**Aproximaciones genómicas y estudios
funcionales de variantes genéticas
asociadas con trastornos esqueléticos con
baja y alta masa ósea**

Juan David Patiño Salazar

2025



Tesi Doctoral
Universitat de Barcelona

**Aproximaciones genómicas y estudios funcionales de variantes genéticas
asociadas con trastornos esqueléticos con baja y alta masa ósea**

**Aproximacions genòmiques i estudis funcionals de variants genètiques
associades amb trastorns esquelètics amb baixa i alta massa òssia**

Memòria presentada per

Juan David Patiño-Salazar

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Programa de Genètica

Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística

Tesi dirigida per la Dra. Raquel Rabionet (codirectora i tutora) i la Dra. Susanna
Balcells Comas (codirectora)

Dra. Raquel Rabionet

(Codirectora i tutora)

Dra. Susanna Balcells Comas

(Codirectora)

Juan David Patiño-Salazar

Barcelona, Septiembre de 2025



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, creador y Señor de la vida a quien debo todo lo que soy como ser humano y de quien he recibido siempre amor sin límites y misericordia infinita.

Agradezco también a mi familia, mi mayor tesoro, a mis padres Luis Alfonso y Teresita, a mi hermana Ana María y a mi sobrino Juan Martín, por ser mi soporte en todo momento, por apoyarme siempre para cumplir mis sueños y por acompañarme cada día dándome ánimos para llegar hasta el final de este camino. A mi cuñado César y a su familia por apoyarme y ayudarme.

A mis profesoras Kelly y Susanna, sin su comprensión y su paciencia no hubiese podido continuar y alcanzar la meta. Gracias por tantos conocimientos compartidos y por orientar con la mayor calidad académica y humana posible, mi proceso de formación. A los demás investigadores miembros de nuestro grupo, Natalia, Diana, el profe Dani, gracias por el apoyo y las sugerencias en cada reunión del Bone Team. A Noe, Marina, Roser Corominas, Bru, Gemma, Vasileios, gracias por estar presentes en este camino de aprendizaje y por acompañar mi formación.

A Mónica Cozar, nuestra mano derecha en el laboratorio, sin su ayuda técnica y humana no hubiese podido realizar con éxito los experimentos que nos planteamos para cada uno de los objetivos de esta tesis. Gracias por las charlas, los consejos y los desayunos compartidos. A Gemma, nuestra compañera de desayunos, también mi gratitud y mi reconocimiento.

A todos mis compañeros del lab, Estefanía, Aina, Mónica, Mario, Nerea, Edurne, Juan Diego, Maja, Helena, Ariadna, Eva; tantos momentos compartidos entre ensayos y journal clubs hicieron de este proceso un viaje maravilloso, lleno de personas increíbles. A mis estudiantes Sarai, María y Javi, así como a Bastian, mi eterna gratitud por permitirme ser parte de sus procesos de aprendizaje.

A Ester y Laura, gracias por acogerme y abrirme su corazón cuando recién llegué a conocer la Uni y la ciudad. A Núria y Nicola, y por supuesto al nuevo pequeño integrante de esa bella familia, muchas gracias por hacer posible este sueño. Núria,

gracias a tu acogida y cercanía pude empezar sin problema mi nueva vida en España, eres una persona “puente” y eso es maravilloso.

A Andrés, Daniel, Astrid gracias por los cafés compartidos y las terapias latinas. A Domingo y los demás técnicos que nos ayudan con el manejo de equipos y la disposición de las salas de cultivos, su trabajo es muy importante y muy valioso para la investigación que hacemos. Al profesor Mauricio Corredor, un maestro en todo el sentido de la palabra.

A mis chavales de Magis y a los acompañantes de grupos Magis de la Pastoral Jove del Casal Loyola, así como a mi querida comunidad Betânia (Lucia Ortín, Ricardo, Berta, Lucía Mendoza, Marta, Edu, Clara, Tesa, Carmen, Paco) gracias infinitas por acompañar mi proceso de fe y por ser un oasis espiritual en medio del día a día.

A la Compañía de Jesús en España, Enric, Fonfo, Alex, José Antonio, Alexis, Óscar, Pau y todos los demás miembros de las comunidades de Llúria y de Palau, gracias por su testimonio de entrega y seguimiento a Jesús. A mis compañeros de camino Alfonso, Oriol, Jorge, Fernando, Romu, muchas gracias por compartir conmigo la etapa final de mi doctorado.

A Herman Rodríguez, Provincial de los jesuitas en Colombia, gracias por tanta generosidad y bondad, aún en la distancia, siempre sentí su apoyo y cercanía.

A los Benedictinos de Montserrat, mi eterna gratitud por acogerme y abrirme las puertas para ser voluntario en Santa Cova. Cada fin de semana que estaba allí, recargaba fuerzas para continuar el camino. A los adoradores, gracias por ser un soporte enorme desde la oración.

Finalmente, gracias infinitas a mis amigos del alma, los de siempre, los de toda la vida, Johnathan, Meyer, Fredy, Marta, Eduardo, Andrés, Luza, Angélica, Josue, compartir este proceso con uds ha sido un regalo; su acompañamiento y apoyo me han sostenido en muchos momentos de este camino. A todos los que han estado conmigo en este camino y que no he alcanzado a mencionar, muchas gracias por el don de la vida compartida, Dios permita que también alcancen sus sueños y cumplan sus metas.

RESUMEN

Las displasias esqueléticas (DiE), son un grupo heterogéneo de enfermedades con una incidencia poco frecuente y diversas manifestaciones clínicas, que están asociadas a múltiples genes y que pueden presentar fenotipos de alta o baja masa ósea. El diagnóstico preciso de las DiE es difícil desde el punto de vista clínico y genético. Los avances de los últimos años en técnicas de secuenciación y procesamiento de datos así como los estudios GWAS, nos han dado luces sobre las bases genéticas que pueden estar regulando la fisiología ósea en contextos patológicos como el de las DiE. Sin embargo, la información obtenida mediante NGS o GWAS, debe ser validada funcionalmente. En esta tesis doctoral utilizamos aproximaciones genómicas mediante WES y panel de genes para analizar las bases genéticas que subyacen a trastornos esqueléticos con baja masa ósea como la osteoporosis posmenopáusica (OP), o casos de displasia esquelética familiar; y estudios funcionales *in silico* e *in vitro* para evaluar las implicaciones de variantes genéticas raras asociadas a trastornos esqueléticos con alta masa ósea y de otras patologías con fenotipo óseo como la enfermedad de Gaucher tipo 1 (EG1).

En cuanto a los análisis de trastornos esqueléticos con baja masa ósea, el estudio realizado mediante panel de genes en una selección truncada de casos de la cohorte BARCOS con valores de DMO extremos, nos permitió identificar variantes en 6 genes (*TCIRG1*, *COL1A2*, *SEC24D*, *LRP4*, *ANO5* y *LMNA*), una de ellas patogénica en heterocigosis en el gen *COL1A2* p.(Gly751Ser). Además, mediante análisis WES identificamos una variante missense p.(Arg296Pro) en el gen *PORCN* en un paciente de 29 años con una displasia esquelética sin diagnosticar, asociada con LBM y fracturas por fragilidad en su infancia y adolescencia. Análisis adicionales a partir de la DMO de este paciente y revisión posterior de literatura, nos llevaron a sugerir que la hipoplasia dérmica focal (FDH), causada principalmente por variantes genéticas en este gen, es probablemente una causa monogénica poco reconocida de LBM debida a una señalización defectuosa de la vía de Wnt.

Respecto de los trastornos esqueléticos con alta masa ósea, estudiamos funcionalmente las variantes en *SEM4AD*, *TBX18*, *PTCH1*, *PTK7*, y *ADGRE5*

identificadas previamente mediante WES, en un caso familiar de displasia ósea esclerosante caracterizado por lesiones óseas lucentes y HBM, logrando determinar que ninguna de las variantes afectó la estructura conformacional de la proteína ni comprometió la estabilidad proteica. Además, los estudios *in vitro* de la variante p.Arg349Gln en TBX18 nos permitieron observar que no afectaba su actividad transcripcional, y los ensayos de diferenciación de osteoblastos realizados para validar funcionalmente la variante p.Val212Met en SEMA4D no nos permitieron obtener resultados concluyentes.

Finalmente, la generación y caracterización de modelos celulares osteoblástico y osteoclástico para estudiar el fenotipo óseo de la EG1, nos permitió sugerir que quizá haya un defecto osteoclástico intrínseco en la EG1, lo cual podría implicar que los osteoclastos serían los principales impulsores de la patología ósea, junto con la alteración de la comunicación entre osteoblastos y osteoclastos.

Palabras clave: Variantes genéticas, displasias esqueléticas, alta masa ósea, baja masa ósea, Enfermedad de Gaucher.

RESUM

Les displàsies esquelètiques (DiE) són un grup heterogeni de malalties amb una incidència poc freqüent i diverses manifestacions clíniques, que estan associades a múltiples gens i que poden presentar fenotips d'alta o baixa massa òssia. El diagnòstic precís de les DiE és difícil des del punt de vista clínic i genètic. Els avenços dels darrers anys en tècniques de seqüenciació i processament de dades així com els estudis GWAS, ens han donat llums sobre les bases genètiques que poden estar regulant la fisiologia òssia en contextos patològics com el de les DiE. Tot i això, la informació obtinguda mitjançant NGS o GWAS, ha de ser validada funcionalment. En aquesta tesi doctoral utilitzem aproximacions genòmiques mitjançant WES i panell de gens per analitzar les bases genètiques subjacents a trastorns esquelètics amb baixa massa òssia com l'osteoporosi postmenopàusica (OP), o casos de displàsia esquelètica familiar; i estudis funcionals in silico i in vitro per avaluar les implicacions de variants genètiques rares associades a trastorns esquelètics amb alta massa òssia i d'altres patologies amb fenotip ossi com la malaltia de Gaucher tipus 1 (MG1).

Quant a les anàlisis de trastorns esquelètics amb baixa massa òssia, l'estudi realitzat mitjançant panell de gens en una selecció truncada de casos de la cohort BARCOS amb valors de DMO extrems, ens va permetre identificar variants en 6 gens (*TCIRG1*, *COL1A2*, *SEC24D*, *LRP4*, *ANO5* i *LMNA*), una d'elles patogènica en heterocigosi al gen *COL1A2* p.(Gly751Ser). A més, mitjançant anàlisi WES identifiquem una variant missense p.(Arg296Pro) al gen *PORCN* en un pacient de 29 anys amb una displàsia esquelètica sense diagnosticar, associada amb LBM i fractures per fragilitat en la seva infància i adolescència. Anàlisis addicionals a partir de la DMO d'aquest pacient i revisió posterior de literatura ens van portar a suggerir que la hipoplàsia dèrmica focal (FDH), causada principalment per variants genètiques en aquest gen, és probablement una causa monogènica poc reconeguda de LBM deguda a una senyalització defectuosa de la via de Wnt.

Respecte dels trastorns esquelètics amb alta massa òssia, estudiem funcionalment les variants en *SEM4AD*, *TBX18*, *PTCH1*, *PTK7*, i *ADGRE5* identificades

prèviament mitjançant WES, en un cas familiar de displàsia òssia esclerosant caracteritzat per lesions òssies lluent i HBM, aconseguint determinar que la de la va comprometre l'estabilitat proteica. A més, els estudis in vitro de la variant p.Arg349Gln a TBX18 ens van permetre observar que no afectava la seva activitat transcripcional, i els assajos de diferenciació d'osteoblasts realitzats per validar funcionalment la variant p.Val212Met a SEMA4D no ens van permetre obtenir resultats concloents.

Finalment, la generació i caracterització de models cel·lulars osteoblàstic i osteoclàstic per estudiar el fenotip ossi de l'EG1, ens va permetre suggerir que potser hi hagi un defecte osteoclàstic intrínsec a l'EG1, la qual cosa podria implicar que els osteoclasts serien els principals impulsors de la patologia òssia, juntament amb l'alteració de la comunicació entre osteoblasts i osteoclasts.

Paraules clau: Variants genètiques, displàsies esquelètiques, alta massa òssia, baixa massa òssia, Malaltia de Gaucher.

ABSTRACT

Skeletal dysplasias (SD) are a heterogeneous group of rare diseases with diverse clinical manifestations, which are associated with multiple genes and can present phenotypes of high or low bone mass. Accurate diagnosis of SD is difficult from both a clinical and genetic point of view. Advances in sequencing and data processing techniques in recent years, as well as GWAS studies, have shed light on the genetic basis that may be regulating bone physiology in pathological contexts such as SDs. However, information obtained through NGS or GWAS must be functionally validated. In this doctoral thesis, we use genomic approaches through WES and gene panels to analyse the genetic bases underlying skeletal disorders with low bone mass, such as postmenopausal osteoporosis (OP) or cases of familial skeletal dysplasia. and in silico and in vitro functional studies to evaluate the implications of rare genetic variants associated with skeletal disorders with high bone mass and other pathologies with bone phenotype such as Gaucher disease type 1 (GD1).

Regarding the analysis of skeletal disorders with low bone mass, the study conducted using a gene panel on a truncated selection of cases from the BARCOS cohort with extreme BMD values allowed us to identify variants in six genes (*TCIRG1*, *COL1A2*, *SEC24D*, *LRP4*, *ANO5*, and *LMNA*), one of which was pathogenic in heterozygosity in the *COL1A2* p.(Gly751Ser) gene. Furthermore, through WES analysis, we identified a missense variant p.(Arg296Pro) in the *PORCN* gene in a 29-year-old patient with undiagnosed skeletal dysplasia associated with LBM and fragility fractures in childhood and adolescence. Additional analysis based on this patient's BMD and subsequent review of the literature led us to suggest that focal dermal hypoplasia (FDH), caused mainly by genetic variants in this gene, is probably an under-recognised monogenic cause of LBM due to defective Wnt signalling.

With regard to skeletal disorders with high bone mass, we functionally studied the variants in *SEM4AD*, *TBX18*, *PTCH1*, *PTK7*, and *ADGRE5* previously identified by WES, in a familial case of sclerosing bone dysplasia characterised by lucent bone lesions and HBM, determining that none of the variants affected the conformational

structure of the protein or compromised protein stability. Furthermore, *in vitro* studies of the p.Arg349Gln variant in TBX18 allowed us to observe that it did not affect its transcriptional activity, and osteoblast differentiation assays performed to functionally validate the p.Val212Met variant in SEMA4D did not allow us to obtain conclusive results.

Finally, the generation and characterisation of osteoblastic and osteoclastic cell models to study the bone phenotype of GD1 allowed us to suggest that there may be an intrinsic osteoclastic defect in GD1, which could imply that osteoclasts are the main drivers of bone pathology, together with impaired communication between osteoblasts and osteoclasts.

Keywords: Genetic variants, skeletal dysplasias, high bone mass, low bone mass, Gaucher disease.

TABLA DE CONTENIDOS

Abreviaturas

Introducción	1
1. El tejido óseo	3
1.1 Generalidades del sistema esquelético	3
1.2 Estructura ósea y tipos de hueso	3
1.2.1 Componentes del hueso	6
1.2.2 Matriz extracelular (MEC)	6
1.2.3 Tipos de células óseas	7
1.2.3.1 La formación ósea: los osteoblastos y los biomarcadores osteoblásticos	7
1.2.3.2 La resorción ósea: los osteoclastos y los marcadores osteoclásticos	13
1.3 Desarrollo óseo	17
1.4 Remodelado óseo	18
1.5 Mecanotransducción ósea	22
2. Trastornos esqueléticos y su base genética	22
2.1 La densidad mineral ósea (DMO)	24
2.2 Heredabilidad de la DMO	26
2.3 La Osteoporosis: Definición y epidemiología	27
2.3.1 Heredabilidad de los rasgos de la osteoporosis	32
2.3.2 Manejo y perspectivas terapéuticas	33
2.3.2.1 La cohorte BARCOS y la trayectoria de nuestro grupo en la investigación de la osteoporosis	34
2.4 Osteogénesis imperfecta	35
2.5 Hipoplasia dérmica focal	37
2.6 Alteraciones con alta masa ósea	40
2.7 Otras patologías que tienen afectaciones óseas: La enfermedad de Gaucher	43
2.7.1 Definición y clasificación de la enfermedad de Gaucher	43
2.7.2 El gen GBA1 y la enzima glucocerebrosidasa o proteína GBA1	46

2.7.3	Manifestaciones óseas en la enfermedad de Gaucher	49
3.	Identificación de genes relacionados con patologías óseas	51
3.1	Estudios de secuenciación dirigida	52
3.1.1	Secuenciación completa del exoma (WES)	52
3.1.2	Estudios mediante panel de genes	54
3.2	Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)	56
4.	Estudios funcionales	59
4.1	Aproximaciones <i>in silico</i>	60
4.2	Aproximaciones <i>in vitro</i>	61
4.2.1	Genes reporteros: ensayo de luciferasa	62
4.2.2	Cultivos celulares tratados con medio condicionado	63
	Hipótesis y objetivos	67
	Reporte de las supervisoras de la tesis sobre la contribución del candidato a doctor a los artículos incluidos en esta tesis doctoral	72
	Resultados	77
	CAPÍTULO 1: Aproximaciones genómicas para el estudio de variantes genéticas raras relacionadas con trastornos esqueléticos con baja masa ósea	79
	Artículo 1: Identifying rare variants in genes related to bone phenotypes in a cohort of postmenopausal women	79
	Artículo 2: Focal dermal hypoplasia: a probable underrecognized low bone mass disorder secondary to aberrant Wnt signaling	100
	CAPÍTULO 2: Validaciones funcionales de variantes genéticas raras asociadas con un trastorno esquelético con alta masa ósea	124
	Artículo 3: Functional assessment of rare genetic variants found in a family with skeletal dysplasia and high bone mass	124

CAPÍTULO 3: Generación y caracterización de modelos celulares para el estudio del fenotipo óseo de la enfermedad de gaucher tipo 1 149

Artículo 4: Generation and characterization of bone cell lines with *Gba1* mutations as cell-intrinsic models of Gaucher's bone disease 149

Discusión 180

1. Entender la heterogeneidad de las enfermedades esqueléticas monogénicas y poligénicas: de la investigación básica a la práctica clínica 182

2. Variantes genéticas estudiadas en el contexto de los trastornos esqueléticos 196

3. Otros modelos celulares y animales para entender la EG y su fenotipo óseo 206

4. Valoración global de los estudios realizados en esta tesis y perspectivas futuras 212

Conclusiones 216

Referencias 220

Anexos 254

ABREVIATURAS

AD: Autosómica dominante

ADGRE5: Adhesion G protein-coupled receptor E5

ALP: Alkaline phosphatase

ANKH: ANKH inorganic pyrophosphate transport regulator

ANO5: Anoctamin 5

AP-1: Activator protein 1

AR: Autosómica recesiva

ATF4: Activating transcription factor 4

ATP: Adenosine triphosphate

BAP: Bone-specific alkaline phosphatase

BMM: Bone marrow-derived macrophages

BMP: Bone morphogenetic protein

BMP1: Bone morphogenetic protein 1

BMUs: Basic multicellular units

BPs: Bisphosphonates

BRC: Bone remodelling compartment

BSPII: Bone sialoprotein II

C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein β

C/EBP δ : CCAAT/enhancer-binding proteins δ

C3: Complement Component C

C3aR: C3a anaphylatoxin chemotactic receptor

CA2: Carbonic anhydrase 2

CADD: Combined Annotation Dependent Depletion

Ca_i²⁺: Calcio intracelular

Cbfa1: Core-binding factor subunit alpha-1

CCDC134: Coiled-coil domain containing 134

CCL3: C-C motif chemokine ligand 3

CCL5: C-C motif chemokine ligand 5

CCL7: C-C motif chemokine ligand 7

CCND1: Cyclin D1

cFos: Nuclear phosphoprotein

CLCN7: Chloride voltage-gated channel 7

CLK2: CDC like kinase 2

CM: Conditioned medium

CNV: Copy number variations

COL1A1: Collagen type I alpha 1 chain

COL2A1: Collagen type II alpha 1 chain

COX: Cytochrome c oxidase

CREB3L1: cAMP responsive element binding protein 3 like 1

CRTAP: Cartilage-associated protein

CSF-1R: Colony stimulating factor 1 receptor

CTHRC1: Collagen Triple Helix Repeat Containing 1

CTSK: Cathepsin K

CTX: Telopéptido C-terminal

CXCL1: C-X-C motif chemokine ligand 1

CXCL12: C-X-C motif chemokine ligand 12

CYP27B1: Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1

DC-STAMP: Dendritic cell-specific transmembrane protein

DE: Desviaciones estándar

DiE: Displasias esqueléticas

DKK: Dickkopf

DMO: Densidad mineral ósea

DMP-1: Dentin matrix protein 1

DPD: Deoxipiridinolina

DXA: Dual-energy x-ray absorptiometry

DZ: Dizygotic twins

EFNB2: Ephrin B2

EGF-TM7: EGF-seven-span transmembrane

EN1: Engrailed homeobox 1

ENTREP3: Endosomal transmembrane epsin interactor 3

EPHB4: Ephrin B4

ERBB2: Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

ERT: Estrogen replacement therapy

ESR1: Estrogen receptor 1

Exac: Exome Aggregation Consortium

FACIT: Fibril-associated collagens with interrupted triple helices

FAM20C: FAM20C golgi associated secretory pathway kinase

FASL: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6

FDH: Focal dermal hipoplasia

FKBP10: FKBP prolyl isomerase 10

FN: Femoral neck

FOXA2: Forkhead box A2

FOXC2: Forkhead box C2

FOX E1: Forkhead box E1

FRAX: Fracture risk assessment tool

FZD: Frizzled receptor

GBA1: Glucosylceramidase beta 1

GD1: Gaucher disease type 1

GEFOS: GEnetic Factors for Osteoporosis

GENOMOS: Genetic Markers for Osteoporosis

GFP: Green fluorescent protein

gnomAD: Genome Aggregation database

GoF: Gain-of-function

GPCR: G protein-coupled receptors

GWAS: Genome wide association studies

HBM: High bone mass

HGVS: Human Genome Variation Society

HR-pQCT: High-resolution peripheral quantitative computed tomography

IFITM5: Interferon induced transmembrane protein 5

IFMRS: International Federation of Musculoskeletal Societies

IGF-1: Insulin-like growth factor 1

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

IMI: Impact microindentation

iPSC: Induced pluripotent stem cells

IS: Idiopathic scoliosis

KDEL2: KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2

KIF5B: Kinesin family member 5B

KRM: Kremen receptor

LBM: Low Bone Mass

LGR: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors

LGR4: Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4

LMNA: Lamin A/C

LoF: Loss-of-function

LRP4/5: Low-density lipoprotein receptor related protein 4/5

LS: Lumbar spine

LSD: Lysosomal storage disease

MAF: Minor allele frequency

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MBTPS2: Membrane bound transcription factor peptidase, site 2

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

M-CSF: Macrophage colony stimulating factor

MEC: Matriz extracellular

MELAS: Mitochondrial encephalopathy lactic acidosis and stroke like episodes

MEPE: Matrix extracellular phosphoglycoprotein

MESD: Mesoderm development LRP chaperone

MIOP: Malignant infantile osteopetrosis

MITF: Microphthalmia-associated transcription factor

MMP-9: Matrix metalloproteinase-9

MSC: Mesenchymal stem cell

MSC: Mesenchymal stromal cells

MT1-MMP: Membrane type 1-matrix metalloprotease

MZ: Monozygotic twins

NFATc1: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1

NGS: Next generation sequencing

NO: Nitric oxide synthase

NTX: Telopéptido N-terminal

OCN: Osteocalcin

OI: Osteogenesis imperfecta

OP: Osteoporosis

OPG: Osteoprotegerin

OPN: Osteopontin

OPPG: Osteoporosis-pseudoglioma syndrome

OPTA2: Autosomal dominant osteopetrosis-2

P1CP: Procollagen type 1 C-terminal propeptide

P1NP: Procollagen type 1 N-terminal propeptide

P3H1: Prolyl 3-hydroxylase 1

PC-1: Polycystin-1

PDGFR: Platelet derived growth factor receptor

PGE₂: Genes encoding receptors for Prostaglandin E2

PGI₂: Prostacyclin

PHEX: Phosphate regulating endopeptidase X-linked

PHLDB1: Pleckstrin homology-like domain family B member 1

Pi: Inorganic phosphate

PLOD2: Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2

PLS3: Plastin 3

PORCN: Protein-serine O-palmitoleoyltransferase porcupine

PPi: Inorganic pyrophosphate

PIIB: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B

PTCH1: Patched 1

PTH: Parathyroid hormone

PTH1R: Parathyroid hormone receptor 1

PTHrP: Parathyroid hormone-related protein

PTK7: Protein tyrosine kinase 7

PU.1: Transcription factor PU.1

PYD: Piridinolina

QCT: Quantitative computed tomography

QUS: Quantitative ultrasound

RAC1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RANK: Receptor activator for nuclear factor κ B

RANKL: Receptor activator for nuclear factor κ B ligand

REMS: Radiofrequency Echographic Multi Spectrometry

RM: Resonancia magnética

ROR1/2: Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 or 2

RUNX2: Runt related transcription factor 2

S1P: Sphingosine 1-phosphate

SDF-1: Stromal-derived factor-1

SEC24D: SEC24 homolog D, COPII coat complex component

SEMA3A: Semaphorin 3A

SEMA4D: Semaphorin 4D

SERMs: Selective estrogen receptor modulators

SERPINF1: Serpin family F member 1

SERPINH1: Serpin family H member 1

SFRP4: Secreted frizzled related protein 4

SGMS2: Sphingomyelin synthase 2

SIRT1: sirtuin 1

SMAD9: SMAD family member 9

SNP: Single nucleotide polymorphism

SNV: Single nucleotide variant

SNX10: Sorting nexin 10

SOST: Sclerostin

SP7: Sp7 transcription factor, Osterix

SPARC: Secreted protein acidic and cysteine rich

TAPT1: Transmembrane anterior posterior transformation protein 1 homolog

TBX18: T-box transcription factor 18

TBXAS1: Thromboxane A synthase 1

TCIRG1: T cell immune regulator 1, ATPase H⁺ transporting V0 subunit a3

TENT5A: terminal nucleotidyltransferase 5^a

TGFβ: Transforming Growth Factor β

TMEM38B: Transmembrane protein 38B

TNFRSF11A (gene synonym of RANK): TNF receptor superfamily member 11a

TNFRSF11B (gene synonym of OPG): TNF receptor superfamily member 11b

TNF-α: Tumor necrosis factor α

TRACP5b: Tartrate resistant acid phosphatase 5b

TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase

TS: Targeted sequencing

V-ATPasa: Vacuolar-type H⁺-ATPase

VDR: Vitamin D receptor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR2: Vascular endothelial growth factor receptor 2

VUS: Variants of uncertain significance

WES: Whole exome sequencing

WGS: Whole genome sequencing

WNT: Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site

XLH: X-linked hypophosphataemia

XLR: X-linked recessive

YSM: Years since menopause

ZBTB40: Zinc finger and BTB domain containing 40

Nota aclaratoria: Dada la importancia de algunos biomarcadores en el contexto de esta tesis doctoral, utilizaremos la abreviatura y el nombre completo de algunos de ellos en algunas ocasiones.

INTRODUCCIÓN

1. EL TEJIDO ÓSEO

1.1 Generalidades del sistema esquelético

El esqueleto adulto humano consta de un total de 213 huesos distribuidos en tres grandes estructuras: el esqueleto apendicular que incluye las extremidades superiores e inferiores, y las cinturas escapular (hombros) y pélvica; el esqueleto axial que constituye el eje central del cuerpo y está compuesto por los huesos del cráneo, la columna vertebral y la caja torácica (costillas y esternón); y los osículos auditivos integrados por el martillo, el yunque y el estribo que se encuentran en el oído medio y participan en la función auditiva (1). El hueso, uno de los principales componentes del esqueleto adulto humano, es un tejido conjuntivo mineralizado, dinámico, altamente especializado, rígido y con una gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión.

Los huesos cumplen diversas funciones: proporcionan soporte estructural para el resto del cuerpo, permiten el movimiento y la locomoción al proporcionar palancas para los músculos, protegen los órganos y estructuras internas vitales, proporcionan mantenimiento de la homeostasis mineral y del equilibrio ácido-base, sirven como depósito de factores de crecimiento y citoquinas, y proporcionan el entorno para la hematopoyesis dentro de los espacios de la médula ósea (2,3).

1.2 Estructura ósea y tipos de hueso

A nivel estructural, el hueso se forma normalmente en un patrón laminar, en el que las fibrillas de colágeno se disponen en orientaciones alternas, confiriéndole resistencia y dureza.

En cuanto a la forma y el tamaño, los huesos suelen agruparse en cuatro categorías. En la primera categoría se encuentran los huesos largos que se caracterizan por tener una longitud mayor que su grosor y su anchura. Se componen de un eje hueco, o diáfisis; metáfisis acampanadas ensanchadas, en forma de cono; y epífisis redondeadas por encima de los cartílagos de crecimiento (Figura 1).

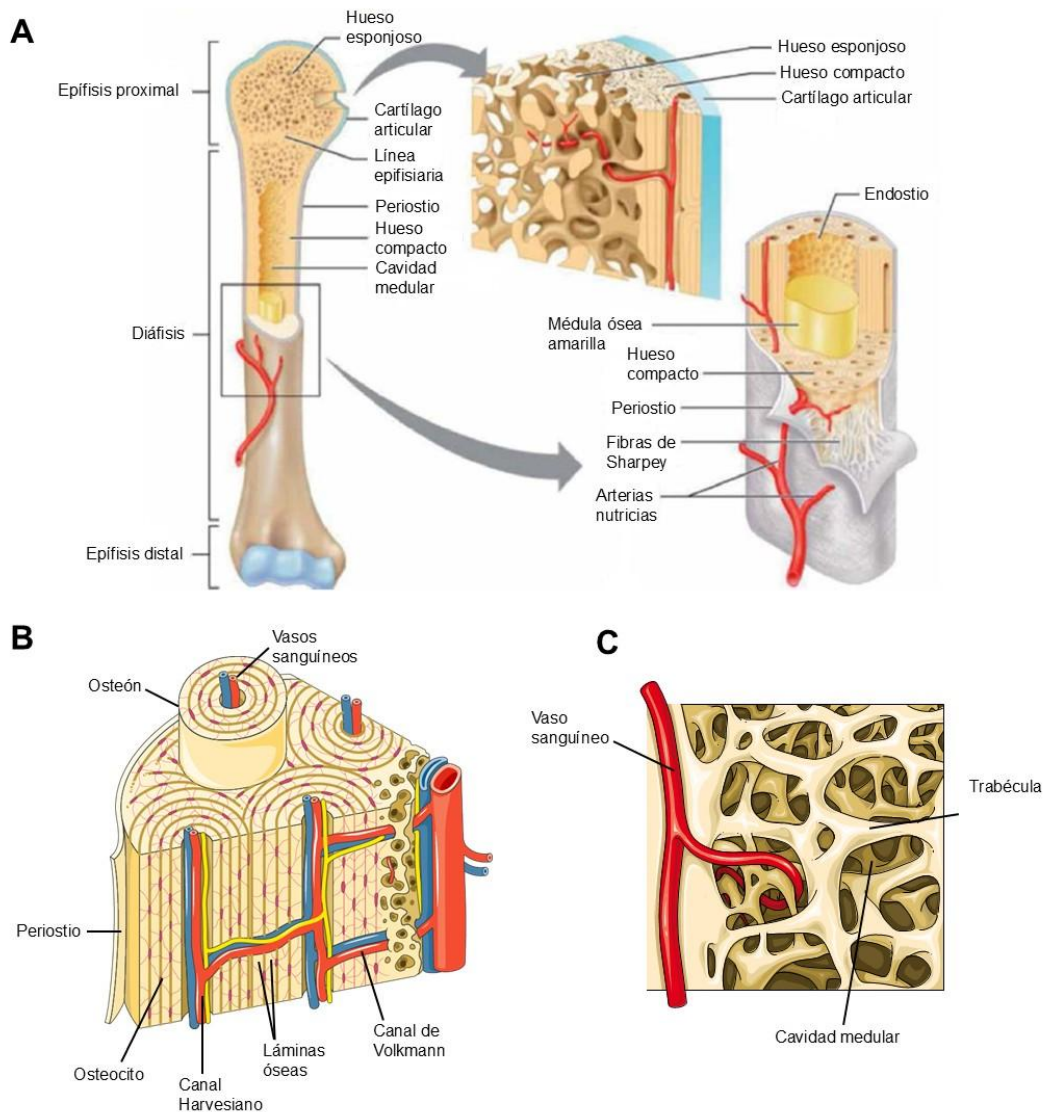


Figura 1. Representación esquemática de la histología de huesos largos. A. Estructura e histología de huesos largos. Tomada y adaptada de (4). B. Esquema tridimensional de hueso cortical de la diáfisis de un hueso largo. C. Esquema tridimensional de hueso trabecular de la epífisis de un hueso largo. Imágenes creadas con Servier Medical Art.

La epífisis y la diáfisis se unen a través de la metáfisis, que contiene el cartílago de crecimiento y una capa de cartílago hialino en un hueso en crecimiento o una línea epifisaria de tejido óseo en la edad adulta temprana (5). Estos huesos se forman mediante una combinación de tejido óseo endocondral y membranoso. Dentro de ellos encontramos clavículas, húmeros, radios, cúbitos, metacarpianos, fémures,

tibias, peronés, metatarsianos y falanges (Figura 1A). La segunda categoría está conformada por los huesos cortos que presentan un tamaño similar en sus tres dimensiones (grosor, anchura y longitud) y que incluyen los huesos carpianos y tarsianos, las rótulas y los huesos sesamoideos. En la tercera categoría están los huesos planos formados por membranas óseas. Presentan una forma fina y ancha, protegen órganos internos como el cerebro e incluyen los huesos del cráneo, la mandíbula, las escápulas, el esternón y las costillas. Finalmente, a la cuarta categoría pertenecen los huesos irregulares los cuales, como su nombre lo indica, poseen una forma irregular. Estos incluyen huesos como las vértebras, el sacro, el coxis y el hueso hioides (2,6).

De acuerdo con la histología, el tejido óseo puede clasificarse en hueso cortical o compacto y trabecular o esponjoso (Figuras 1B y 1C). El hueso cortical es denso, duro, con baja porosidad y está calcificado en su mayor parte. Tiene una baja tasa de recambio y es responsable de la actividad mecánica. Está formado por capas concéntricas de laminillas óseas (osteones) con forma cilíndrica, que se nutren de los conductos de Havers y de Volkmann que contienen los vasos sanguíneos. Se localiza principalmente en la diáfisis de los huesos largos y en la parte externa de todos los huesos (Figura 1B). El hueso trabecular tiene una matriz ósea porosa y una alta tasa de recambio. También está formado por osteones llamados paquetes que tienen forma semilunar y también están compuestos por láminas concéntricas. Es responsable de las funciones metabólicas y alberga matriz ósea roja. Principalmente constituye la epífisis de los huesos largos y el interior de los huesos planos (Figura 1C). El hueso cortical tiene una superficie externa perióstica y una superficie interna endoóstica. La actividad de la superficie perióstica es importante para el crecimiento aposicional (aumento de grosor) y la reparación de fracturas. La formación ósea suele superar la reabsorción ósea en la superficie perióstica, por lo que normalmente los huesos aumentan de diámetro con el envejecimiento. La superficie endosteal tiene mayor actividad de remodelación que la superficie perióstica, probablemente como resultado de una mayor tensión biomecánica o una

mayor exposición a citoquinas del compartimento de médula ósea adyacente. La reabsorción ósea suele superar a la formación ósea en la superficie endosteal, por lo que el espacio medular normalmente se expande con el envejecimiento. El tejido óseo adulto está compuesto por un 80% de hueso cortical y un 20% de hueso trabecular, aunque esta proporción puede variar en función de la localización dentro del cuerpo (2,7).

1.3 Componentes del hueso

El tejido óseo está formado por células derivadas del mesénquima y una matriz extracelular (MEC) producida por estas células. La matriz extracelular comprende aproximadamente el 90% del volumen óseo, mientras que las células y los vasos sanguíneos el 10% restante.

1.3.1 Matriz extracelular (MEC)

El hueso está compuesto por sales inorgánicas y matriz orgánica. La matriz orgánica se compone de proteínas colágenas (85%-90%), principalmente de colágeno de tipo I, con trazas de colágenos de tipo III y V y FACIT (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*) en ciertas fases de la formación ósea que pueden ayudar a determinar el diámetro de las fibrillas de colágeno. Los colágenos FACIT son miembros de la familia de colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas, un grupo de colágenos no fibrilares que sirven como puentes moleculares importantes para la organización y estabilidad de las matrices extracelulares. Los miembros de esta familia incluyen los colágenos IX, XII, XIV, XIX, XX y XXI. Además, la matriz orgánica también está compuesta por proteínas no colágenas (10%-15%) como fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN), osteonectina, osteopontina (OPN), fibronectina y sialoproteína ósea II (BSPII), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y factores de crecimiento como el TGF β .

La fracción inorgánica o mineral representa la mayor parte de la MEC, y está formada principalmente por iones de fosfato y calcio; sin embargo, también están presentes cantidades significativas de bicarbonato, sodio, potasio, citrato,

magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio. Los iones de calcio y fosfato se nuclean para formar los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Junto con el colágeno, las proteínas de la matriz no colágena forman un andamiaje para la deposición de hidroxiapatita y dicha asociación es responsable de la rigidez y resistencia típicas del tejido óseo.

La matriz ósea no sólo proporciona un soporte mecánico para las células óseas, sino que también desempeña un papel clave en la regulación del comportamiento celular que mantiene la homeostasis de la remodelación ósea y la capacidad de cicatrización de heridas. De hecho, se ha sugerido que otros factores, incluidos los cambios en las proteínas de la matriz ósea y sus modificaciones, son de crucial importancia para la comprensión y predicción de las fracturas óseas (2,8,9).

1.3.2 Tipos de células óseas

La población de células óseas consta de dos linajes distintos: el linaje osteogénico (que incluye células estromales, preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento óseo) y el linaje osteoclástico representado por los osteoclastos y osteomorfos (un destino celular alternativo para los osteoclastos maduros, en el que se dividen en células hijas llamadas osteomorfos (10)). El mantenimiento de la estructura ósea normal depende de la interacción intercelular que se produce entre estas células óseas. Para efectos del alcance de esta tesis nos centraremos en los osteoblastos dentro del linaje osteogénico y en los osteoclastos dentro del linaje osteoclástico.

1.3.2.1 La formación ósea: los osteoblastos y los biomarcadores osteoblásticos

Los osteoblastos son derivados de células madre mesenquimales (MSC) y especializados en producir y depositar la matriz ósea colágena, regulando la mineralización de dicha matriz mediante la producción de proteínas no colágenas adicionales. Son células cuboidales que se localizan a lo largo de la superficie ósea;

representan entre el 4% y el 6% del total de células del hueso y son ampliamente conocidos por su papel fundamental en la formación ósea (11,12).

La médula ósea contiene una pequeña población de MSC capaces de dar lugar a hueso, cartílago, grasa o tejido conectivo fibroso, distintas de la población de células madre hematopoyéticas que da lugar a los linajes de células sanguíneas. La diferenciación de las MSC al linaje osteoblástico requiere la activación de la vía canónica Wnt/ β -catenina, la cual es fundamental para una correcta consecución de masa ósea. La vía de señalización Wnt (*wingless-type mouse mammary tumor virus integration site*) es, por tanto, una de las vías clave implicadas en la diferenciación y maduración de los osteoblastos. Las proteínas Wnt son una familia de al menos 19 glicoproteínas secretadas que intervienen en muchas funciones celulares, las cuales se unen a receptores de la familia *frizzled* (FZD) que son receptores de proteína G transmembrana que señalizan a través de proteínas *dishevelled* o a través de proteínas G heterotriméricas. Además, hay un conjunto de correceptores que también intervienen en la vía, dentro de los cuales están LRP4, 5 y 6, de la familia LRP; ROR1/2 que pertenecen a la familia Ror de receptores tirosina-quinasa; KRM1/2 de la familia de receptores Kremen que muestran alta afinidad por DKK1 y DKK2; y los receptores LGR 4, 5 y 6 que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (2,12,13).

La vía canónica de Wnt comienza con la formación de un complejo heterotrimérico formado por un receptor FZD, un ligando Wnt y un correceptor LRP. Esta unión da lugar a la estabilización y translocación de β -catenina al núcleo, donde activa la transcripción de genes diana, fundamentales para la diferenciación osteoblástica y la formación del hueso, tales como *RUNX2*. Cuando la vía no está activa, un complejo proteico fosforila y secuestra la β -catenina en el citoplasma para su posterior degradación en el proteasoma (Figura 2) (13,14).

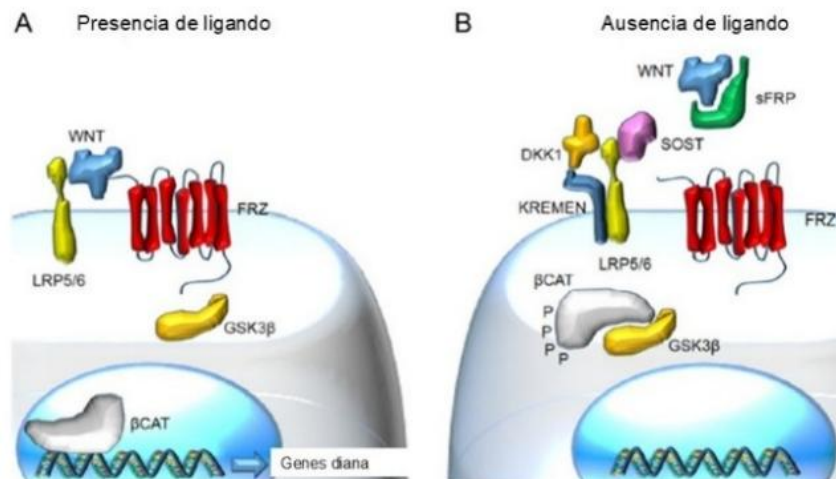


Figura 2. Esquema de la vía de Wnt en osteoblastos. A. Activación de la vía canónica Wnt/β catenina por la unión de Wnt al receptor FRZ y correceptores LRP5/6. B. La activación de la vía Wnt se inhibe mediante diferentes moléculas que actúan sobre los correceptores LRP5/6 (DKK1 y SOST) o sobre el ligando (WNT). Tomada y adaptada de (12).

La diferenciación de los osteoblastos es un proceso que se da en varias etapas en las cuales estas células desempeñan tres funciones principales que determinan la estructura del esqueleto: (A) producción de matriz ósea (osteoide), (B) regulación de la mineralización del osteoide mediante la producción de proteínas no colágenas, y (C) apoyo en la formación de osteoclastos (Figura 3). Además, las células del linaje osteoblástico producen factores paracrinos, como las citocinas de la familia IL-6, la PTHrP y moléculas dependientes del contacto, como EphrinB2, que regulan su propia diferenciación y actividad.

El proceso de diferenciación osteoblástico está controlado por la expresión de una serie de factores de transcripción. Los factores RUNX2 y Osterix (SP7) son absolutamente esenciales para la diferenciación a pre-osteoblastos. Otros factores de transcripción como el ATF4, la proteína activadora 1 (AP-1) y las proteínas C/EBPβ y C/EBPδ promueven la transición a osteoblastos productores de matriz. RUNX2, también conocido como Cbfa1, es el marcador más temprano de la osteogénesis y desempeña un papel crucial en la diferenciación de los osteoblastos. De hecho, los ratones KO para *Runx2* carecen de osteoblastos y presentan una

ausencia casi total de tejido óseo mineralizado. Además, RUNX2 regula Osterix y puede regular al alza otros genes relacionados con los osteoblastos, como *COL1A1* (*collagen type I alpha 1 chain*), *ALP*, *BSP* y *OCN* (11,15–18).

De los pre-osteoblastos se da paso a la formación de osteoblastos maduros formadores de matriz, con su morfología cuboidal característica y localizados en grupos con un amplio contacto célula-célula. Los osteoblastos maduros presentan además abundante retículo endoplásmico, en consonancia con su función principal como fábricas de producción de colágeno de tipo I, principal componente de la matriz osteoide. Asimismo, expresan una serie de proteínas no colágenas, entre las que se encuentran proteínas como ALP, OCN, OPN y osteonectina, implicadas en la regulación de la incorporación de mineral a la matriz osteoide, y receptores como IL-6 y PTH1R (este último, receptor de la PTH y de la PTHrP) (Figura 3) (11,19).

En el proceso de producción y mineralización de la matriz ósea, los osteoblastos maduros de la superficie ósea depositan matriz recién formada, conocida como osteoide, compuesta en gran parte por colágeno de tipo I dispuesto en una triple hélice. Tras la deposición de colágeno, la matriz se mineraliza progresivamente gracias a la acumulación de cristales de hidroxapatita (bioapatita). Este proceso de mineralización tiene dos fases. En los primeros 5 a 10 días, el osteoide experimenta una rápida mineralización primaria; después, a lo largo de semanas, meses e incluso años, se produce la mineralización secundaria, durante la cual los cristales de bioapatita crecen y acumulan carbonato en las regiones más maduras del hueso, y se compactan las fibras de colágeno, probablemente por el impedimento estérico causado por la presencia de los cristales en crecimiento.

La mineralización es un proceso bien controlado y regulado por osteoblastos y osteocitos. Los osteocitos, derivados de osteoblastos terminalmente diferenciados, permanecen incrustados en un pequeño espacio de matriz ósea mineralizada. A través de sus extensos procesos dendríticos y su red de canales de comunicación llena de fluidos, perciben y responden a la tensión mecánica y a los microdaños que sufre el hueso. Ambos tipos de células expresan proteínas como OCN, MEPE, PC-1 y DMP-1 que inhiben la mineralización. Además, los osteoblastos regulan la

mineralización controlando los niveles de fosfato inorgánico a través de la enzima ALP. La nucleación de la hidroxiapatita depende de la relación entre el fosfato inorgánico (Pi), que favorece la mineralización, y el pirofosfato inorgánico (PPi), que la inhibe. La ALP regula positivamente este equilibrio hidrolizando el PPi para formar el Pi necesario para la nucleación de cristales de hidroxiapatita. Por ello, la insuficiencia de ALP conduce a una mineralización deficiente, como ocurre en la hipofosfatasa (11,20).

Una vez finalizada la síntesis de matriz osteoide, los osteoblastos maduros tienen tres posibles destinos: a) permanecer en la superficie del hueso como células de revestimiento óseo (*bone lining cells*) metabólicamente menos activas; b) sufrir apoptosis; c) quedar atrapados en la matriz y, a medida que el osteoide se mineraliza, diferenciarse en osteocitos (Figura 3).

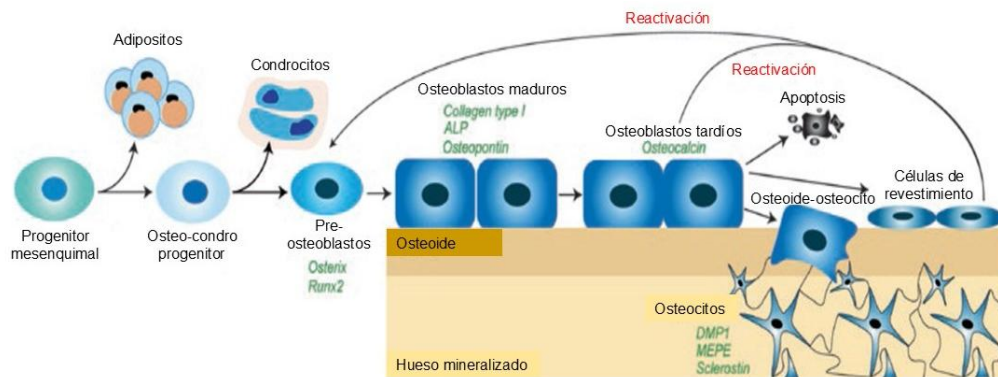


Figura 3. Etapas del linaje osteoblástico. El linaje osteoblástico surge de progenitores mesenquimales pluripotentes, capaces de diferenciarse en adipocitos, en condrocitos o en osteoblastos. El compromiso con el linaje de los osteoblastos viene determinado por la expresión de factores de transcripción como RUNX2 y osterix. Una vez que los osteoblastos maduran, depositan una matriz rica en colágeno de tipo I (osteoide) como plantilla para la deposición mineral de bioapatita y expresan fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina y osteocalcina (OCN), proteínas que regulan la mineralización ósea. A continuación, los osteoblastos sufren uno de los tres destinos siguientes: (1) apoptosis, (2) permanecen en la superficie ósea como células de revestimiento óseo, o (3) se incrustan en su matriz ósea colagenosa como «osteocitos-osteoides», que luego se convierten en osteocitos terminalmente diferenciados. Los osteocitos también regulan la mineralización de la matriz ósea mediante la expresión de DMP-1, MEPE y esclerostina. Las células de revestimiento

óseo parecen ser capaces de reactivarse para convertirse en osteoblastos activos o precursores de osteoblastos. Tomada y adaptada de (11)

Las células del linaje osteoblástico también controlan la diferenciación de los osteoclastos, que son las células responsables de la resorción ósea, de tres formas principales:

- a) Produciendo RANKL (*receptor activator for nuclear factor κ B ligand*) y osteoprotegerina (OPG) en respuesta a agentes paracrinos y endocrinos: factores endocrinos como la PTH y la 1,25-dihidroxivitamina D, estimulan la formación de osteoclastos de forma indirecta, actuando sobre las células del linaje osteoblástico para estimular la expresión de RANKL y M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), dos moléculas reguladoras necesarias para la osteoclastogénesis. Es la interacción del RANKL con su receptor RANK, expresado en la superficie celular de los precursores de osteoclastos hematopoyéticos mononucleares, lo que desencadena la formación de osteoclastos. Las células osteoblásticas también expresan la proteína soluble OPG, la cual bloquea la interacción de RANKL y RANK. Así, mediante la modulación de la expresión de RANKL y OPG, los osteoblastos pueden regular con precisión la formación de osteoclastos (11,21,22).
- b) Liberando quimioatrayentes que atraen a los precursores de los osteoclastos a la superficie ósea: a través de este mecanismo, quimiocinas como SDF-1/CXCL12; quimiocinas-ligando CCL3, CCL5, CCL7; CXCL1 y MCP-1, cuya expresión en las células osteoblásticas es estimulada por factores osteoclastogénicos como IL-1 β , TNF- α y PTHrP, los osteoblastos regulan la diferenciación osteoclástica mediante el control del movimiento de los precursores de osteoclastos entre sí (permitiendo la fusión) y hacia la superficie ósea (permitiendo la adhesión) (11,23,24).
- c) Preparando la superficie ósea para la fijación de los osteoclastos, mediante el depósito de proteínas no colágenas como la osteopontina y la BSP, con las cuales interactúa el osteoclasto multinucleado adhiriéndose a la matriz (11).

1.3.2.2 La resorción ósea: los osteoclastos y los marcadores osteoclásticos

Los osteoclastos son células hematopoyéticas altamente especializadas que se encuentran en la superficie ósea y la reabsorben. Comparten su linaje mieloide con los macrófagos y, al igual que estos, están especializados funcionalmente para la «digestión». Sin embargo, a diferencia de los macrófagos, los osteoclastos no fagocitan, sino que ejercen su función digestiva fuera de la célula mediante un proceso denominado exocitosis lisosomal, en el que el lisosoma se fusiona con la membrana plasmática y libera su contenido en el espacio extracelular. Otra característica distintiva de los osteoclastos es que son multinucleares y se forman a partir de la fusión de precursores mononucleares (25,26).

Los osteoclastos se desarrollan a partir de precursores mieloides inmaduros. El proceso de osteoclastogénesis inicia cuando precursores osteoclásticos son estimulados por M-CSF, regulando al alza la expresión de RANK; luego, bajo la estimulación de M-CSF y RANKL, forman inicialmente osteoclastos mononucleares que se fusionan en células multinucleadas. Los osteoclastos multinucleados se polarizan y adhieren al hueso y se convierten funcionalmente en reabsorbentes óseos mediante la secreción de metaloproteinasas, ácido y catepsina K (Figura 4A) (27).

En detalle, el primer factor que interviene en la osteoclastogénesis es el M-CSF, el cual se une a su receptor (CSF-1R) presente en los precursores de los osteoclastos, lo que estimula su proliferación e inhibe su apoptosis. RANKL es otro factor crucial para la osteoclastogénesis y es expresado por osteoblastos, osteocitos y células estromales. A través de la unión a su receptor RANK en los precursores de osteoclastos, induce la formación osteoclástica. Otro factor importante es la OPG, que es producido por una amplia gama de células, incluidos los osteoblastos, las células estromales y los fibroblastos gingivales y periodontales, el cual, mediante su unión a RANKL, impide la interacción RANK/RANKL y, en consecuencia, inhibe la osteoclastogénesis, con lo cual, el sistema RANKL/RANK/OPG es un mediador clave en dicho proceso. La interacción RANKL/RANK también promueve la

expresión de otros factores que favorecen la osteoclastogénesis, tales como NFATc1 y DC-STAMP. Al interactuar con los factores de transcripción PU.1, cFos y MITF, NFATc1 regula genes específicos de los osteoclastos, como *ACP5* (o TRAP, *tartrate-resistant acid phosphatase*) y *CTSK* (catepsina K), que son cruciales para la actividad osteoclástica. Bajo la influencia de la interacción RANKL/RANK, NFATc1 también induce la expresión de DC-STAMP, que es fundamental para la fusión de precursores de osteoclastos (Figura 4B).

La fusión de precursores osteoclásticos comprende varios pasos distintivos. En primer lugar, los precursores adquieren un estado de fusión competente inducido por M-CSF y RANKL. A continuación, la quimiotaxis de los macrófagos acerca a las células entre sí, mediada por la unión de CCL2 a su receptor. Luego, la adhesión célula-célula está mediada en parte por la cadherina E y las integrinas, y los subsiguientes reordenamientos del citoesqueleto están regulados por RAC1, que a su vez está regulada por MT1-MMP, lo que da lugar a la organización del citoesqueleto de actina dentro de los podosomas. Por último, la fusión de membranas, y por tanto la formación de osteoclastos maduros por fusión célula-célula, está mediada por la proteína DC-STAMP, que actúa como regulador maestro del proceso de fusión. Además, la regulación negativa de las tetraspaninas CD9 y CD81 es necesaria para la fusión de membranas. El CD44 también puede mediar la fusión de membranas a través de su interacción con la MT1-MMP (Figura 4B) (28–30).

La polarización de los osteoclastos durante la resorción ósea implica la reordenación del citoesqueleto de actina, en el que se forma un anillo de F-actina que comprende una densa zona continua de podosoma altamente dinámico, dando lugar a una región de membrana con invaginaciones que se convierte en un borde plegado. Es importante mencionar que estos dominios sólo se forman cuando los osteoclastos están en contacto con la MEC mineralizada, en un proceso en el que los podosomas osteoclásticos se adhieren a la superficie ósea, mediados por la $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -integrina y CD44. El borde plegado es un dominio de membrana formado por microvellosidades, que está aislado del tejido circundante por una región llamada

zona de sellado. Esta zona de sellado está formada por un anillo de actina y otras proteínas, como actina, talina, vinculina, paxilina, tensina y proteínas asociadas a actina como α -actinina, fimbrina, gelsolina y dinamina. La $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrina se une a la matriz ósea no colágena que contiene BSP1, osteopontina y vitronectina, estableciendo un sellado periférico que delimita la región central, donde se localiza el borde plegado. En el borde plegado hay una V-ATPasa, que ayuda a acidificar la laguna de resorción y, por tanto, permiten la disolución de los cristales de hidroxiapatita. En esta región, protones y enzimas como TRAP, CTSK y MMP-9 se transportan a un compartimento denominado laguna de Howship que conduce a la degradación ósea. A continuación, los productos de esta degradación se endocitan a través del borde plegado y pasan al dominio secretor funcional de la membrana plasmática (31–33).

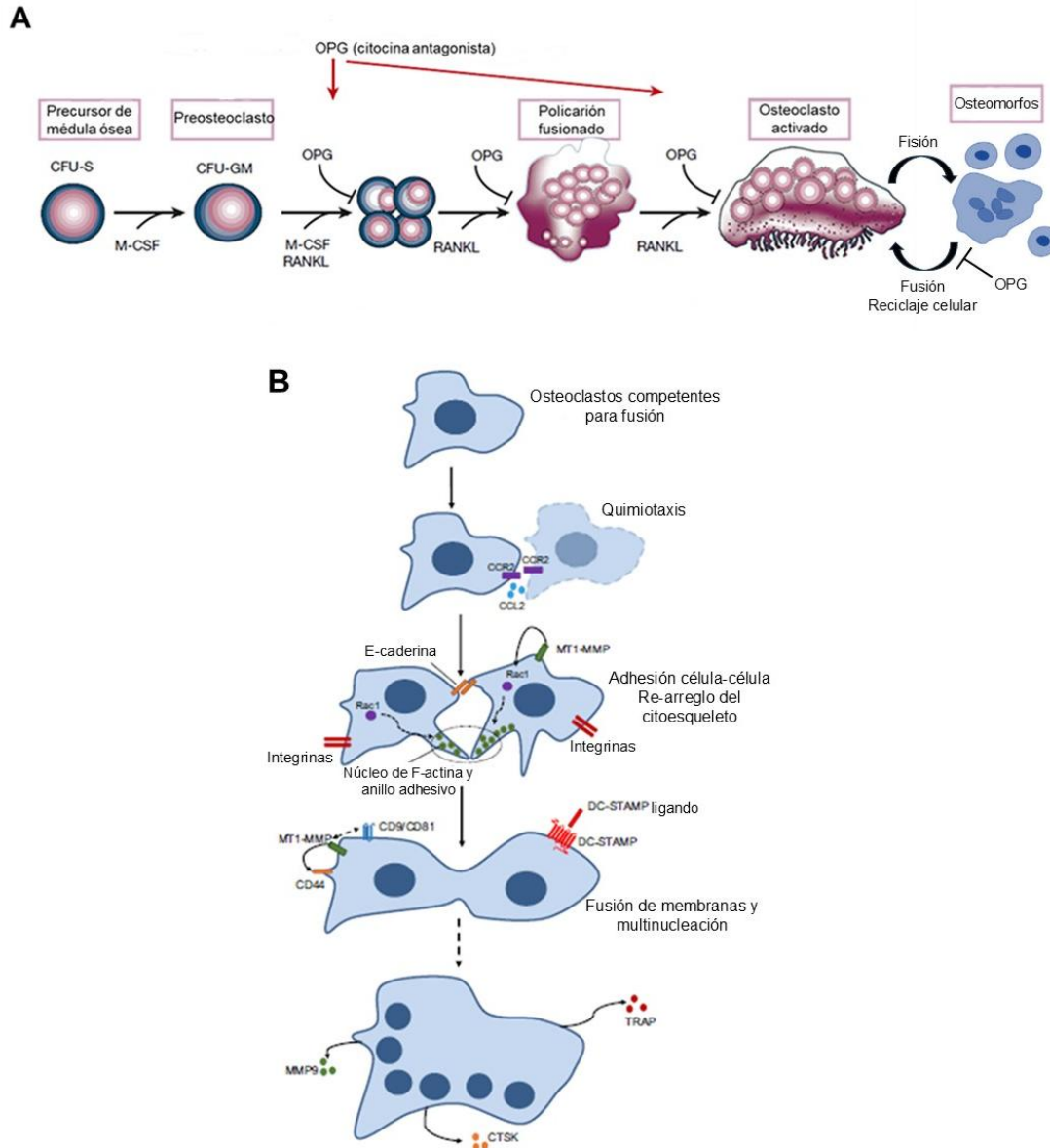


Figura 4. Esquemas de los procesos de osteoclastogénesis y de fusión de osteoclastos. A. La osteoclastogénesis es el proceso que va desde la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas hasta la formación de osteoclastos maduros. La maduración ocurre en el hueso a partir de células mononucleares de sangre periférica. El M-CSF y el RANKL son esenciales para la osteoclastogénesis, y su acción se da durante el compromiso y maduración del linaje osteoclástico. La OPG puede unirse y neutralizar RANKL y puede regular negativamente tanto la osteoclastogénesis como la activación de los osteoclastos maduros. Tomado y adaptado de (10,34). B. Representación esquemática de la fusión celular de precursores osteoclásticos. Tomado y adaptado de (25).

1.4 Desarrollo óseo

La osteogénesis es el proceso de formación ósea. Este proceso comienza entre la sexta y la séptima semana de desarrollo embrionario y continúa hasta aproximadamente los veinticinco años, aunque varía ligeramente según la persona. El desarrollo del esqueleto se da a partir de tres derivados: las células de la cresta neural craneal, los somitas y el mesodermo de la placa lateral. Las células de la cresta neural craneal forman los huesos planos del cráneo, la clavícula y los huesos craneales (excluyendo una porción de los huesos temporal y occipital). Los somitas forman el resto del esqueleto axial. El mesodermo de la placa lateral forma los huesos largos (35).

Existen dos tipos de osteogénesis: osificación endocondral e intramembranosa. En la osificación endocondral, las células mesenquimales indiferenciadas se condensan en sitios que eventualmente serán ocupados por elementos esqueléticos. Poco después, las células dentro de estas condensaciones se diferencian a lo largo de la vía condrocítica, expresando colágeno tipo IIb (que es el transcrito del gen *COL2A1*, específico de los condrocitos), colágeno tipo IX, XI y otros genes de la matriz. Estos condrocitos experimentan una etapa adicional de diferenciación que resulta en hipertrofia, caracterizada por la expresión de colágeno tipo X y una disminución en la expresión de colágeno tipo IIb. Los condrocitos hipertróficos se rodean gradualmente de una matriz extracelular calcificada, lo que favorece la invasión de vasos sanguíneos provenientes de la periferia de los elementos esqueléticos o pericondrio. Este último evento está controlado, al menos en parte, por VEGF y metaloproteinasas como MMP9. Tras la invasión vascular, los condrocitos hipertróficos mueren por apoptosis y los osteoblastos, que también se originan a partir de precursores mesenquimales, se diferencian y comienzan a depositar MEC. Los condrocitos quedarán restringidos a una zona estrecha, llamada placa de crecimiento, que junto con los osteoblastos dirigirán el crecimiento longitudinal del hueso. Algunas áreas del esqueleto, como el cartílago costocondral de las costillas, nunca experimentan osificación y contienen únicamente condrocitos no hipertróficos (36–38).

La osificación intramembranosa, por su parte, es un proceso que implica la conversión directa del mesénquima en hueso. Comienza cuando las células mesenquimales derivadas de la cresta neural se diferencian en osteoblastos. Los osteoblastos se agrupan y forman un centro de osificación. Los osteoblastos comienzan a secretar osteoide y, tras la fijación del calcio, se endurece la matriz y se da el atrapamiento de los osteoblastos. Este atrapamiento da como resultado la transformación de osteoblastos en osteocitos. A medida que los osteoblastos continúan secretando osteoide, este rodea los vasos sanguíneos y forma hueso trabecular y esponjoso. Estos vasos eventualmente formarán la médula ósea roja. Las células mesenquimales en la superficie del hueso forman una membrana llamada periostio. Las células en la superficie interna del periostio se diferencian en osteoblastos y secretan osteoide en paralelo al de la matriz existente, formando así capas. Estas capas se denominan colectivamente hueso compacto/cortical (39–41).

1.5 Remodelado óseo

El ciclo de remodelación ósea tiene lugar dentro de las cavidades óseas que necesitan ser remodeladas (Figura 5). En estas cavidades se forman estructuras anatómicas temporales llamadas unidades multicelulares básicas (BMUs), compuestas por un grupo de osteoclastos y de osteoblastos asociados a los vasos sanguíneos y a la inervación periférica. Se ha sugerido que las BMUs están cubiertas por un dosel de células (posiblemente células del revestimiento óseo) que forman el compartimento de remodelación ósea (BRC). El BRC parece estar conectado a las células del revestimiento óseo en la superficie del hueso, que a su vez se comunican con los osteocitos dentro de la matriz ósea. El ciclo de remodelación ósea comienza con una fase de iniciación, que consiste en la resorción ósea por los osteoclastos, seguida de una fase de formación ósea por los osteoblastos. Entre estas dos fases hay una fase de transición (o reversión). El ciclo se completa mediante acciones coordinadas de los osteocitos y las células del revestimiento óseo (42,43).

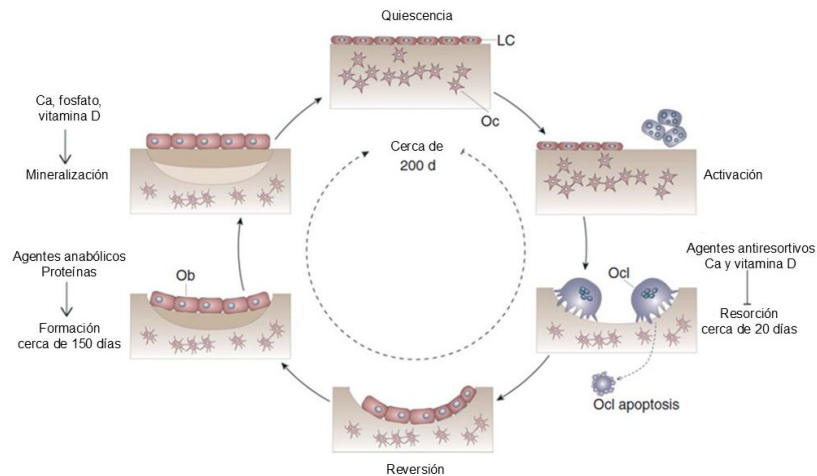


Figura 5. Ciclo de remodelación ósea. El recambio óseo sigue una secuencia de eventos que incluye la activación, el reclutamiento de osteoclastos (Ocl) para iniciar la resorción, la degradación y eliminación ósea, la reversión y la formación de hueso nuevo por los osteoblastos (Ob). Tras esta fase, se produce un período de reposo. LC: célula de revestimiento óseo; Oc: osteocito. Adaptada y tomada de (42).

El proceso consta entonces de tres fases:

- a. *Iniciación:* En primer lugar, la detección de una señal iniciadora de remodelación (tensión mecánica directa u hormonas) provoca el reclutamiento y la activación de los precursores de osteoclastos circulantes. A continuación, se eliminan las células de revestimiento óseo de la superficie para permitir que los precursores osteoclásticos se unan a la matriz ósea. Múltiples células mononucleares se fusionan para formar preosteoclastos multinucleados que se unen a la matriz, formando la fosa de resorción en la que, posteriormente, osteoclastos maduros cumplirán su función de resorción. En esta fase, factores osteoclastogénicos como RANKL y M-CSF desempeñan un papel fundamental. Asimismo, proteínas como las semaforinas –familia de glicoproteínas que no solo están unidas a la membrana, sino que también existen como formas solubles– regulan esta fase inicial. En efecto, durante el ciclo de remodelación ósea, los osteoclastos inhiben la formación ósea mediante la expresión de SEMA4D, para iniciar la resorción ósea, mientras que los osteoblastos expresan SEMA3A, que

suprime la resorción ósea, antes de la formación del hueso (Tabla 1) (31,44,45).

Tabla 1. Factores derivados de osteoblastos y su efecto sobre los osteoclastos

Factor derivado de Osteoblastos	Nombre	Modo de acción	Influencia sobre los osteoclastos
EFNB2	Efrina B2	Unida a membrana	Inhibe la osteoclastogénesis
FASL o APO-1 o CD95	FAS ligando	Unido a membrana	Induce apoptosis de osteoclastos
SEMA3A	Semaforina 3A	Unida a membrana	Inhibe la osteoclastogénesis inducida por RANKL
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor	Secretado	Promueve la proliferación y supervivencia de los precursores osteoclásticos
RANKL	Receptor activator for nuclear factor κ B ligand	Unido a membrana y secretado	Promueve la diferenciación y activación de osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina	Secretada	Inhibe la osteoclastogénesis
WNT5A	Proteína Wnt-5a	Secretada	Promueve la osteoclastogénesis
WNT16	Proteína Wnt-16	Secretada	Inhibe la osteoclastogénesis

Tomada y adaptada de (46)

- b. *Transición:* Durante la fase de transición, un período crítico para el acoplamiento, los osteoclastos estimulan la diferenciación de los precursores osteoblásticos, activando la formación de hueso en las lagunas de resorción ósea. Mientras se activa la formación ósea, la resorción osteoclástica se detiene y los osteoclastos experimentan apoptosis inducida por la alta

liberación de calcio extracelular del hueso durante la resorción. La carga mecánica estimula a los osteocitos a producir factores que ejercen una acción anabólica sobre el hueso, como PGE_2 , PGI_2 e IGF-1. Otro factor importante que interviene en esta fase es la efrina B2, una molécula unida a la membrana expresada en osteoclastos maduros, que se une a la efrina B4, presente en la membrana plasmática de los osteoblastos. La unión efrina B2/efrina B4 transduce señales bidireccionales que promueven la diferenciación osteoblástica, mientras que la señalización inversa (efrina B4/efrina B2) inhibe la osteoclastogénesis (Tabla 2) (31,47).

- c. *Terminación*: Una vez que comienza la formación ósea, esta se produce lentamente y dura mucho más (unos cuatro meses) que la resorción (unas tres semanas). Los osteocitos producen esclerostina (codificada por *SOST*), que suprime la formación ósea osteoblástica mediada por la vía Wnt/ β -catenina, lo que hace a los osteoblastos inactivos. Durante la formación ósea en la fase de terminación, la diferenciación osteoclástica se suprime, probablemente a través de la OPG producida por los osteoblastos. 50-70% de los osteoblastos entran en apoptosis, o se convierten en osteocitos o células de revestimiento. El resultado final del proceso de remodelación ósea es la producción de un nuevo osteón (48).

Tabla 2. Factores derivados de osteoclastos y su efecto sobre los osteoblastos

Factor derivado de osteoclastos	Nombre	Modo de acción	Influencia sobre los osteoblastos
EPHB4	Efrina B4	Unida a membrana	Promueve la osteoblastogénesis y suprime la apoptosis de osteoblastos
S1P	Esfingosina 1 fosfato	Secretada	Promueve migración y supervivencia de osteoblastos
SEMA4D	Semaforina 4D	Secretada	Suprime la osteoblastogénesis
CTHRC1	Collagen Triple Helix Repeat Containing 1	Secretada	Recluta células estromales e induce osteoblastogénesis
C3	Complement Component C	Secretado	Promueve la osteoblastogénesis

WNT10B	Proteína Wnt-10	Secretada	Promueve la osteoblastogénesis
RANK Vesicular	Receptor activator for nuclear factor κ B	Secretada	Promueve la osteoblastogénesis

Tomada y adaptada de (46)

1.6 Mecanotransducción ósea

El tejido óseo tiene la capacidad de adaptarse a fuerzas mecánicas como la compresión, la tensión y la gravedad. La carga mecánica es un importante regulador de la masa ósea. Por lo tanto, el esqueleto puede ajustarse a la carga modificando su masa, forma y microarquitectura, y esta respuesta difiere según la magnitud de la tensión impuesta. La mecanotransducción ósea comprende vías de señalización intracelular que se activan en respuesta a fuerzas mecánicas externas y que, en última instancia, dan lugar a la formación o resorción óseas. Actualmente, tanto las consideraciones teóricas como la evidencia experimental apoyan el papel del osteocito como la principal célula mecanosensible en el hueso.

Dentro del tejido óseo, la carga mecánica provoca un movimiento de fluidos desde regiones de alta presión a regiones de baja presión, donde los osteocitos son estimulados por ese movimiento de fluidos, afectando así la matriz de proteoglicanos en la superficie de estas células y en sus prolongaciones celulares. Esto deforma la membrana celular, lo que a su vez activa varios mecanorreceptores tales como canales iónicos, integrinas y GPCR. Otros receptores, como VEGFR2, receptores de estrógeno y receptores Notch, también podrían desempeñar un papel en este sentido. La activación de los mecanorreceptores propaga la respuesta a través de varios eventos de señalización secundaria, incluido el aumento de Ca^{2+} y ATP, la activación de la vía COX-PGE₂, así como las vías NO, Wnt/ β -catenina y MAPK/ERK, que eventualmente afectan la transcripción de genes diana que conducen a respuestas anabólicas óseas (49–52).

2. Trastornos esqueléticos y su base genética

Los trastornos genéticos son una clase de enfermedades causadas por un cambio en la secuencia del ADN que produce una función molecular anormal, y pueden

clasificarse en monogénicos o poligénicos. Los trastornos monogénicos están causados mayoritariamente por alelos de baja frecuencia y alta penetrancia que afectan a un único gen y suelen seguir una herencia mendeliana, aunque también pueden estar influidos por modificadores genéticos o ambientales. Por otro lado, los trastornos poligénicos están causados por los efectos aditivos de muchas variantes de susceptibilidad con pequeños efectos individuales, y están muy influidos por factores ambientales.

Los trastornos genéticos que afectan al sistema esquelético surgen a causa de alteraciones en los procesos de desarrollo, crecimiento y homeostasis del hueso. En las últimas décadas, la aplicación de la tecnología de secuenciación masiva al campo de los trastornos esqueléticos ha impulsado el descubrimiento del defecto genético subyacente de muchas de estas enfermedades. También ha dado lugar a la delimitación de nuevas entidades clínicas y a la identificación de genes y vías que anteriormente no se habían asociado con trastornos esqueléticos. Estos avances han llevado a una actualización de la nosología y clasificación de dichos trastornos, según la cual existen actualmente 461 enfermedades diferentes que se clasifican en 42 grupos según sus fenotipos clínicos, radiográficos y/o moleculares. Además, vale la pena destacar que se han encontrado variantes patógenas que afectan a 437 genes diferentes en 425/461 (92 %) de estos trastornos (53,54). Entre tales trastornos, podemos encontrar tanto enfermedades monogénicas, como la osteogénesis imperfecta (OI) (OMIM 166200), como enfermedades poligénicas, como la osteoporosis (OP) (OMIM 166710).

En esta sección desarrollaremos las principales características etiológicas y genéticas de cuatro trastornos esqueléticos. Específicamente, abordaremos la osteoporosis (OP), como uno de los trastornos más comunes; la osteogénesis imperfecta (OI); la hipoplasia dérmica focal (FDH) (OMIM 305600) y trastornos con alta masa ósea (HBM). Al final hablaremos de la Enfermedad de Gaucher tipo I (GD1) (OMIM 230800) como una entidad, dentro de un amplio grupo de enfermedades que, sin ser clasificadas como trastornos esqueléticos, pueden cursar con afectación ósea.

2.1 La densidad mineral ósea (DMO)

Uno de los parámetros más utilizados para medir el estado del hueso y, por tanto, para el diagnóstico de muchos trastornos esqueléticos, es el rasgo cuantitativo de la DMO. La DMO es usada como una medida de la masa ósea y se determina normalmente mediante DXA (*dual-energy x-ray absorptiometry*), una técnica de imagen ósea que implica dosis bajas de radiación ionizante y que proporciona evaluaciones precisas y exactas de la DMO en zonas clínicamente relevantes, como la columna lumbar, el fémur proximal y el radio distal (55,56). Múltiples estudios han mostrado que una baja densidad ósea en las zonas axiales y apendiculares predice futuras fracturas osteoporóticas (57–60). Además, instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), promueven el uso de la DMO como indicador cuantitativo de la salud ósea (61).

La DMO, al igual que la resistencia a la fractura, es un índice compuesto que depende del tamaño, la forma y la composición del hueso. Se distribuye normalmente en la población, con dos pequeños grupos en los extremos con valores de DMO muy altos (HBM) o muy bajos (LBM) (Figura 6A). El valor de la DMO se expresa en gramos de mineral por centímetro cuadrado (g/cm^2) y, a partir de este, se calcula la relación con la media de la población en términos de desviaciones estándar. Para este cálculo se pueden utilizar dos tipos de puntuación: *T-score* y *Z-score*. La *T-score* compara la DMO del paciente con el valor máximo medio de masa ósea en adultos del mismo sexo y población. El valor *T-score* se expresa como el número de desviaciones estándar (DE) con respecto al valor de dicho pico. Del mismo modo, la *Z-score* se expresa como el número de DE respecto a un valor de referencia, pero esta vez este valor es la DMO media de adultos del mismo sexo, población y edad (62,63).

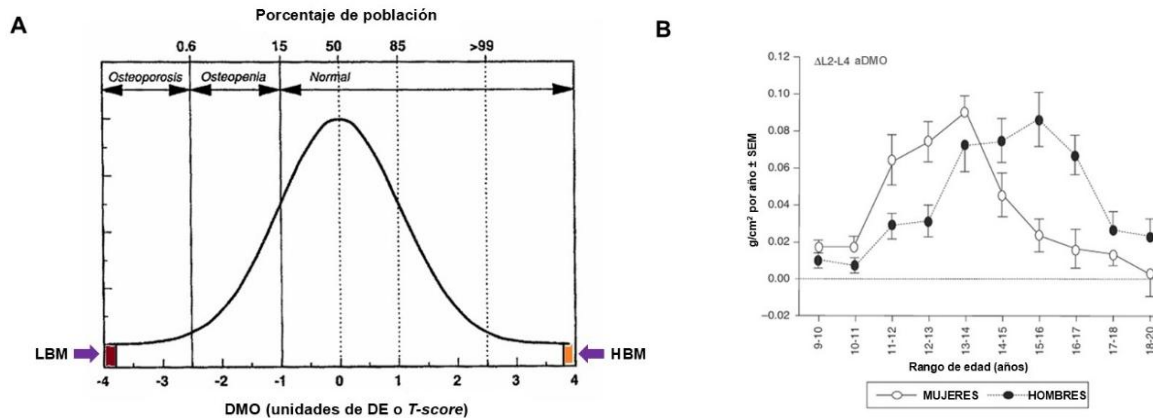


Figura 6. A. Distribución de la DMO en mujeres jóvenes sanas de entre 30 y 40 años. Dado que la distribución de la densidad ósea es normal, el 15 % de la población tiene *T-score* de -1 o inferior y el 0.6 % de la población tiene una *T-score* inferior a -2.5. B. Aumento anual de la DMO en L2-L4 durante la pubertad en mujeres y hombres. La alta tasa de acumulación ósea se mantiene entre los 11 y los 14 años en las niñas y entre los 13 y los 17 años en los niños. Tomado y adaptado de (63,64).

En las adolescentes, el aumento de la DMO disminuye rápidamente tras la menarquia, de modo que se detiene prácticamente dos años después de la menarquia. En los adolescentes, el aumento de la DMO, que es especialmente elevado entre los 13 y los 17 años, disminuye notablemente a partir de entonces, aunque sigue siendo significativo entre los 17 y los 20 años (Figura 6B). La DMO comienza a disminuir a principios de la tercera década de vida en ambos sexos, en todas las razas y en cualquier zona geográfica del mundo (64–67).

La DMO es un buen marcador del estado óseo, explicando entre el 50 y el 70% de la variación de la resistencia ósea y es un buen predictor del riesgo de fracturas. Sin embargo, sólo nos da información sobre la cantidad de tejido y no sobre la calidad ósea. Para caracterizar plenamente los componentes básicos de la resistencia ósea (composición, microarquitectura, tamaño y forma) se están desarrollando diversas técnicas de imagen, como la resonancia magnética (RM), la tomografía computarizada cuantitativa (QCT), la QCT periférica de alta resolución (HR-pQCT), la ecografía cuantitativa (QUS), la multiespectrometría ecográfica por radiofrecuencia (REMS), la microindentación, la radiogrametría digital y otras

técnicas radiográficas. Asimismo, es posible cuantificar los marcadores bioquímicos del remodelado óseo (Tabla 3) para determinar la estructura y la resistencia del hueso. Estos marcadores son muy útiles para evaluar la velocidad de pérdida ósea, el riesgo de fractura y comprobar el funcionamiento de la terapia. Con todo, su uso clínico sigue siendo limitado y es necesario seguir investigando para ampliar el conocimiento sobre su utilidad diagnóstica.

Tabla 3. Lista de biomarcadores del remodelado óseo útiles para examinar el estado del tejido óseo

Biomarcadores óseos	Muestra requerida
<i>Biomarcadores de formación ósea</i>	
P1NP/P1CP	Suero/Plasma EDTA
ALP específica de hueso	Suero
OCN	Suero/Plasma Heparina de litio
<i>Biomarcadores de resorción ósea</i>	
TRAcP5b	Suero
DPD/PYD	Orina/Suero
NTX/CTX	Orina/Suero/Plasma
Hidroxiprolina (aminoácido del colágeno)	Orina
Hidroxilisina (aminoácido del colágeno)	Orina
BSP	Suero
CTSK	Suero
OPG	Suero/Plasma EDTA/Plasma Heparina de litio
RANKL	Suero

P1NP: *procollagen type 1 N-terminal propeptide*; P1CP: *procollagen type 1 C-terminal propeptide*; ALP: fosfatasa alcalina específica de hueso; OCN: osteocalcina; TRACP5b: *tartrate resistant acid phosphatase 5b*; DPD: Deoxipiridinolina; PYD: Piridinolina; NTX: Telopéptido N-terminal; CTX: Telopéptido C-terminal; BSP: *Bone sialoprotein*; CTSK: catepsina K; OPG: osteoprotegerina; RANKL: *receptor activator for nuclear factor κ B ligand*. Tomada y adaptada de (68)

2.2 Heredabilidad de la DMO

El porcentaje de contribución genética de un carácter se expresa mediante el cálculo de la heredabilidad. Las estimaciones de heredabilidad distinguen entre los factores genéticos aditivos y no aditivos (como la epistasis: interacción entre alelos en diferentes *loci*) y factores ambientales como el entorno prenatal o el estado socioeconómico (69–71).

Existen dos definiciones diferentes de heredabilidad: Heredabilidad en sentido estricto (h^2) que se refiere únicamente al componente genético aditivo y representa el grado en que los genes transmitidos por los padres determinan el fenotipo de sus hijos (72); y heredabilidad en sentido amplio (H^2) que es la relación entre la varianza genética total y la varianza fenotípica total. Esta heredabilidad explica la cantidad de variación fenotípica atribuible a la genética, incluyendo las interacciones epistáticas y los efectos dominantes (69,70). Para los estudios de heredabilidad se utilizan tres fuentes principales de datos: gemelos monocigóticos (MZ) y dicigóticos (DZ), estudios de adopción y estudios familiares (72–75).

Como hemos dicho, la DMO es el parámetro óseo utilizado para determinar el estado del hueso y el riesgo de fractura. Es un rasgo con una heredabilidad estimada del 50-85%, que varía en función de la etnia, el sexo y la localización esquelética estudiada, posiblemente reflejando diferentes contribuciones de las influencias genéticas y ambientales. Así, por ejemplo, los varones tienden a tener mayores niveles de heredabilidad que las mujeres. En cuanto a la localización del esqueleto, la DMO de la columna vertebral presenta una mayor heredabilidad que la DMO femoral, pero el mayor grado de heredabilidad de la DMO se encuentra en el cráneo ($h^2 > 95\%$) (76–81).

Asimismo, se ha demostrado que otros parámetros óseos son altamente heredables, como la geometría ósea ($h^2 = 50-60\%$) (82); la microarquitectura ósea predicha por HR-pQCT ($h^2 = 22-64\%$) (83) y algunos biomarcadores de remodelado óseo, tales como PTH ($h^2 = 54-65\%$), 1,25-hidroxivitamina D ($h^2 = 53-74\%$), BAP (*bone-specific alkaline phosphatase*) ($h^2 = 67-80\%$), OCN ($h^2 = 14-44\%$), entre otros (84).

2.3 La Osteoporosis: Definición y epidemiología

La OP es un trastorno sistémico del metabolismo óseo que se caracteriza por una disminución del contenido mineral, una alteración de la microestructura del hueso, una disminución de la resistencia y un aumento de la fragilidad ósea, y una mayor susceptibilidad a las fracturas. La OP puede considerarse como un desequilibrio patológico de los procesos de remodelación ósea, en el que la resorción ósea

predomina sobre la formación ósea, dando lugar a un balance óseo total negativo (Figura 7). Su aparición está asociada con la edad avanzada y es más frecuente entre las personas mayores y las mujeres posmenopáusicas (85,86).

La OP es una patología silenciosa, sin síntomas ni evidencia hasta que se produce una fractura. El diagnóstico de la OP se realiza a través de los valores de la DMO y de los casos de fractura en la edad adulta en ausencia de traumatismos importantes.

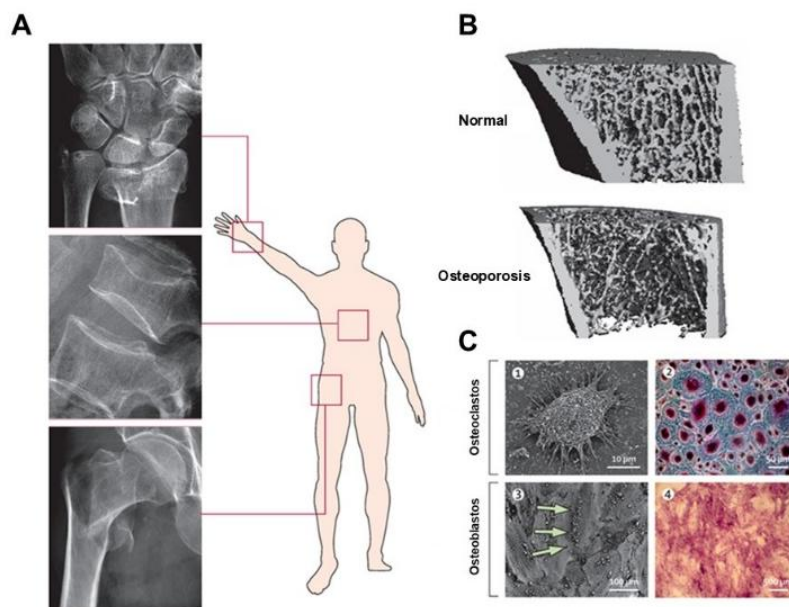


Figura 7. La osteoporosis. (A) Las fracturas por fragilidad suelen afectar a la muñeca, las vértebras y la cadera. (B) La microtomografía computarizada muestra un marcado adelgazamiento trabecular del hueso osteoporótico en comparación con el hueso normal. (C) Vistas microscópicas de osteoclastos que reabsorben hueso y osteoblastos que forman hueso: (1) osteoclasto con su morfología distintiva; (2) tinción con TRAP de osteoclastos multinucleados; (3) múltiples osteoblastos (flechas blancas) en la matriz mineralizada; (4) tinción con fosfatasa alcalina de osteoblastos. Tomado y adaptado de (85)

Un grupo de trabajo de la OMS desarrolló una categorización de la DMO basada en los *T-scores* (Figura 8), clasificándolos de la siguiente manera:

- a. Normal: cuando el *T-score* de la DMO es superior a -1 DE.
- b. Osteopenia: cuando el *T-score* de la DMO se sitúa entre -1 y -2.5 DE.

- c. Osteoporosis: Cuando el valor de *T-score* de la DMO es inferior a -2.5 DE, y el *Z-score* de la DMO es inferior a -1 DE.
- d. Osteoporosis grave o establecida: Cuando la presencia de fracturas se añade al criterio de osteoporosis (61,87).

En mujeres premenopáusicas, hombres menores de 50 años y niños, la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD por sus siglas en inglés) recomienda que, en lugar de *T-score*, se utilicen *Z-score* ajustados por etnia o raza, y se consideren puntuaciones $Z \leq -2.0$ como baja densidad mineral ósea para la edad cronológica o por debajo del rango esperado para la edad y aquellas > -2.0 como dentro del rango esperado para la edad (88).

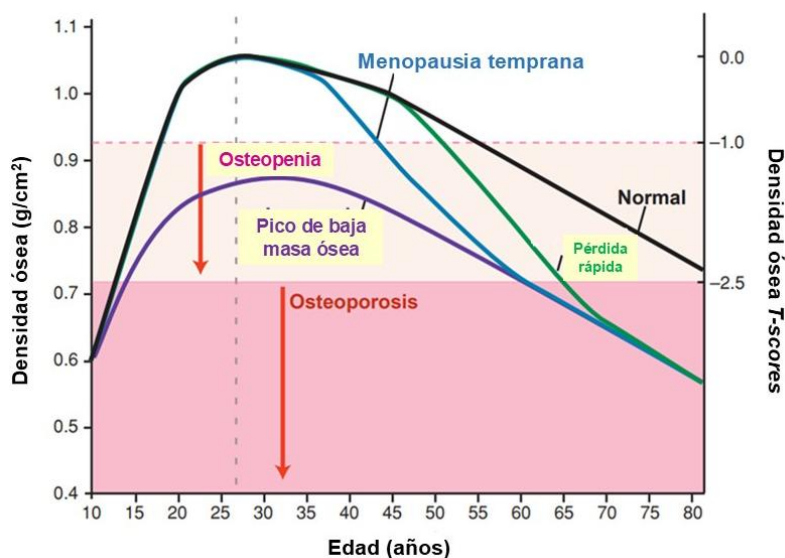


Figura 8. Variación en la DMO de las mujeres a diferentes edades. En las mujeres de edad avanzada, la baja densidad ósea puede deberse a que solo alcanzan un pico de masa ósea bajo (mostrado en morado), a una mayor pérdida ósea como resultado de una menopausia precoz (mostrado en azul) o a una tasa de pérdida ósea posmenopáusica superior a la media («pérdida rápida», mostrada en verde). La OMS ha definido la osteopenia como una *T-score* de densidad ósea entre -1,0 y -2,5, y la osteoporosis como una *T-score* $< -2,5$. La línea negra corresponde a la DMO de una persona sana Tomado y adaptado de (56).

Además de estas técnicas, para poder iniciar una terapia farmacológica, el diagnóstico debe complementarse con pruebas de laboratorio (análisis de sangre u orina) que excluyan causas secundarias de OP.

Como hemos dicho, las fracturas «osteoporóticas» son una de las primeras señales evidentes de la osteoporosis. Estas, también conocidas como «fracturas de bajo impacto» o «fracturas por fragilidad», son fracturas resultantes de un impacto equivalente a una caída inferior o igual a la altura de pie. Estas fracturas se producen normalmente en localizaciones esqueléticas importantes como las vértebras (columna vertebral), la parte proximal del fémur (cadera), la parte distal del antebrazo (muñeca) o el hombro (89). Las fracturas osteoporóticas suelen provocar un rápido deterioro del estado de salud y una disminución de la calidad de vida, asociándolas incluso con altas tasas de mortalidad en comparación con controles de la misma edad y sexo. En particular, las fracturas de cadera provocan un exceso de mortalidad del 37 % y del 17 % en hombres y mujeres, respectivamente (90–92). Además, las fracturas osteoporóticas suponen también una sobrecarga económica para los sistemas de salud, razones todas que han llevado a desarrollar calculadoras de riesgo de fractura basándose en la evaluación del riesgo absoluto, tras tener en cuenta los factores de riesgo clínicos y/o la DMO (87). Algunas de las características clínicas que se tienen en cuenta son la edad, el sexo, el origen étnico, las fracturas previas, el índice de masa corporal (IMC), los antecedentes familiares de fracturas, el uso de glucocorticoides orales, la artritis reumatoide y las causas secundarias de OP, como el consumo de tabaco y alcohol. Las herramientas más usadas para realizar el cálculo de riesgo de fractura son: la herramienta FRAX (*fracture risk assessment tool*); el algoritmo *QFracture* y la herramienta Garvan (93–95).

La OP se clasifica en dos categorías generales: OP primaria y OP secundaria. Las OP primarias constituyen el grupo más amplio e incluyen los casos de OP en los cuales no se identifican otras enfermedades que la justifiquen directamente (96). Dentro de esta categoría encontramos:

- a. OP idiopática juvenil: se considera un trastorno esquelético raro, que se inicia entre los 8 y 14 años y cursa con una aparición brusca de dolor óseo y de fracturas con mínimos traumatismos.
- b. La OP idiopática del adulto joven: se presenta en varones jóvenes y en mujeres premenopáusicas y se manifiesta mediante disminuciones en la DMO del hueso trabecular y episodios de fracturas recidivantes (reaparición de la fractura algún tiempo después de padecida).
- c. OP posmenopáusica tipo I: se da en un subgrupo de mujeres posmenopáusicas de 50 a 75 años, caracterizada por una pérdida abrupta y acelerada de hueso trabecular causada por una alta tasa de resorción ósea, con fracturas de los cuerpos vertebrales y la porción distal como complicaciones frecuentes.
- d. OP senil tipo II: se da en hombres y mujeres mayores de 70 años causada principalmente por una disminución de la función de los osteoblastos. Algunos otros factores etiopatogénicos observados son: sedentarismo, inmovilización por largos períodos, menor absorción intestinal de calcio, déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Dado que se afecta tanto el hueso cortical como el trabecular, son frecuentes las fracturas de cuello femoral y de pelvis.

En la categoría de las OP secundarias encontramos todos aquellos casos de OP que son una consecuencia o manifestación acompañante de otras enfermedades o de su tratamiento. Algunas causas secundarias de OP son enfermedades endocrinológicas (por ejemplo, estados hipogonadales, patologías endocrinas, diabetes), enfermedades gastrointestinales, trastornos genéticos (por ejemplo, hipofosfatasia), trastornos hematológicos (por ejemplo, leucemias), enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide), trasplante de órganos, fármacos (por ejemplo, anticoagulantes) y enfermedades nefríticas. Pueden provocar un desarrollo deficiente de la masa ósea o acelerar y potenciar su pérdida (97). Además de estos factores, recientemente se está estudiando el papel que tiene la microbiota intestinal en el desarrollo de patologías óseas. En efecto, la microbiota intestinal alterada afecta al equilibrio de la remodelación ósea dando lugar a una mayor tasa

de resorción en comparación con la formación ósea, lo que en última instancia provoca una reducción de la DMO (98).

La OP es una enfermedad compleja determinada tanto por factores genéticos como por factores ambientales y por la interacción de ambos. Gracias a diferentes estudios epidemiológicos, se han identificado numerosos marcadores y factores de riesgo que conllevan una mayor probabilidad de desarrollar osteoporosis. Algunos con mayor peso específico son: más de 10 años de menopausia, antecedentes de fractura previa, antecedentes familiares de osteoporosis (factores genéticos) y edad.

Se estima que la OP afecta a 200 millones de mujeres en todo el mundo y afecta de manera desproporcionada a los adultos mayores. Se prevé que la prevalencia de la osteoporosis pueda aumentar aún más, ya que se espera que la población de adultos mayores de 65 años se duplique entre 2010 y 2040, por lo que siguen siendo necesarios estudios que apunten a mejorar la salud ósea de las personas y que ofrezcan opciones terapéuticas adecuadas para el manejo de la enfermedad. La incidencia de la osteoporosis varía según las zonas geográficas. En Europa, por ejemplo, 27.6 millones de personas padecen osteoporosis, con más de 3.5 millones de fracturas al año (99,100). Además, una media del 71 % de las mujeres europeas mayores con alto riesgo de fractura no reciben una evaluación y un tratamiento adecuados para mejorar su salud ósea (101,102). Se estima que cada año se producen 37 millones de fracturas en personas mayores de 55 años en todo el mundo (103). Una de cada dos mujeres y uno de cada cinco hombres mayores de 50 años sufrirán una fractura por estrés a lo largo de su vida (104).

2.3.1 Heredabilidad de los rasgos de la osteoporosis

Además de la DMO, la fractura osteoporótica también tiene una heredabilidad considerable, estimada en un 54-85%. Las fracturas son un fenotipo muy complejo, debido principalmente a que la mayoría de ellas se deben a una caída, y el riesgo de caída es un carácter complejo con una contribución ambiental muy elevada. Por lo tanto, la heredabilidad de la fractura disminuye con la edad, ya que el componente ambiental aumenta.

Otros determinantes de la resistencia ósea, como la porosidad, el grosor cortical, la morfología del hueso trabecular y las propiedades intrínsecas indicativas de la calidad del tejido óseo, también contribuyen a la predisposición genética de las fracturas osteoporóticas, pero han sido menos estudiados y requieren muestras más grandes debido a su alto componente poligénico (105,106).

2.3.2 Manejo y perspectivas terapéuticas

Antes de hablar de tratamiento de la OP, debemos decir que la forma más eficaz para lograr reducir su impacto es la prevención. Una dieta equilibrada rica en calcio y vitamina D, hacer ejercicio físico, así como evitar el consumo de alcohol y el tabaquismo, puede aumentar el pico de DMO y disminuir la tasa de pérdida ósea (107,108).

Los tratamientos de la OP con aproximaciones farmacológicas pueden dividirse en dos: aquellos que usan fármacos que ayudan a disminuir la tasa de resorción ósea (antirresortivos) y los que usan fármacos promueven la mineralización (anabólicos). Se considera que son más efectivos los primeros que los segundos. Los tratamientos antirresortivos son aquellos que bloquean la resorción llevada a cabo por los osteoclastos. En este grupo se encuentran los bifosfonatos (BPs), el denosumab (anticuerpo monoclonal contra RANKL), el ranelato de estroncio, la terapia estrogénica sustitutiva (ERT) y los SERMs (*selective estrogen receptor modulators*). En cuanto a los tratamientos anabólicos, estos estimulan la formación ósea llevada a cabo por los osteoblastos. Entre ellos se encuentran los derivados de la PTH (teriparatida, abaloparatida) y el Romosozumab (anticuerpo monoclonal contra la esclerostina). Además, estos tratamientos se complementan con vitamina D y calcio. Hay que señalar que no todos los tratamientos reducen el riesgo de fractura en todos los sitios del esqueleto óseo, por lo tanto, la elección del tratamiento debe tener en cuenta la localización de la fractura, las contraindicaciones y los efectos secundarios (109,110).

Además de estos, otros tratamientos dirigidos contra las proteínas del metabolismo óseo se encuentran en distintas fases preclínicas. Uno de ellos es el odanacatib, un fármaco que inhibe la CTSK, una colagenasa específica de los osteoclastos y que

es responsable de la disolución de los componentes orgánicos de la laguna de resorción. Otros fármacos como los antagonistas de la $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrina, inhibidores de los canales de cloro, análogos de la vitamina D, anticuerpo anti-DKK1, así como estrategias con nanomedicinas, también están siendo desarrollados (111).

2.3.2.1 La cohorte BARCOS y la trayectoria de nuestro grupo en la investigación de la osteoporosis

Nuestro grupo de investigación básica colabora desde hace tiempo con el equipo de medicina interna del Hospital del Mar en el estudio de la base genética de la OP y de otras patologías relacionadas con el metabolismo óseo. De esta colaboración nace la cohorte BARCOS, una cohorte poblacional de mujeres posmenopáusicas del área de Barcelona con la cual hemos participado en consorcios europeos como GENOMOS (*Genetic Markers for Osteoporosis*), creado en el año 2003 con el fin de analizar el efecto de 14 variantes polimórficas situadas en genes como *COL1A1* y *TGF β 1* en una muestra formada por más de 20 mil individuos.

Como hemos dicho, la cohorte BARCOS está formada por españolas posmenopáusicas que acudieron a la visita inicial en la consulta externa de la Unidad de Menopausia del Hospital del Mar de Barcelona. Las pacientes fueron reclutadas prospectivamente, de forma consecutiva y no seleccionada, e incluidas independientemente de sus valores de DMO. Los criterios de exclusión del estudio fueron: diagnóstico previo de enfermedad ósea de Paget u osteomalacia, trastorno metabólico o endocrino, estar ya recibiendo tratamiento, como terapia hormonal sustitutiva. También se excluyó a las mujeres que habían tenido la menopausia antes de los 35 años. Los datos registrados fueron la edad, el número de años desde la menopausia (ysm) para las mediciones de DMO en la columna lumbar y el cuello femoral, la altura y el peso (112,113). Se dispone de ADN de todas las participantes, con el que se han llevado a cabo múltiples estudios de asociación de variantes genéticas comunes con la DMO, así como estudios para identificar variantes genéticas raras asociadas con fenotipos óseos (112–136).

2.4 Osteogénesis imperfecta

La osteogénesis imperfecta (OI) es un trastorno sistémico del tejido conectivo caracterizado por una baja masa ósea y fragilidad ósea que causa una morbilidad significativa debido al dolor, la inmovilidad, las deformidades esqueléticas y el déficit de crecimiento. La disminución de la resistencia ósea provoca fracturas por traumatismos leves o fracturas en lugares atípicos (como el olécranon (prominencia del codo) y las fracturas por compresión vertebral). Dado que la producción de colágeno tipo I en diversos tejidos se ve afectada, las personas que padecen OI también pueden tener manifestaciones extraesqueléticas que incluyen anomalías dentales, esclerótica azul grisácea, pérdida auditiva, hipermovilidad articular, debilidad muscular y, más raramente, complicaciones cardiovasculares y pulmonares debido al componente inflamatorio y de compromiso inmune con el que puede cursar la enfermedad, según se ha propuesto recientemente. La identificación de variantes en genes relacionados con la OI en individuos levemente afectados o aparentemente asintomáticos respalda la existencia de un espectro clínico más amplio que abarca desde una baja masa ósea y osteoporosis de aparición temprana hasta una OI progresivamente deformante y letal en el periodo perinatal. El diagnóstico de la OI suele hacerse atendiendo a las características clínicas del paciente, a través de imágenes diagnósticas tales como ecografía y resonancia magnética y mediante pruebas moleculares y bioquímicas (137–139). La OI tiene una incidencia 1/15.000-20.000 nacidos vivos (140). Los patrones de herencia de la OI incluyen formas autosómicas dominantes (AD) y recesivas (AR), así como una forma recesiva ligada al cromosoma X. La mayoría de los casos de OI (80-85 % en los países occidentales; alrededor del 60 % en países con una alta incidencia de consanguinidad) se deben a defectos estructurales o cuantitativos en los genes del colágeno tipo I, *COL1A1* y *COL1A2*, que codifican las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ del colágeno tipo I, respectivamente. Sin embargo, actualmente se entiende que la OI es un trastorno relacionado con el colágeno, gracias al descubrimiento de tipos de OI causados por defectos en genes diferentes cuyos productos proteicos interactúan con el colágeno para el plegamiento, la modificación postraducciona, el procesamiento y el tráfico de proteínas, así como defectos en genes que afectan

principalmente a la mineralización ósea y la diferenciación de los osteoblastos (141,142).

La OI se clasifica en cinco grupos de acuerdo con sus características clínicas que varían en gravedad, desde leves hasta letales:

- a. OI tipo I (OMIM 166200): relacionada con una deficiencia cuantitativa de colágeno estructuralmente normal. Es la forma más leve, caracterizada por una esclerótica azulada, pero sin deformidades óseas. Los genes implicados en este grupo son *COL1A1*, *COL1A2* y *PHLDB1*. La OI asociada con este último gen presenta un patrón de herencia AR, las demás de este grupo tienen herencia AD. Vale la pena decir que las mutaciones más frecuentes que afectan a los genes *COL1A1* y *COL1A2* son sustituciones de un solo nucleótido que reemplazan residuos de glicina o defectos de *exon splicing*. La porción de triple hélice de cualquiera de las cadenas de colágeno contiene 338 repeticiones ininterrumpidas del triplete GlyXaaYaa, donde Gly es glicina, Xaa es a menudo prolina y Yaa es a menudo hidroxiprolina. La presencia de glicina es un requisito previo para el plegamiento correcto de las tres cadenas en una triple hélice de colágeno. El colágeno mutante que sufre sustituciones de residuos de glicina, se retiene parcialmente en el interior de las células y, tras su secreción, se ensambla en fibrillas desorganizadas, lo que altera la mineralización. Por otra parte, las mutaciones truncantes provocan la degradación del ARNm mediada por secuencias *nonsense* y los consiguientes defectos cuantitativos (una reducción de aproximadamente el 50 %) de colágenos que, por lo demás, serían normales (143,144). Las mutaciones que reducen la síntesis de colágeno tipo I normal al 50 % (mutaciones truncantes) suelen dar lugar a una OI tipo I leve. Las mutaciones que afectan a la estructura de las cadenas de procolágeno (sustituciones de residuos de glicina o defectos de *exon splicing*) probablemente tienen consecuencias fenotípicas más perjudiciales (OI tipos II, III y IV) (144).

- b. OI tipo II (OMIM 166210): es extremadamente grave y letal durante el periodo perinatal. Los genes asociados con este grupo son *COL1A1* con un patrón de herencia AD, *COL1A2* presentando un patrón de herencia AD o AR según la variante; *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB* y *TAPT1*, con un modo de herencia AR.
- c. OI tipo III (OMIM 259420): la forma más grave observada en pacientes que sobreviven al período neonatal. Comprende deformidades progresivas graves y una estatura extremadamente baja. Los genes aquí relacionados son *COL1A1* y *COL1A2* con herencias AD o AR según la variante; *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *SP7*, *BMP1*, *TMEM38B*, *WNT1*, *CREB3L1*, *SPARC*, *TENT5A*, *MESD*, *KDELR2*, *CCDC134*, *PLOD2* y *SEC24D* con un modo de herencia AR, y finalmente *MBTPS2* con un patrón de herencia recesivo ligado a X (XLR).
- d. OI tipo IV (OMIM 166220): cursa con deformidades óseas leves a moderadas, baja estatura y esclerótica normal. Los genes asociados con este tipo son *COL1A1* y *COL1A2* con herencia AD, *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *PLOD2*, *FKBP10* y *KIF5B* presentando herencia AR, y el gen *MBTPS2* con un modo de herencia XLR.
- e. OI tipo V (OMIM 610967): caracterizada por la calcificación de la membrana interósea y es diferente de los otros cuatro tipos, tanto radiológicamente como fenotípicamente. El gen aquí implicado es *IFITM5* con un patrón de herencia AD.

La OI requiere un manejo terapéutico interdisciplinar que incluye rehabilitación, ortopedia, farmacología y psicología. En cuanto a los tratamientos farmacológicos más usados se encuentra el uso de bisfosfonatos que son análogos sintéticos del pirofosfato que se une al hueso e inhiben la resorción ósea, permitiendo aumentar la DMO (137–139,141,142,145–150).

2.5 Hipoplasia dérmica focal

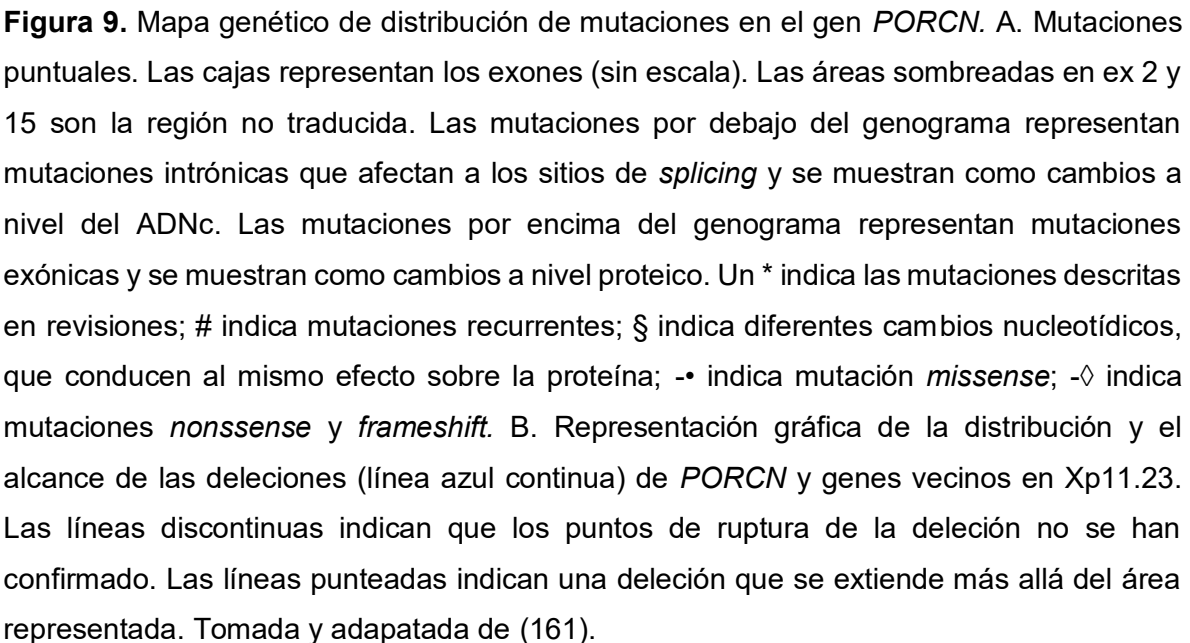
La hipoplasia dérmica focal (FDH por sus siglas en inglés) es un trastorno displásico congénito poco frecuente que afecta a los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. También se conoce como síndrome de Goltz, descrito por primera

vez en 1962 (151). Se desconoce su prevalencia y solo se han descrito entre 300 y 400 casos en la literatura. Es una enfermedad ligada al cromosoma X con una penetrancia variable en las mujeres afectadas debido a la inactivación del cromosoma X. En los hombres, la incidencia es mucho menor (aproximadamente el 10 % de los individuos afectados) y, en la gran mayoría de los casos, es consecuencia de una mutación somática (152). El gen *PORCN* es el único conocido que causa esta enfermedad. *PORCN*, situado en Xp11.23, codifica para el homólogo humano del *porcupine* de *Drosophila melanogaster* (153,154).

Es un trastorno multisistémico caracterizado por anomalías dermatológicas, esqueléticas, oculares, urinarias, gastrointestinales, neurológicas y bucales. La piel y el esqueleto son las zonas más comúnmente afectadas. Dentro de los hallazgos esqueléticos más comunes se encuentran: malformación de las extremidades (sindactilia, oligodactilia, mano/pie hendido, camptodactilia) y osteopatía estriada. Ocasionalmente también se pueden presentar anomalías costovertebrales como escoliosis, costillas fusionadas, costillas bifidas, apéndice caudal, así como hendidura esternal y displasia fibrosa ósea (154). Además, algunos estudios sugieren que, dependiendo de la mutación, podría también afectarse la DMO (155,156).

Las mutaciones en el gen *PORCN* se identificaron por primera vez en pacientes con FDH en 2007 (157). El espectro de mutaciones reportadas va desde mutaciones intragénicas, pasando por microdeleciones, hasta grandes deleciones que eliminan el gen, abarcando genes vecinos (Figuras 9A y 9B).

La FDH, al ser un trastorno multisistémico con manifestaciones clínicas variables, puede conducir a un diagnóstico tardío o erróneo. Una evaluación exhaustiva del paciente puede ayudar a realizar un diagnóstico preciso. No existe un estándar de referencia para el diagnóstico de esta enfermedad; sin embargo, la literatura sugiere tener en cuenta varios aspectos para un diagnóstico acertado: hallazgos típicos de anomalías cutáneas o una mutación del gen *PORCN*, además del hallazgo de anomalías del sistema esquelético, anomalías oculares y anomalías orales (154,158–164).



2.6 Alteraciones con alta masa ósea

Varios trastornos genéticos raros con efectos esqueléticos, denominados colectivamente osteopetrosis y displasias óseas esclerosantes, están asociados con un aumento generalizado de la DMO. De los 461 trastornos genéticos del esqueleto descritos actualmente, 45 son clasificados como alteraciones con alta masa ósea (54). Estos trastornos pueden dividirse en tres grupos, a saber:

- a. Aquellos en los que se suprime la resorción ósea. En este grupo se encuentran patologías como las osteopetrosis o la picnodisostosis (OMIM 265800). Las osteopetrosis son enfermedades genéticas raras que se caracterizan por una reducción de la resorción ósea osteoclástica. La remodelación ósea defectuosa provoca esclerosis esquelética y huesos anormalmente densos y, por lo tanto, frágiles. En cambio, la picnodisostosis está causada por una degradación enzimática defectuosa de la matriz ósea orgánica, debido a mutaciones autosómicas recesivas en el gen *CTSK* (165–167). Las osteopetrosis se clasifican según su gravedad clínica, incluyendo formas neonatales o infantiles graves que tienen el peor pronóstico, y formas más leves que causan la osteopetrosis de aparición tardía tipo 2 (OPTA2) (OMIM 166600) generadas por variantes del gen *CLCN7* (54,165,168).
- b. Aquellos en los que se potencia la formación ósea. En este grupo se incluyen diferentes patologías de crecimiento excesivo de los huesos causadas por una activación de la vía Wnt/ β -catenina. Un ejemplo de estas patologías es la esclerosteosis (OMIM 269500), causada por variantes de pérdida de función (LoF) en el gen *SOST*, generando una reducción de la inhibición de la vía de Wnt y, por tanto, un excesivo crecimiento óseo (169,170). Otro ejemplo de trastornos dentro de este grupo es la enfermedad de Van Buchem (OMIM 239100), una displasia ósea autosómica recesiva caracterizada por un aumento simétrico del grosor de los huesos, lo que da lugar a un aumento de la densidad cortical ósea. Se cree que una delección de 52 kb situada aproximadamente 35 kb corriente abajo de *SOST* es responsable del fenotipo más leve de esta enfermedad (165,171,172).

- c. Aquellos en los que se altera el equilibrio entre la formación y la resorción óseas. Un trastorno que pertenece a este grupo es la displasia hematodifisaria de Ghosal (OMIM 231095), un síndrome autosómico recesivo poco frecuente que se caracteriza por un aumento de la densidad ósea con afectación predominante de la diáfisis y anemia regenerativa sensible a los corticosteroides. Este trastorno se ha asociado a la pérdida de función del gen *TBXAS1*, el cual regula la expresión de *RANKL* y *OPG*, asociadas con este trastorno (165,173,174).

Además de los trastornos que implican alta masa ósea, se considera también la existencia de un fenotipo HBM no patológico. Los estudios epidemiológicos sobre la HBM son escasos y los umbrales de definición son variables. De hecho, la ausencia de un límite superior para definir la DMO «normal» conlleva el riesgo de que las personas con una causa patológica de DMO elevada pasen desapercibidas y sean etiquetadas como «normales» (175,176). Dada esta variabilidad en los umbrales, para efectos de esta tesis doctoral hemos usado la definición de Little et al. 2002 (177), en la que se define la HBM por la obtención de un valor superior a 4 en la suma de los *Z-scores* de la zona lumbar (LS, *lumbar spine*) y del cuello del fémur (FN, *femoral neck*). Aunque el cálculo de la prevalencia del rasgo supone un reto, se ha estimado en un 0.2-1% (178,179).

En cuanto a la causa genética, el fenotipo HBM puede ser monogénico o poligénico. Entre los HBM monogénicos destacan las mutaciones de ganancia de función (GoF) en los co-receptores de la vía Wnt/ β -catenina LRP5 y LRP6. Estas mutaciones producen una pérdida de afinidad por los inhibidores extracelulares DKK1 y esclerostina, impidiendo así la internalización de LRP5/6. Además de las mutaciones en genes canónicos de la vía Wnt/ β -catenina, se han encontrado otras mutaciones en otros genes que pueden causar este fenotipo, tales como *SMAD9* cuyas variantes hacen que pierda su función represora sobre la activación del receptor BMP y sobre la cascada de señalización subsecuente, reduciendo la actividad de los osteoblastos; *ANKH* cuyas variantes GoF generan displasia craneometafisaria (OMIM123000); entre otros (ver Figura 10). En cuanto a los HBM

poligénicos, surgen de portadores de alelos protectores de las variantes asociadas a la DMO. En este sentido, se han realizado estudios de asociación de genoma completo (GWAS) en cohortes con DMO extrema que han permitido identificar variantes comunes asociadas al fenotipo (más adelante hablaremos brevemente de estos estudios) (165,180–185).

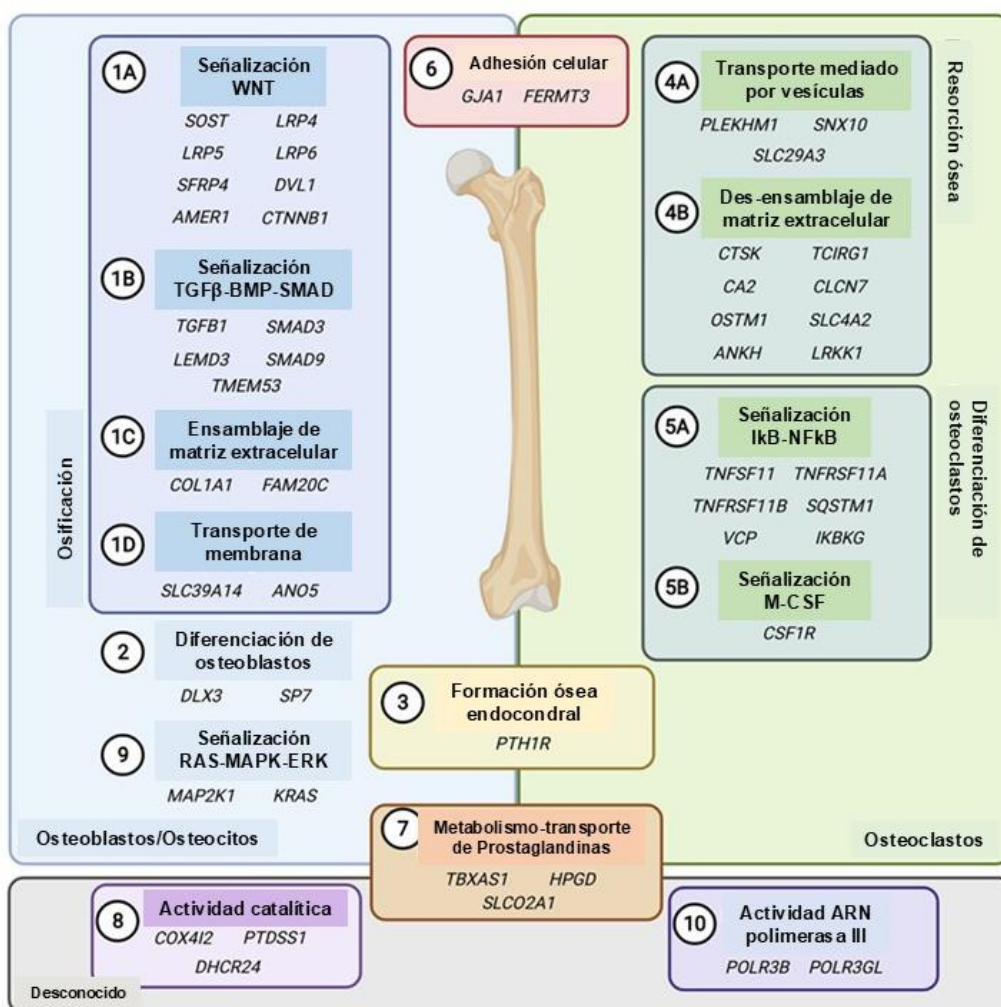


Figura 10. Resumen gráfico de los genes conocidos actualmente que albergan variantes patógenas causantes de HBM. Los genes están clasificados según su función en los principales tipos de células óseas (o la ausencia de ella). Además, aparecen subdivididos por el proceso biológico y/o vía de señalización asociada, dando como resultado 10 grupos de genes HBM (numerados). HBM = *High bone mass*. Tomada y adaptada de (181).

2.7 Otras patologías que tienen afectaciones óseas: La enfermedad de Gaucher

Dentro del espectro de trastornos esqueléticos, también podemos encontrar patologías que, sin estar incluidas dentro de la última edición de la Nosología y Clasificación de los trastornos genéticos del esqueleto (54), presentan afectaciones óseas como parte del cuadro clínico de la enfermedad. Tal es el caso de la enfermedad de Gaucher (EG), clasificada como una enfermedad de depósito lisosomal (LSD), dentro del grupo de las esfingolipidoses (186).

2.7.1 Definición y clasificación de la enfermedad de Gaucher

La EG es una glicosfingolipidosis y es la LSD con más incidencia. Está causada por mutaciones en el gen *GBA1* que codifica para la enzima glucocerebrosidasa o β -glucosidasa ácida (GBA1 o GCase); tales mutaciones generan pérdida de función de la enzima, lo que conlleva a una acumulación progresiva del sustrato glucosilceramida (GlcCer) en los lisosomas de los macrófagos (formando las llamadas células Gaucher). Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad son hepatoesplenomegalia, anemia, problemas óseos y en algunos casos afectación neuronopática (187).

La incidencia de la EG es de 1 caso por cada 40.000-60.000 nacidos vivos en la población general; sin embargo, puede darse en 1-800 nacimientos dentro de la población Judía Ashkenazí (188). Para los Judíos Ashkenazíes, la EG no sería una patología rara; sin embargo, los datos epidemiológicos de esta enfermedad en una etnia pueden no ser representativos de otras etnias. Un metaanálisis realizado por Wanh Meimei en 2023 informó de una prevalencia mundial de la EG de 1.5 casos por cada 100.000 nacidos vivos (189). En España hay alrededor de 500 casos diagnosticados (0.001% de la población) y se calcula que se producen aproximadamente 20 nuevos casos por año. En la Península Ibérica la mutación N370S (p.N409S según la nomenclatura de la *Human Genome Variation Society* (HGVS)) es la más prevalente, con una frecuencia del 46.3% en población española

y del 63% en población portuguesa. La segunda mutación más frecuente es la L444P (p.L483P según la HGVS) (18.5 y 25.7%, respectivamente) (190–192).

Los síntomas asociados con la EG se deben a la acumulación progresiva de células Gaucher en diversos órganos (Figura 11). Por lo tanto, la EG es un trastorno multisistémico que se manifiesta a cualquier edad, dependiendo del subtipo de la enfermedad. Se pueden distinguir tres formas clínicas básicas de la EG, dependiendo del grado de afectación neurológica; sin embargo, hoy en día se considera que las diferentes formas de la EG reflejan más bien un continuo que va desde la aparición temprana hasta la aparición tardía de la enfermedad y desde las formas graves con síntomas neurológicos hasta las formas leves con manifestaciones exclusivamente viscerales (187). La EG-1 (OMIM 230800) es la forma más frecuente y representa el 94 % de todos los casos. Es una forma no neuronopática presentando un desarrollo crónico. Los órganos que se ven afectados con mayor frecuencia son el bazo, el hígado, la médula ósea y los huesos y, en casos graves, también los pulmones y los riñones. La hepatoesplenomegalia y las complicaciones hematológicas, como la anemia y la trombocitopenia con hemorragias, son frecuentes en la EG-1 no tratada (193).

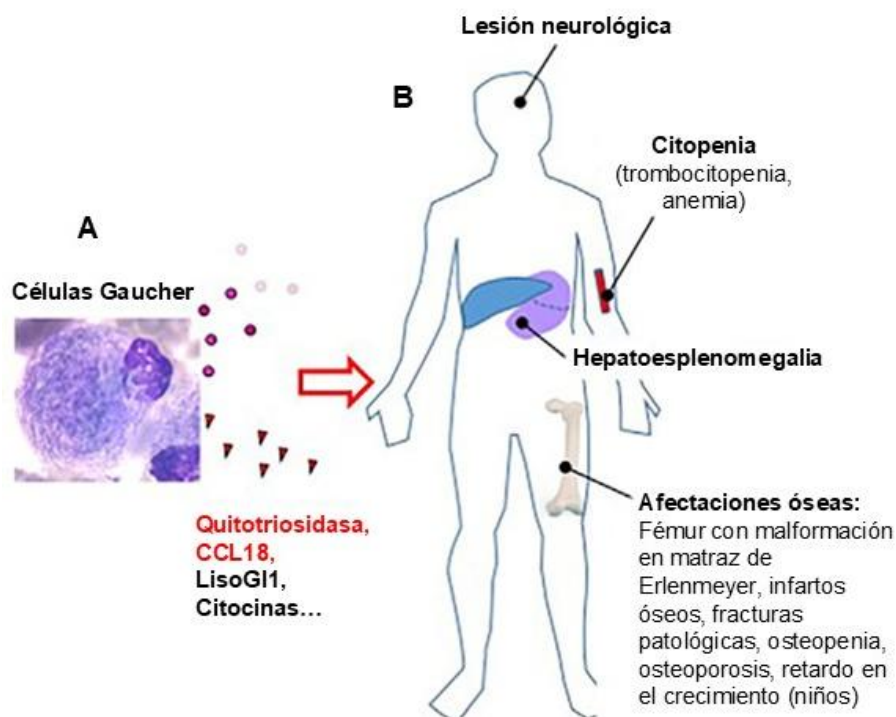


Figura 11. Esquema de la fisiopatología de la EG. A. El aumento de glucosilceramida se organiza en estructuras fibrilares que se acumulan principalmente en los macrófagos de tipo 2. Estas células tienen un aspecto citoplasmático específico similar al «papel arrugado» y se denominan células de Gaucher, produciendo moléculas como quitotriosidasas. B. Las células de Gaucher se infiltran en la médula ósea, el bazo y el hígado y se considera que son las principales responsables de las características clínicas de la enfermedad de Gaucher. CCL18 (C-C motif chemokine ligand 18), Liso-Gb1 (glucosilesfingosina). Tomada y adaptada de (193).

La EG neuronopática aguda (EG-2) (OMIM 230900) se manifiesta en la primera infancia, el deterioro neurológico progresa rápidamente y la muerte suele producirse antes de los 2 años de edad. La EG neuronopática subaguda (EG-3) (OMIM 231000) presenta una afectación neurológica más lenta y suele aparecer en la adolescencia (187,194,195). La tabla 4 detalla un poco más estos tres subtipos de la EG.

Tabla 4. Clasificación de la EG

<i>Tipos</i>	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
<i>Prevalencia</i>	90-95%	<5%	<5%
<i>Edad de presentación</i>	Infancia/Adultez	Primeros años de vida	Infancia
<i>Expectativa de supervivencia (años)</i>	Edades de 6-80	Edades de 2-3	Edades 30-40
<i>Presentación clínica</i>	El tipo 1 es variable, y puede ir desde formas asintomáticas durante toda la vida hasta formas de aparición temprana en la infancia. La presentación clínica incluye lo siguiente: Fatiga; retardo en el crecimiento y en el inicio de la pubertad; hepatoesplenomegalia; hemorragia mucocutánea; hematomas espontáneos; anemia;	El tipo 2 se caracteriza por varios deterioros neurológicos tempranos y agudos que comienzan en bebés de 3 a 6 meses de edad. La presentación clínica incluye lo siguiente: retardo en el crecimiento; hidropesía fetal; ictiosis congénita; hepatoesplenomegalia; dolor óseo; opistótonos, trastornos graves de la deglución; parálisis oculomotora	El tipo 3 es similar al tipo 2, pero con una presentación clínica más lenta (crónica). La presentación clínica incluye lo siguiente: retardo en el crecimiento; estrabismo, parálisis de la mirada; demencia progresiva; mioclonía; opacidad corneal; convulsiones

crisis de dolor óseo en
pelvis y en miembros
inferiores; deformidad
ósea de Erlenmeyer;
fibrosis pulmonar;
proteinuria y hematuria

Tomada y adaptada de (196)

El diagnóstico de la EG es complejo e incluye pruebas bioquímicas para analizar biomarcadores en sangre tales como la quitotriosidasa, pruebas moleculares para detectar mutaciones en el gen *GBA1*, biopsias de los órganos afectados y determinación de la actividad enzimática GBA1. El tratamiento de esta patología tiene también varias aproximaciones: la terapia de reemplazo enzimático, la terapia de reducción de sustrato, la terapia con chaperonas farmacológicas, la terapia génica, el trasplante de médula ósea, la esplenectomía, entre otros (196).

2.7.2 El gen *GBA1* y la enzima glucocerebrosidasa o proteína GBA1

El gen *GBA1* (OMIM 606463) está localizado en el cromosoma 1 (q21-31) (197). Se expande en una longitud de 7.6 kb y está compuesto por 11 exones y 10 intrones. A 16 kb del extremo 3' existe una estructura de 5.7 kb que se corresponde con el pseudogén (*psGBA1*) con una organización de exones e intrones idéntica al gen funcional y con una homología exónica del 96% (190). El pseudogén difiere del gen funcional, en cuanto a tamaño, debido a que posee varias delecciones correspondientes a secuencias de elementos Alu del gen *GBA1*. Además, contiene múltiples mutaciones puntuales, localizadas tanto en exones como en intrones (198,199). La presencia de este pseudogén aumenta la ocurrencia de reordenamientos cromosómicos en esta región, lo que hace difícil la identificación y caracterización de las mutaciones causales de EG en el gen estructural. La región cromosómica donde se localiza el gen *GBA1* es una zona muy rica en genes funcionales, encontrándose genes como *CLK2* que codifica para una quinasa involucrada en la regulación de la longitud del telómero, o el gen *ENTREP3* (del inglés *endosomal transmembrane epsin interactor 3*) también conocido como *FAM189B*, que está implicado en la apoptosis y supresión de tumores (190).

La longitud del ADN codificante del gen *GBA1* es de aproximadamente 2kb y contiene dos codones ATG que están en pauta de lectura, situados en los exones 1 y 2. Ambos codones sirven como inicios de la traducción, produciéndose dos polipéptidos con péptidos señal de distinto tamaño. La proteína surgida a partir del primer ATG (NP_000148), ubicado al final del primer exón, contiene un péptido señal de 39 residuos con la mitad amino-terminal hidrofílica. En cambio, la proteína que se genera a partir del segundo ATG, localizado cascada abajo del primero, en la mitad del segundo exón, da lugar a un péptido señal hidrofóbico de 19 residuos. En general, se produce hasta dos y tres veces más cantidad de proteína con inicio en el primer ATG que en el segundo (200). Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 794 variantes del gen *GBA1* siendo las más comunes las variantes p.N409S y p.L483P, comentadas anteriormente. No todas estas variantes están relacionadas con la EG, también hay variantes en el gen *GBA1* asociadas con la enfermedad de Parkinson (201).

La hidrolasa lisosomal *GBA1* necesita el péptido señal (de 19 o 39 aminoácidos) para el transporte a través de la membrana del retículo endoplasmático rugoso, para pasar al aparato de Golgi y finalmente al lisosoma. Como fruto de una modificación postraducciona se genera un clivaje proteolítico y el péptido señal es liberado. La proteína madura tiene 497 aminoácidos con un peso molecular de 56kDa, aunque el peso molecular de la forma glicosilada es de 65kDa (202).

La proteína plegada tiene tres dominios, tal y como se muestra en la figura 12 A, con los colores magenta, verde y azul. El dominio I va desde el residuo 1 al 27 y desde el residuo 383 al 414, y se encuentra estructurado en tres láminas β . Contiene dos puentes disulfuro y el primer sitio de N-glicosilación (N19). El dominio II está comprendido entre los residuos 30-75 y 431-497 y se estructura en dos láminas β estrechamente asociadas. El dominio III va desde el residuo 63 al 381 y del 416 al 430, contiene el sitio catalítico y se estructura en 8 α -hélices, 8 láminas β y tres cisteínas libres (Cys 126, 248 y 342). La proteína tiene 4 lugares de N-glicosilación N19, N59, N146 y N270 que corresponden a los residuos p.Asn58, p.Asn98,

p.Asn185 y p.Asn309, respectivamente. Los residuos catalíticos son E235 y E340 que corresponden a los aminoácidos p.Glu274 y p.Glu379 y a los cuales se une la molécula de glucocerebrósido (202–204).

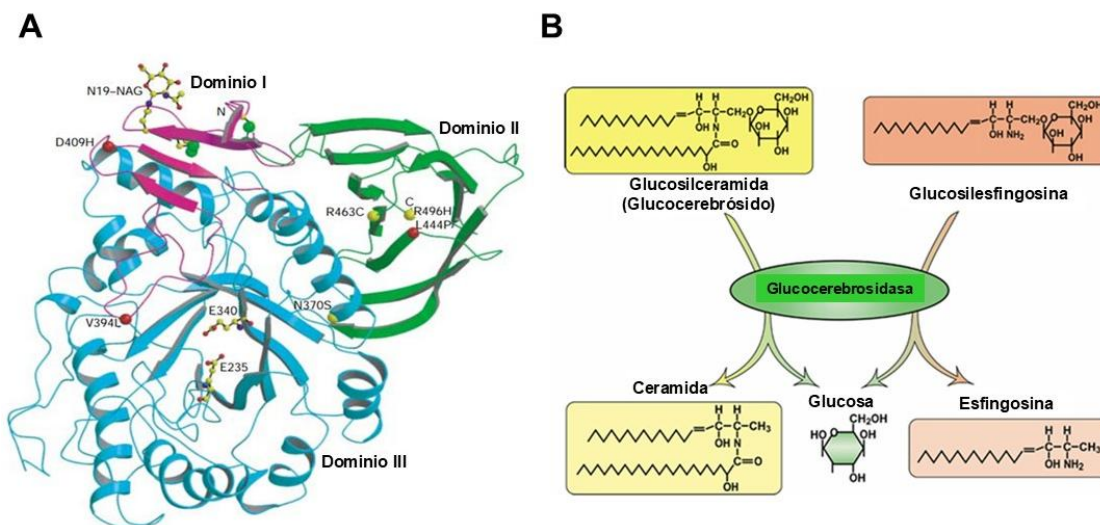


Figura 12. A. Estructura refinada de rayos X de la β -glucosidasa ácida. El dominio I se muestra en magenta y contiene los dos puentes disulfuro, cuyos átomos de azufre se muestran como bolas verdes. El sitio de glicosilación en N19 se muestra como un modelo estructural de bolas. El dominio II, que es un dominio similar a la inmunoglobulina, se muestra en verde. El dominio catalítico (dominio III) se muestra en azul, y los residuos del sitio activo E235 y E340 se muestran como modelos de bolas. Las seis mutaciones más comunes de la β glucosidasa ácida (GCCase) se muestran como bolas; las que causan predisposición a la enfermedad grave (tipos 2 y 3) y leve (tipo 1) se muestran en rojo y amarillo, respectivamente. Tomada y adaptada de (202). B. La glucocerebrosidasa es una β -glucosidasa que hidroliza su sustrato principal, la glucocerebrosidasa, en glucosa y ceramida. Un sustrato alternativo, la glucosil esfingosina, también se degrada en glucosa y esfingosina. Tomada y adaptada de (205).

La β -glucocerebrosidasa es una enzima con actividad glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45) que escinde, por hidrólisis, el enlace β -glicosídico de la glucosilceramida (glucocerebrósido) generando ceramida y glucosa. También se ha demostrado que esta enzima puede catalizar la hidrólisis de la glucoesfingosina, para formar glucosa y esfingosina (Figura 12 B). Al igual que otras glicosidasas hidrolasas, el mecanismo de hidrólisis del glucocerebrósido por la β -glucocerebrosidasa implica la catálisis

ácido-base por dos residuos de ácido glutámico (E340 y E235) y se desarrolla mediante un mecanismo de dos pasos. En la primera etapa, E340 realiza un ataque nucleófilo al carbono del enlace O-glicosídico para desplazar el resto de esfingosina, que es protonado simultáneamente por E235 al liberarse del sitio activo. En la segunda etapa, la glucosa se hidroliza a partir del residuo E340 para regenerar la enzima activa (205).

2.7.3 Manifestaciones óseas en la enfermedad de Gaucher

Las afecciones musculoesqueléticas están presentes mayormente en la EG1, aunque también pueden presentarse en la EG tipo 3. Se ha descrito que hasta un 90% de los pacientes Gaucher presentan algún tipo de sintomatología ósea que incluye un variado conjunto de manifestaciones clínicas, tales como la infiltración de la médula ósea por células de Gaucher, la oclusión microvascular en el hueso, el infarto óseo, la osteonecrosis avascular recurrente, el adelgazamiento cortical y la alteración de la remodelación ósea, afectaciones que conducen a lesiones osteolíticas y a la pérdida de DMO (196,206). En la tabla 5 se resumen las principales afectaciones óseas presentes en la EG.

La fisiopatología ósea de la EG1 no está totalmente clara, aunque muchas de las manifestaciones óseas comentadas se pueden explicar por un desequilibrio en el remodelado óseo (207). Por esta razón, los biomarcadores de actividad osteoblástica y osteoclástica han ayudado a dilucidar mecanismos que puedan estar implicados en las afectaciones óseas de la EG1 (208). En un estudio de casos y controles bien realizado con niños y adolescentes con EG1 no tratada, las concentraciones séricas de OCN y de CTX fueron inferiores a las de los controles y tan bajas durante la infancia y la adolescencia como en la edad adulta (209). Otros biomarcadores en los cuales se ha visto utilidad son la glucosilesfingosina sérica (ya que se ha demostrado que media la disfunción osteoblástica en la EG) y la CTSK (210–212).

Tabla 5. Principales afectaciones óseas en la EG

Manifestación clínica / Categoría*	Descripción	Referencias
Deformidad en matraz Erlenmeyer / Defectos en el modelado y remodelado del hueso trabecular y cortical	Anomalía que comienza antes de la pubertad. El aspecto similar a un matraz se debe al agrandamiento de la zona metafisaria y la consiguiente ausencia de la típica curva cóncava dimetafisaria. Se puede observar en muchos de los huesos tubulares o largos del esqueleto, ocasionalmente incluso en las falanges, pero no afecta a los huesos que se forman en las membranas. Es el resultado de la alteración del remodelado óseo.	(211,213)
Osteopenia y osteoporosis / Defectos en el modelado y remodelado del hueso trabecular y cortical	Caracterizada por la disminución de la DMO y el consecuente aumento del riesgo de fracturas	(211,214,215)
Lesiones osteolíticas / Defectos en el modelado y remodelado del hueso trabecular y cortical	Perforaciones óseas generadas a causa de la destrucción del hueso, probablemente debido a la liberación de CTSK por osteoclastos activados	(211,216)
Infarto óseo, crisis óseas y osteomielitis / Infarto óseo medular y cortical	Los infartos óseos se pueden producir por la alteración de la vascularización, la infiltración de las células Gaucher en la médula ósea y los posibles procesos inflamatorios adicionales, que pueden desencadenar en una osteomielitis aséptica	(187)
Osteonecrosis / Infarto óseo medular y cortical	Se cree que es una consecuencia secundaria a la isquemia que provoca el infarto óseo crónico	(211,217)
Osteosclerosis / Infarto óseo medular y cortical	Puede ocurrir a causa de un remodelado incorrecto después del infarto óseo, con engrosamiento del hueso, aumento de su densidad y posible disminución del espacio medular	(187,211)

*Esta categorización ha sido sugerida por Hughes y colaboradores (2019) (211).

Esta alteración de la remodelación ósea en la EG1 puede dar lugar a que no se alcance una masa ósea máxima equivalente a la de las personas sanas. Por ello, la determinación de la DMO mediante DXA en pacientes con EG1 puede ayudar, por ejemplo, a estimar el riesgo de fractura y a diagnosticar posibles complicaciones óseas como la osteoporosis. Un análisis de los datos del Registro Gaucher del *International Collaborative Gaucher Group* ha demostrado que una DMO baja de LS se asocia con un alto riesgo de fractura de columna o fémur en pacientes con EG1. Estos datos también indican que el 55 % de todos los pacientes registrados padecen osteopenia de acuerdo con la DMO que presentan (218). Aunque se ha considerado que el análisis de la DMO mediante DXA puede ser complicado en pacientes con EG1, debido a cambios anatómicos focales y alteraciones óseas focales asociadas con esta enfermedad (219), se ha logrado determinar que un $Z\text{-score} \leq -1$ en pacientes con EG1, aumenta el riesgo de fractura por fragilidad (traumatismo leve) en un factor de 5, lo que supone una estimación significativamente mayor que la que se asocia habitualmente a las fracturas osteoporóticas en los estudios poblacionales (220,221). Una DMO inferior al rango esperado para la edad cronológica ($Z\text{-score} < -2,0$) se produce de forma temprana en pacientes con EG1 y puede hacerse evidente a los 5 años de edad. Por otro lado, en adultos con EG1, la $Z\text{-score}$ media de la DMO lumbar es de aproximadamente -1,0, pero con una amplia distribución (215).

3. Identificación de genes relacionados con patologías óseas

A lo largo de los años, se han identificado muchos genes que causan o contribuyen al fenotipo de diferentes trastornos esqueléticos. Las enfermedades monogénicas suelen estar causadas por mutaciones raras con un efecto grande. Por otro lado, las enfermedades complejas suelen estar causadas por el efecto aditivo de numerosas variantes con efectos muy pequeños y que son frecuentes en la población general. Sin embargo, las variantes raras con efectos más importantes también pueden contribuir al desarrollo de enfermedades complejas. En esta sección vamos a comentar brevemente dos de los principales enfoques para la

identificación de las bases genéticas de los trastornos óseos: en primer lugar, abordaremos los estudios de secuenciación dirigida y, en segundo lugar, comentaremos los estudios de asociación del genoma completo (GWAS).

3.1 Estudios de secuenciación dirigida

3.1.1 Secuenciación completa del exoma (WES)

El exoma es la parte del genoma compuesta por todos los exones, que incluyen regiones no traducidas del ARNm (UTR) y la secuencia codificante de los genes. El exoma humano consta de aproximadamente 20.000 genes y constituye solo el 1 % del genoma completo. Sin embargo, el 85 % de las enfermedades monogénicas descritas están causadas por mutaciones en el exoma (222). Por esta razón, resulta muy útil esta aproximación para el estudio de las bases genéticas de desórdenes esqueléticos. WES es una técnica de secuenciación de alto rendimiento que se centra en secuenciar las regiones exónicas del genoma. En esta, primero se extrae el ADN de las células de interés, seguido de la captura selectiva de regiones exónicas utilizando técnicas de hibridación, tales como sondas complementarias a secuencias exónicas conocidas. Una vez aislado el ADN exónico, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento generan millones de lecturas cortas de ADN, que luego se alinean con un genoma de referencia. Tras la secuenciación, los datos se analizan para identificar variantes, como cambios de un solo nucleótido (SNV), inserciones, deleciones y otras alteraciones genómicas que podrían ser significativas en un contexto patológico determinado (Figura 13) (223,224).

En la secuenciación de nueva generación (NGS) usada en los WES, se secuencia un gran número de fragmentos de ADN hasta que se cubra todo el exoma. Cada base del exoma puede estar representada en cientos de fragmentos diferentes; por lo tanto, al secuenciar millones de fragmentos, cada posición del exoma se secuencia docenas de veces. El número de veces que se secuencia una base (o exón) se denomina cobertura. Una cobertura alta mejora la precisión en la identificación de variantes y limita la detección de falsos positivos en el análisis. Las variantes se identifican como diferencias de secuencia en la muestra en comparación con una secuencia de referencia, y se calcula una puntuación de

confianza para cada mutación (en parte sobre la base de la cobertura de la secuencia). Finalmente, cada mutación se anota con información relevante (frecuencia poblacional, ubicación en el gen, el tipo de variante que es y el cambio específico de aminoácidos y su posición en la proteína) (225).

El objetivo del WES es identificar genes candidatos que puedan relacionarse causalmente con las patologías observadas en los pacientes. Existen múltiples estrategias para identificar genes candidatos causantes de enfermedades a partir de los datos de WES, dependiendo de si el objetivo es analizar una enfermedad rara en pacientes no emparentados, una enfermedad hereditaria en una familia, una enfermedad causada por una mutación *de novo* (nueva) o una enfermedad somática que se produce solo en una parte del cuerpo de un paciente.

En el caso de enfermedades muy raras, el WES de unos pocos pacientes no emparentados puede ser suficiente para identificar el(los) gen(es) responsable(s) de la enfermedad. La aplicación de varios filtros en los análisis (tales como una $MAF < 1$), así como la comparación con los resultados WES de pacientes adicionales con la misma enfermedad y de controles sanos, puede ayudar a reducir el número de genes candidatos. Por otra parte, las enfermedades genéticamente heterogéneas (en las cuales variantes en múltiples genes pueden causar el mismo trastorno) pueden abordarse mediante estudios WES de familias. Así, la identificación de genes candidatos causantes de una patología puede hacerse mediante el análisis WES de los miembros afectados de una familia, partiendo de la hipótesis de que han heredado la(s) misma(s) variante(s) causante(s) de la enfermedad de un antepasado común. Los estudios de familia también pueden ayudar a identificar variantes *de novo* comparando los resultados WES de padres no afectados con los de hijos afectados, por ejemplo (225).

En el campo del hueso, esta técnica ha sido muy útil para el estudio de patologías (226). Por ejemplo, Shamriz y colaboradores utilizaron con éxito la secuenciación WES en seis pacientes con osteopetrosis infantil maligna (MIOP), identificando variantes en cuatro genes relacionados con esta patología: *CLCN7* (una variante en homocigosis), *TCIRG1* (dos variantes, una en heterocigosis y la otra en

homocigosis), *SNX10* (una variante en homocigosis) y *TNFRSF11A* (una variante en homocigosis) (227). Con todo, algunas veces el WES no es conclusivo y pueden encontrarse variantes en diversos genes sin la posibilidad de identificar cuál o cuáles de ellos son los responsables de la patología en cuestión. Tal es el caso, por ejemplo, de un estudio de WES que hicimos en nuestro grupo de investigación para un caso familiar de displasia ósea esclerosante caracterizada por HBM y lesiones óseas lucentes, en el que logramos identificar mutaciones en genes implicados en la regulación de la transcripción homeobox, las funciones osteoblásticas y osteoclásticas, y en la vía de señalización Wnt de formación ósea, tales como *TBX18*, *SEMA4D*, *PTCH1*, *ADGRE5* y *PTK7* (228), sin que pudiésemos concluir cuáles de ellos eran los causantes del trastorno estudiado. Frente a esto último, los estudios funcionales para validar las variantes genéticas identificadas, es un complemento necesario para tener resultados concluyentes.

3.1.2 Estudios mediante panel de genes

Los paneles de secuenciación dirigida (TS) se centran en un grupo concreto de regiones genómicas y tienen menos carga de datos en cuanto al nivel de bioinformática o demanda computacional, lo cual simplifica la interpretación de los datos con una excelente profundidad de cobertura (229–233). El proceso de secuenciación de regiones específicas incluye el diseño de conjuntos específicos de sondas/cebadores para enriquecer las regiones de interés utilizando métodos de hibridación o amplificación. La captura por hibridación utiliza sondas de oligonucleótidos biotinilados para capturar las regiones de interés, mientras que la amplificación utiliza PCR para el enriquecimiento de las regiones objetivo (Figura 13). Los paneles TS se centran entonces en un número seleccionado de genes de interés para la investigación, el diagnóstico, el pronóstico y la supervisión del tratamiento de patologías humanas (233).

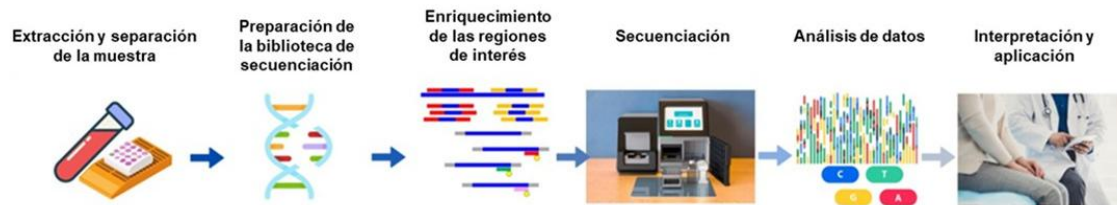


Figura 13. Diagrama de los pasos generales que se hacen en un experimento de NGS con captura por hibridación. En primer lugar, se realiza la extracción y el aislamiento de ácidos nucleicos en muestras de diferentes tipos (sangre, células, tejidos). A continuación, se prepara la biblioteca, que incluye la fragmentación, la reparación de extremos y la adición de adaptadores a los fragmentos de ácidos nucleicos. El enriquecimiento de la región de interés es fundamental al realizar la secuenciación dirigida para enriquecer los genes de diana. Para la secuenciación, la elección correcta de la plataforma, así como el número de muestras por ciclo, la longitud de lectura deseada, el nivel de cobertura del ensayo y el uso de lecturas *paired-end* o simples, son factores críticos que influyen los resultados. Por último, se aplican métodos de análisis bioinformático que incluyen el alineamiento, la identificación de variantes y los análisis terciarios, para su posterior interpretación y aplicación. Tomada y adaptada de (233).

En la investigación de fenotipos óseos, los paneles TS han sido muy usados, sobre todo para la identificación de variantes genéticas raras relacionadas con trastornos esqueléticos (234). Un ejemplo de ellos es el trabajo realizado por Harrington y colaboradores en 2021, quienes utilizaron un panel de genes asociados con OI y con el metabolismo óseo, en una cohorte de 87 niños con un alto índice de fracturas de huesos largos y vertebrales, encontrando variantes patogénicas en los genes *COL1A1* o *COL1A2* en el 69% de los niños que presentaban características extraesqueléticas de OI. Además, en niños sin características extraesqueléticas, 14 de 70 (20%) presentaron variantes patogénicas, de las cuales 7 eran variantes en *COL1A1*, y las 7 variantes restantes en genes relacionados con la función o la señalización osteoblástica (*PLS3*, *SP7*, *LRP5*, *WNT1*) (235). En otro estudio realizado por Zhao y colaboradores en 2023, haciendo uso de un panel TS, en una muestra de tres pacientes adultos con fenotipo HBM y/o con engrosamiento óseo. En este estudio, los tres casos presentaron nuevas mutaciones *missense* en el gen *LRP5*: una mutación en el exón 3 (c.586 T > G, p.Trp196Gly) del primer paciente y

una mutación en el exón 20 (c.4240C > A, p.Arg1414Ser) de los otros dos pacientes. El panel TS incluyó 14 genes conocidos asociados a OI y 708 genes más relacionados con otros trastornos óseos, como el raquitismo congénito, enfermedades del cartílago y la osteosclerosis, comprendiendo un total de 9712 exones (236). Estos y otros trabajos realizados en el campo del hueso (237–239) respaldan la utilidad de las aproximaciones usando paneles TS para ampliar la comprensión que tenemos acerca de los trastornos esqueléticos.

3.2 Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)

Los estudios de asociación han sido una herramienta poderosa para identificar genes implicados en enfermedades complejas. Tales estudios consisten en establecer una asociación entre la frecuencia genética o alélica de una variante y el fenotipo estudiado. Estos se distinguen en función de si el fenotipo estudiado es categórico (como la fractura, por ejemplo) o cuantitativo (como la DMO). En el primer tipo, se lleva a cabo un estudio de asociación de casos y controles, en el que se comparan las frecuencias genotípicas o alélicas de una variante entre los dos grupos. En el caso de los rasgos cuantitativos, se utilizan modelos de regresión lineal o mixta. En los estudios de asociación, el tamaño de la muestra, la estandarización del fenotipado y el genotipado, y la población elegida son factores muy importantes (240).

Dentro de los estudios de asociación, destacan los estudios del genoma completo o GWAS. Los GWAS permiten buscar variantes genéticas comunes, conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que están asociadas con rasgos complejos como la DMO y el riesgo de fractura (241,242). Debido al número de pruebas estadísticas y correcciones realizadas en estos estudios, y al pequeño efecto de cada variante en enfermedades complejas, se necesitan cohortes muy grandes para obtener resultados significativos. Esto se ha conseguido con los meta-análisis GWAS, en los que se reúnen diferentes estudios con el objetivo de aumentar el tamaño de la muestra. El aumento de la potencia estadística permite estimar el efecto de las variantes genéticas individuales con mayor precisión. Sin embargo, las muestras grandes no necesariamente dan lugar a más variantes

asociadas, ya que cuando se aumenta el tamaño de la muestra, también aumenta la heterogeneidad de la misma, lo que da lugar a la pérdida de asociaciones específicas de la población (243).

En el campo de la DMO y la osteoporosis, por ejemplo, se han realizado más de 50 GWAS y meta-análisis, identificando más de 500 genes asociados con diferentes fenotipos óseos. El primer estudio GWAS que utilizó diferentes parámetros óseos como fenotipos (a saber, FN-DMO (DMO del cuello femoral), LS-DMO (DMO de columna), TR-DMO (DMO trocantérica)), y riesgo de fractura, se publicó en 2007 (244). En este estudio, se genotiparon alrededor de 71.000 SNP autosómicos en 1.141 individuos y, aunque se encontró cierta significación nominal, ninguno superó las correcciones de pruebas múltiples. Al año siguiente, dos estudios simultáneos identificaron genes como *TNFRSF11B*, *LRP5*, *ESR1*, *RANKL*, *ZBTB40*, con variantes asociadas a una significación genómica ($p < 5 \times 10^{-8}$) para la DMO (245,246). El primer meta-análisis importante fue publicado en 2009 por el consorcio GEFOS (GEnetic Factors for OSteoporosis) e incluyó 19.195 muestras e identificó 13 nuevos *loci* asociados con DMO (247).

A pesar de todos estos enfoques, muchos genes que se han asociado experimentalmente con hueso no han mostrado significación genómica en estudios con seres humanos. Esto indica que la técnica aún debe perfeccionarse, incluyendo una mejora en los métodos de adquisición de datos, en la homogeneidad de las cohortes y teniendo en cuenta las variantes raras. El quinto artículo relacionado con esta tesis doctoral (ver anexos), que además nos ha servido como trabajo previo para la selección de los genes estudiados en el primer capítulo, permite tener una visión más detallada de los GWAS, así como de los meta-análisis que se han realizado en el campo del hueso.

Como lo hemos dicho, dado que los GWAS solo incluyen variantes comunes, las variantes raras están poco cubiertas. Las tecnologías de secuenciación de última generación pueden ser útiles para identificar estas variantes raras. Con todo, para disponer de la potencia estadística suficiente para identificar estas variantes raras, se requieren estudios con muestras de gran tamaño. La secuenciación del genoma

completo (WGS), es una técnica que se ha usado para estudios que buscan identificar variantes raras, ya que es capaz de generar un conjunto completo de variantes en secuencias de ADN en lugar de basarse en los patrones de desequilibrio de ligamiento para los marcadores (248). Para lograr un buen rendimiento con esta aproximación es necesario hacer WGS a gran escala. El WGS tiene como objetivo evaluar el papel de la variación genética de baja frecuencia (MAF 1-5 %) y rara (MAF 1 %).

En el campo del hueso, el primer trabajo en el que se usó WGS en parte de la cohorte para realizar un estudio de asociación con la DMO fue realizado por Styrkarsdottir y colaboradores en 2013, en una población de 2.200 islandeses con baja DMO (en el resto de la cohorte, es decir, 2.731 individuos con baja DMO y 69.034 controles basados en la población, el análisis se hizo por imputación). En este se identificó una variante rara *nonsense* (c.376C > T) en el gen *LGR4*, asociada a una baja DMO y a un alto riesgo de fracturas (249). Otro estudio que incorporó imputación de datos obtenidos por WGS y WES identificó dos nuevas variantes no codificantes de baja frecuencia asociadas con la DMO cerca de los genes *EN1* y *WNT16* en un total de 53.236 sujetos. En dicho estudio se descubrió que el SNP (2q14.2, rs11692564[T], MAF = 1,7 %) cerca de *EN1* tenía un efecto mayor que las variantes comunes de la DMO de columna lumbar previamente descritas, y también se asoció con un bajo riesgo de fractura (125). Asimismo, el otro SNP de este estudio (rs148771817[T], MAF = 1,1 %), cercano a *WNT16* también mostró una asociación significativa con la DMO (250,251).

Otra alternativa frente a la falta de cobertura de variantes raras que presentan los GWAS, son los métodos estadísticos de agregación de variantes. Las pruebas de agregación agrupan múltiples variantes raras dentro de una región genética (por ejemplo, un gen, un conjunto de genes o *loci* genómicos) para comprobar su asociación. Varios estudios que han utilizado estos métodos han identificado con éxito variantes raras asociadas a rasgos y han permitido comprender mejor el mecanismo subyacente de la enfermedad (252,253). Los métodos de agregación exploran la relación entre un rasgo y numerosas variantes dentro de una región

genómica, lo cual puede mejorar la potencia estadística y, por lo tanto, la interpretabilidad biológica. En este enfoque, numerosas variantes genéticas se combinan dentro de un único puntaje de agregación. Este puntaje de agregación se utiliza posteriormente para las asociaciones de rasgos, en lugar de evaluar cada marcador por separado. En esta aproximación se aplica una prueba estadística univariante a los datos consolidados dentro de una cohorte, lo que aumenta las señales obtenidas y la potencia del estudio. El modelo estadístico general en el que se basan la mayoría de las pruebas de agregación asume que n individuos se han sometido a secuenciación para una región genética concreta (por ejemplo, genes, WES, WGS, vías) que contiene p variantes (254).

Dentro de los métodos estadísticos que existen para las pruebas de agregación de variantes encontramos: el *Burden test*, que agrega variantes en puntuaciones genéticas y tiene mucha potencia cuando una gran proporción de variantes son causales y los efectos van en la misma dirección; los *Burden test* adaptativos, que utilizan ponderaciones o umbrales adaptables a los datos y son más robustos que los *Burden test* permitiendo mejorar la interpretación de resultados; las pruebas de componentes de varianza, que permiten analizar la varianza residual de efectos genéticos y son potentes en estudios de variantes que aumentan el rasgo así como de variantes que lo disminuyen, o de una pequeña fracción de variantes causales; los *Omnibus tests*, que combinan los *Burden test* con las pruebas de componentes de varianza y son más robustos con respecto al porcentaje de variantes causales y la presencia de variantes que aumentan y disminuyen los rasgos; además tienen mayor potencia cuando una proporción muy pequeña de variantes son causales (255,256).

4. Estudios funcionales

Una vez identificada una mutación putativa que causa o contribuye a la enfermedad, es necesario corroborar el hallazgo mediante estudios funcionales. En las enfermedades monogénicas, los estudios funcionales son más sencillos, ya que el efecto de la variante es mayor. Sin embargo, en enfermedades complejas como la osteoporosis, el efecto de una sola variante es menos evidente y se requieren

aproximaciones robustas para dilucidar los mecanismos genéticos que subyacen a ella. En esta última sección abordaremos, de manera general, los estudios funcionales que se realizaron durante el desarrollo de esta tesis.

4.1 Aproximaciones *in silico*

Las herramientas *in silico* nos permiten evaluar el posible efecto de variantes genéticas para predecir su impacto potencial y priorizarlas para su posterior validación funcional. Estas herramientas, así como los recursos en línea disponibles, nos permiten predecir el impacto de las variantes genéticas a nivel de ADN, ARN o proteínas (257,258). Por ejemplo, el repositorio de datos exónicos Exac (*Exome Aggregation Consortium*), ahora extinguido y contenido en el de datos genómicos gnomAD (*Genome Aggregation database*), que cuenta con los datos de numerosos individuos y permiten conocer la frecuencia de variantes raras y calcular el grado de intolerancia genética a las variantes para cada gen (257). O también las diversas herramientas de predicción de patogenicidad, como CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) (259), SIFT (260) o Polyphen-2 (261) (los cuales se basan en información de secuencia o estructura para predecir cambios a nivel proteico y distinguir si el cambio de aminoácidos es neutro o causante de enfermedad), que utilizan aproximaciones de *machine learning* para evaluar la patogenicidad de variantes en regiones codificantes y no codificantes.

Además, existen servidores tales como *Maestro web server* de la Universidad de Salzburgo (<https://pbwww.services.came.sbg.ac.at/maestro/web/maestro/workflow>) para predecir si una variante afecta la estabilidad de la proteína, utilizando los modelos proteicos tridimensionales obtenidos directamente de AlphaFold (262) o de visualizadores como Chimera (263).

Finalmente, para ampliar el abanico de herramientas web que están disponibles para el estudio de enfermedades óseas, la Federación Internacional de Sociedades Musculoesqueléticas (IFMRS) ha creado un portal de conocimiento (MSK-KP) con el objetivo de integrar toda la información disponible sobre enfermedades esqueléticas, incluyendo GWAS y fenotipos óseos en ratones *KO*, para facilitar la priorización de genes con funciones importantes (264).

4.2 Aproximaciones *in vitro*

Los ensayos *in vitro* constituyen una aproximación muy útil para evaluar el papel que las variantes genéticas cumplen en el desarrollo de patologías humanas. En concreto, en el campo de los trastornos musculoesqueléticos, el uso de líneas celulares tales como SaOS-2 (Identificador Cellosaurus (<https://www.cellosaurus.org/index.html>), CVCL_0548. Derivadas del osteosarcoma primario de una niña caucásica de 11 años en 1973; permiten estudiar el linaje osteoblástico); U-2OS (CVCL_0042. Derivadas en 1964 de un sarcoma moderadamente diferenciado de la tibia de una paciente caucásica de 15 años; permiten estudiar el linaje osteoblástico); THP-1 (CVCL_0006. Línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda; permite estudiar el linaje osteoclástico); MG-63 (CVCL_0426. Aisladas del hueso de un paciente caucásico de 14 años con osteosarcoma; permiten estudiar el linaje osteoblástico); ROS 17/2.8 (CVCL_0508. Derivadas de osteosarcoma de rata; permiten estudiar el linaje osteoblástico); RAW 264.7 (CVCL_0493. Aisladas de un tumor de ratón inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson; permiten estudiar el linaje osteoclástico); MC3T3 (CVCL_0D74. Derivadas de la calvaria de ratón; permiten estudiar el linaje osteoblástico); o de cultivos primarios de fibroblastos de pacientes para la generación de iPSC, es muy común ya que permiten dilucidar la función biológica de variantes genéticas raras encontradas mediante predictores *in silico* o en pacientes con patologías esqueléticas a través del uso de NGS. Los estudios *in vitro* comprenden una amplia variedad de experimentos que buscan obtener el modelo celular adecuado que van desde mutagénesis dirigida utilizando plásmidos bacterianos que se transfectan en las células, hasta ediciones genéticas de las mismas células mediante el uso de herramientas como CRISPR/Cas9 (265–271). Los ensayos experimentales se diseñan de forma específica al proceso que se quiere estudiar, analizando, por ejemplo, biomarcadores a través de técnicas como PCR cuantitativa (qPCR), western blot, inmunotinciones, entre otras. Teniendo en cuenta los experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis, presentaremos de forma breve dos

de estas aproximaciones: Ensayo de gen reportero luciferasa y cultivos celulares tratados con medio condicionado.

4.2.1 Genes reporteros: ensayo de luciferasa

Los reporteros genéticos se utilizan como indicadores para estudiar la expresión génica y las cascadas de señalización asociados a ella. Se emplean ampliamente en la investigación farmacéutica y biomédica, así como en biología molecular y bioquímica. Normalmente, (en la forma más simple del sistema) un gen reportero se clona bajo el control de una secuencia reguladora de interés en un vector de expresión que posteriormente se transfecta en las células. Tras la transfección, se analiza la expresión del reportero en las células midiendo directamente la propia proteína reportera o su actividad enzimática (Figura 14). Un buen gen reportero puede identificarse fácilmente y medirse cuantitativamente cuando se expresa (en el organismo o las células de interés). Ejemplos notables son la GFP (*green fluorescent protein*) y el gen de la luciferasa, que utilizan la emisión de luz y permiten una cuantificación directa de la expresión génica. En particular, el gen de la luciferasa codifica la enzima luciferasa (de la luciérnaga *Photinus pyralis*), que genera oxiluciferina, PPi, CO₂ y una señal luminiscente fácil de cuantificar en presencia del sustrato luciferina, O₂ y ATP (272–274).

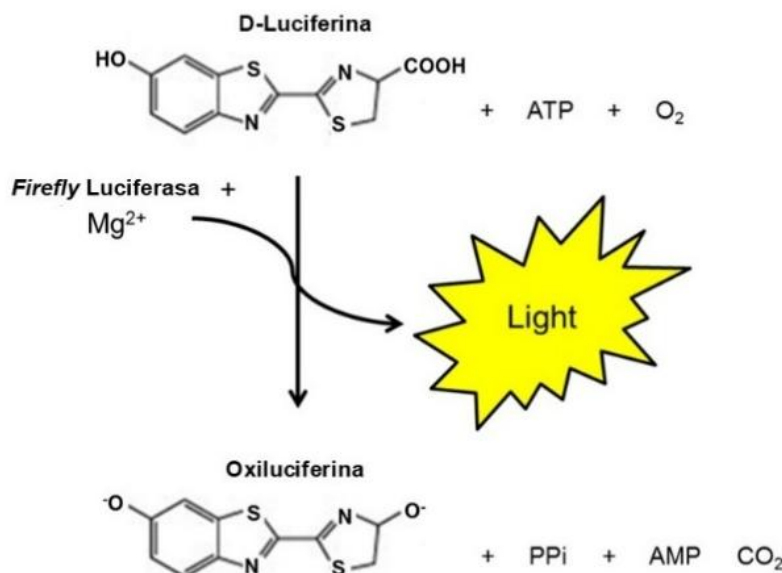


Figura 14. Reacción química llevada a cabo por la enzima luciferasa, en la que se genera luz a partir del reactivo D-luciferina. Tomada y adaptada de (274)

Nuestro grupo de investigación ha hecho validaciones funcionales de variantes genéticas utilizando ensayos de luciferasa. Uno de los trabajos en los que hemos usado este tipo de aproximaciones es el realizado por Martínez-Gil y colaboradores en 2020 en el que, utilizando un ensayo de gen reportero luciferasa, específico para la vía Wnt/ β -catenina, lograron determinar que las variantes p.Ala41Thr, p.Tyr74Phe, p.Arg120Leu y p.Ser157Ile del gen *DKK1* disminuyeron su capacidad inhibitoria en comparación con el gen WT. Estas variantes fueron previamente encontradas asociadas con BMD, en diferentes estudios realizados por otros y por nuestro grupo de investigación (136). Este trabajo demuestra la utilidad de esta técnica para la validación funcional de variantes en genes implicados en funciones reguladoras, así como para la evaluación de variantes en proteínas de una vía que acaba modificando la expresión génica en el núcleo.

4.2.2 Cultivos celulares tratados con medio condicionado

El término “medio condicionado” (CM) se refiere al enriquecimiento de la fase líquida de un entorno de cultivo celular con el secretoma del (otro) tejido cultivado. La composición de este medio se ve afectada por diversos factores del microambiente del cultivo celular, incluida la inhibición del contacto celular, la agregación celular, la capacidad de crecimiento y diferenciación celular y los parámetros físico-químicos (275–277).

El CM se fabrica, envasa, congela y transporta fácilmente (Figura 15). La esterilidad de laboratorio es necesaria en la etapa de producción y aplicación del CM a los cultivos celulares. Además, el CM se produce en condiciones controladas de laboratorio para permitir la inspección de su composición. Asimismo, para producirlo no es necesario esperar a que las células alcancen cierta madurez, ya que el secretoma se empieza a conformar algunas horas después de que las células están en cultivo, haciendo posible, también, obtenerlo varias veces a partir del mismo cultivo celular. Sin embargo, se debe ser muy cuidadoso con el número de pases

de las células evitando su senescencia, así como con las condiciones del cultivo para garantizar que haya homogeneidad en el secretoma (275,276).

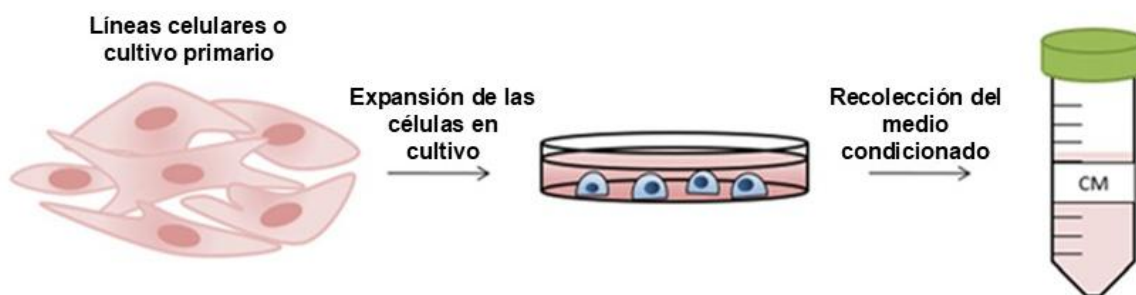


Figura 15. Representación esquemática de la producción y obtención de medio condicionado (CM). El medio colectado se puede criopreservar o utilizar inmediatamente en cultivos celulares o, incluso, en terapias clínicas. Tomada y adaptada de (275)

En el campo del hueso, varios estudios se han llevado a cabo utilizando medio condicionado de condrocitos, osteoclastos, macrófagos y monocitos. En los trabajos realizados por Gómez-Camarillo y colaboradores en 2009 (278) y López-Ruiz y colaboradores en 2013 (279), se utilizó CM de condrocitos desdiferenciados para tratar condrocitos sanos y osteoartríticos en un sistema de cultivo 3D. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que el CM de condrocitos desdiferenciados aumenta la tasa de proliferación y la viabilidad, tanto de los condrocitos sanos como de los osteoartríticos, así como la producción de proteínas de la matriz de los condrocitos osteoartríticos.

Por otro lado, se ha demostrado que el CM de osteoclastos, cuando se cultiva con osteoblastos primarios (280), aumenta la actividad de la ALP y la mineralización, y potencia la diferenciación osteogénica de las MSC (*Mesenchymal stromal cells*) (281). Autores como Matsuoka y colaboradores (2014) y Kreja y colaboradores (2010), observaron que el CM, suplementado con antagonista de C3aR, disminuyó la actividad de la ALP de los osteoblastos (280) y, cuando se suplementó con anticuerpo anti PDGFR, redujo la quimiotaxis de las MSC (281). En otros estudios, se observó que el CM obtenido de macrófagos derivados de la médula ósea (BMM),

de células RAW264.7 y de células monocíticas CD14+, mejoraron la migración de osteoblastos, así como la mineralización y migración de células preosteoblásticas MC3T3-E1. Estos resultados se vieron reforzados por el CM de células previamente estimuladas con RANKL y cultivadas en plástico o en hueso (252,282). Kim y colaboradores en 2012 (282) también observaron que el CM de células RAW264.7, previamente transfectadas con siRNA afamina, reducía la migración de preosteoblastos. Estos estudios demuestran el uso de aproximaciones experimentales que utilizan CM para evaluar funciones biológicas y metabólicas en células óseas (253).

Dado que proteínas como RANKL, SEMA4D, CTSK, entre otras, que cumplen un papel importante en el remodelado óseo, son secretadas al medio extracelular, el uso de CM de cultivos de osteoblastos, osteoclastos u osteocitos resulta muy útil para evaluar, por ejemplo, el efecto que tienen variantes encontradas en estas proteínas sobre el remodelado óseo y, por tanto, su relación con trastornos esqueléticos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Para el desarrollo de esta tesis nos hemos planteado las siguientes hipótesis:

1. Las variantes genéticas raras en genes asociados con varios fenotipos óseos monogénicos, en particular la osteogénesis imperfecta (OI), podrían contribuir al desarrollo de valores extremos de DMO en cohortes poblacionales de mujeres posmenopáusicas (como la cohorte BARCOS).
2. La hipoplasia dérmica focal (FDH), causada principalmente por variantes genéticas en el gen *PORCN*, es probablemente una causa monogénica poco reconocida de LBM debida a una señalización defectuosa de la vía de Wnt.
3. Variantes en *SEM4AD*, *TBX18*, *PTCH1*, *PTK7*, o *ADGRE5* podrían ser las causantes del fenotipo de un caso familiar de displasia ósea esclerosante caracterizado por lesiones óseas lucentes y HBM.
4. El fenotipo óseo de la enfermedad de Gaucher tipo 1 (EG1) puede estar causado por un desbalance en el remodelado óseo, favoreciendo la activación de osteoclastos y, por tanto, la resorción ósea.

Para probar nuestras hipótesis, definimos dos objetivos generales subdivididos en objetivos específicos más pequeños:

Objetivos generales:

1. Analizar las bases genéticas que subyacen a trastornos esqueléticos con baja masa ósea como la osteoporosis posmenopáusica (OP), o casos de displasia esquelética familiar, mediante el uso de técnicas de secuenciación de nueva generación tales como WES y panel de genes por captura dirigida.
2. Estudiar las implicaciones funcionales de variantes genéticas raras asociadas a trastornos esqueléticos con alta masa ósea y de otras patologías con fenotipo óseo como la enfermedad de Gaucher tipo 1 (EG1), mediante ensayos *in vitro* y a través de la generación y caracterización de modelos celulares.

Objetivos específicos:

1. Para desarrollar el objetivo general 1:

- a. Diseñar un panel de genes implicados en OI u otras displasias óseas y llevar a cabo una captura y secuenciación masiva de éstos en una selección truncada de casos de la cohorte BARCOS con valores de DMO extremos.
 - b. Analizar un caso clínico de displasia esquelética no diagnosticada asociada con LBM y múltiples fracturas por fragilidad, a través de secuenciación WES.
2. Para desarrollar el objetivo general 2:
- a. Realizar estudios estructurales y de estabilidad proteica de cinco variantes de cambio de aminoácido en los genes *SEM4AD*, *TBX18*, *PTCH1*, *PTK7*, y *ADGRE5*, priorizadas tras un análisis WES en una familia con displasia ósea esclerosante.
 - b. Validar funcionalmente la variante p.Arg349Gln encontrada en el gen *TBX18*, mediante ensayos de gen reportero luciferasa.
 - c. Validar funcionalmente la variante p.Val212Met encontrada en el gen *SEMA4D*, a través del cultivo de una línea celular osteoblástica tratada con medio condicionado de células HEK que expresan establemente la proteína semaforina wt y mutada.
 - d. Generar y caracterizar un modelo celular osteoblástico y otro osteoclástico de la enfermedad de Gaucher, noqueando el gen *Gba1* mediante el uso de la técnica CRISPR/Cas9.

REPORTE DE LAS SUPERVISORAS DE LA TESIS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO A DOCTOR A LOS ARTÍCULOS INCLUIDOS EN ESTA TESIS DOCTORAL

Título de la tesis: “Aproximaciones genómicas y estudios funcionales de variantes genéticas asociadas con trastornos esqueléticos con baja y alta masa ósea”

Autor: Juan David Patiño-Salazar

Supervisoras: Dra. Raquel Rabionet y Dra. Susanna Balcells Comas

Las personas que firman al final, Raquel Rabionet y Susanna Balcells Comas, en calidad de directoras de la tesis doctoral de Juan David Patiño Salazar titulada “Aproximaciones genómicas y estudios funcionales de variantes genéticas asociadas con trastornos esqueléticos con baja y alta masa ósea” y presentada como un compendio de 4 artículos de investigación, informan por este medio sobre la contribución precisa del candidato en cada publicación.

CAPÍTULO 1: Aproximaciones genómicas para el estudio de variantes genéticas raras relacionadas con trastornos esqueléticos con baja masa ósea.

Artículo 1

Título: Identifying rare variants in genes related to bone phenotypes in a cohort of postmenopausal women

Autores: J. D. Patiño-Salazar, D. Ovejero, M. Gabernet, N. Martínez-Gil, E. Alcaide-Consuegra, L. Mellibovsky, X. Nogués, D. Grinberg, S. Balcells, R. Rabionet, N. Garcia-Giralt.

Revista: Osteoporosis International **Número:** 4 (2025) **Páginas:** 637–644

Índice de calidad: SJR 2024 = 1.466. Cuartil 1 de la categoría Endocrinología, Diabetes y Metabolismo.

Contribución del candidato a doctor: Juan David realizó la mayor parte de los experimentos necesarios para este artículo. Diseñó el panel de genes, después de una amplia revisión de literatura y con la asesoría de los demás miembros del equipo de investigación. Preparó las muestras de ADN y realizó las extracciones de ADN adicionales a partir de muestras de sangre, para completar el número de muestras requerido. Asimismo, participó en el análisis cualitativo de los resultados y en la discusión de los resultados del análisis cuantitativo. Juan David, además, elaboró las tablas y figuras del artículo y la redacción de la primera versión del manuscrito, participando en las revisiones posteriores para llegar a la versión final aceptada.

Artículo 2

Título: Focal dermal hypoplasia: a probable underrecognized low bone mass disorder secondary to aberrant Wnt signaling

Autores: Diana Ovejero, Natalia Garcia-Giralt, Juan David Patiño-Salazar, Raquel Rabionet, Xavier Nogués.

Revista: Osteoporosis International **Número:** 4 (2025) **Páginas:** 555–559

Índice de calidad: SJR 2024 = 1.466. Cuartil 1 de la categoría Endocrinología, Diabetes y Metabolismo.

Contribución del candidato a doctor: en este artículo, que es un reporte de caso liderado por la Dra. Diana Ovejero, miembro de nuestro grupo de investigación, Juan David participó en los análisis *in silico* que se realizaron, así como en la discusión de los resultados y en la edición del manuscrito.

CAPÍTULO 2: Validaciones funcionales de variantes genéticas raras asociadas con un trastorno esquelético con alta masa ósea.

Artículo 3

Título: Functional assessment of rare genetic variants found in a family with skeletal dysplasia and high bone mass

Autores: Juan David Patiño-Salazar, Diana Ovejero, Natalia Garcia-Giralt, María Gabernet, Javier Forte-Martínez, Mónica Cozar, Susanna Balcells, Daniel Grinberg, Luis Pérez-Jurado, Xavier Nogués, Iñigo Etxebarria Foronda, Raquel Rabionet.

Revista: Manuscrito en preparación

Contribución del candidato a doctor: la totalidad de los ensayos experimentales, tanto *in silico* como *in vitro* ha sido realizada por Juan David, con la colaboración de dos estudiantes del máster de Genética y Genómica de la Universidad de Barcelona. Asimismo, el borrador del artículo presentado en esta tesis ha sido elaborado por Juan David.

CAPÍTULO 3: Generación y caracterización de modelos celulares para el estudio del fenotipo óseo de la enfermedad de Gaucher tipo 1 (EG1).

Artículo 4

Título: Generation and characterization of bone cell lines with *Gba1* mutations as cell-intrinsic models of Gaucher's bone disease

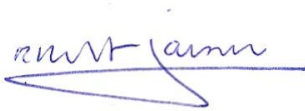
Autores: Juan David Patiño-Salazar, Sara Heredero-Jimenez, Eduardo Martín-Guerrero, Núria Martínez-Gil, Mónica Cozar, Diana Ovejero, Xavier Nogués, Laura Cinque, Juan A Ardura, Arancha R Gortazar, Daniel Grinberg, Susanna Balcells, Natalia Garcia-Giralt, and Raquel Rabionet

Revista: Sometido a Biochemistry and Biophysics Reports

Contribución del candidato a doctor: La generación de los modelos mediante la herramienta de CRISPR/Cas9 fue realizada por Núria Martínez-Gil durante su

estancia en el Instituto TIGEM de Nápoles Italia. Juan David realizó todos los ensayos experimentales de caracterización de los modelos osteoblástico y osteoclástico. El ensayo de estímulo mecánico fue hecho durante una estancia en el equipo de investigación de fisiopatología ósea del Dr. Juan Antonio Ardura. Juan David además elaboró las tablas y figuras del manuscrito, así como participó en la redacción y revisión del mismo.

Barcelona,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Raquel Rabionet', with a stylized flourish at the end.

Raquel Rabionet

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Susanna Balcells Comas', with a stylized flourish at the end.

Susanna Balcells Comas

RESULTADOS



CAPÍTULO 1: APROXIMACIONES GENÓMICAS PARA EL ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS RARAS RELACIONADAS CON TRASTORNOS ESQUELÉTICOS CON BAJA MASA ÓSEA.

Artículo 1

Identifying rare variants in genes related to bone phenotypes in a cohort of postmenopausal women.

Resumen:

Se identificaron variantes genéticas raras en genes previamente descritos como implicados en trastornos óseos monogénicos en mujeres posmenopáusicas, divididas en dos grupos según los valores extremos de densidad mineral ósea (DMO) y los Z-scores de la columna lumbar (LS). Una variante patogénica en el gen *COL1A2*, hallada en una mujer con baja DMO, destaca la superposición entre la osteogénesis imperfecta y la osteoporosis, que podrían compartir su etiología genética. Otras variantes no se asociaron claramente con la DMO extrema, lo que sugiere que la contribución de las variantes raras a la osteoporosis posmenopáusica es escasa. Aquí evaluamos si los valores extremos de densidad mineral ósea (DMO) en una cohorte poblacional de mujeres posmenopáusicas (BARCOS) podían estar determinados por variantes genéticas raras en genes relacionados con trastornos óseos monogénicos. Para ello, se diseñó un panel de 127 genes relacionados con diferentes fenotipos esqueléticos. Se realizó una secuenciación masiva por captura dirigida de estos genes en 104 muestras de ADN de las mujeres de la cohorte BARCOS que presentaron los Z-scores de LS más altas (grupo HZ) y más bajas (grupo LZ), con un rango de +0,70 a +3,80 y de -2,35 a -4,26, respectivamente. Las variantes 5'UTR, 3'UTR, de regiones de *splice*, *missense*, *nonsense* y pequeños *indels* con MAF < 0,01 se anotaron con CADD versión 1.6 y se consideraron en el análisis. Tras filtrar las variantes con CADD > 25 y presentes solo en uno de los grupos (LZ o HZ), se detectaron seis variantes, la mayoría de las cuales (5/6) se encontraban en el grupo LZ en los genes *TCIRG1*, *COL1A2*, *SEC24D*, *LRP4* y *ANO5*, mientras que solo una, en el gen *LMNA*, se encontraba en el grupo HZ. Según la base de datos ClinVar, la variante *COL1A2*, causante de una

forma recesiva de osteogénesis imperfecta, se describe como patógena, mientras que las demás variantes se consideran de significado incierto (VUS). La variante identificada en *COL1A2* en una mujer del grupo LZ destaca la superposición genética entre enfermedades monogénicas como la osteogénesis imperfecta y enfermedades complejas como la osteoporosis. Sin embargo, las demás variantes no se asociaron claramente con la DMO extrema, lo que sugiere que la contribución de las variantes raras a la osteoporosis posmenopáusica es escasa.

Referencia:

Patiño-Salazar JD, Ovejero D, Gabernet M, Martínez-Gil N, Alcaide-Consuegra E, Mellibovsky L, Nogués X, Grinberg D, Balcells S, Rabionet R, Garcia-Giralt N. Identifying rare variants in genes related to bone phenotypes in a cohort of postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2025 Apr;36(4):637-644. doi: 10.1007/s00198-025-07413-4



Identifying rare variants in genes related to bone phenotypes in a cohort of postmenopausal women

J. D. Patiño-Salazar¹ · D. Ovejero² · M. Gabernet¹ · N. Martínez-Gil¹ · E. Alcalde-Consuegra¹ · L. Mellibovsky² · X. Nogué² · D. Grinberg¹ · S. Balcells¹ · R. Rabionet¹ · N. García-Giralt²

Received: 20 October 2024 / Accepted: 24 January 2025 / Published online: 7 February 2025
© The Author(s) 2025

Abstract

Summary Rare genetic variants in genes previously described to be involved in bone monogenic disorders were identified in postmenopausal women split into two groups according to extreme bone mineral density (BMD) values and lumbar spine Z-scores. A pathogenic variant in *COL1A2* gene found in a woman with low BMD highlights the overlap between osteogenesis imperfecta and osteoporosis, which may share their genetic etiology. Other variants were not clearly associated with the extreme BMD, suggesting that there is little contribution of rare variants to postmenopausal osteoporosis.

Purpose We aimed to evaluate whether extreme values of bone mineral density (BMD) in a population-based cohort of postmenopausal women (BARCOS) could be determined by rare genetic variants in genes related to monogenic bone disorders.

Methods A panel of 127 genes related to different skeletal phenotypes was designed. Massive sequencing by targeted capture of these genes was performed in 104 DNA samples from those women of the BARCOS cohort that exhibited the highest (HZ group) and lowest (LZ group) LS Z-scores, ranging from +0.70 to +3.80 and from −2.35 to −4.26, respectively. 5'UTR, 3'UTR, splice region, missense, nonsense, and short indel variants with MAF < 0.01 were annotated with CADD version 1.6 and considered in the analysis.

Results After filtering those variants with CADD > 25 and present only in one of the groups (either LZ or HZ), six variants were detected, most of which (5/6) were in the LZ group in *TCIRG1*, *COL1A2*, *SEC24D*, *LRP4*, and *ANO5* genes, while only one, in the *LMNA* gene, was in the HZ group. According to the ClinVar database, the *COL1A2* variant, causative of a recessive form of osteogenesis imperfecta, is described as pathogenic, while the other variants are considered of uncertain significance (VUS).

Conclusion The variant identified in *COL1A2* in a woman from the LZ group highlights the genetic overlap between monogenic diseases such as osteogenesis imperfecta and complex diseases like osteoporosis. However, the other variants were not clearly associated with the extreme BMD, suggesting that there is little contribution of rare variants to postmenopausal osteoporosis.

Keywords Bone mineral density · *COL1A2* · Osteoporosis · Osteogenesis imperfecta · Rare variants

Abbreviations

BMD	Bone mineral density
LBM	Low bone mass
HBM	High bone mass
OI	Osteogenesis imperfecta
GDD	Gnathodiaphyseal dysplasia
LGMDL2L	Limb-girdle muscular dystrophy

Patiño-Salazar, J.D. and Ovejero, D. contributed equally to this work as co-first authors.

Rabionet, R. and García-Giralt, N.² contributed equally to this work as co-last authors.

✉ S. Balcells
sbalcells@ub.edu

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics,
Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER,
IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain

² Musculoskeletal Research Group, Hospital del Mar Research
Institute, Centro de Investigación Biomédica en Red en
Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), ISCIII,
Barcelona, Spain

Introduction

Osteoporosis (OP) is a disease characterized by a reduction of bone mineral density (BMD) that is associated with skeletal fragility. OP is especially prevalent in postmenopausal women, in whom estrogen decline constitutes the most important factor for the accelerated loss of bone mass. Other important risk factors for postmenopausal osteoporosis include advanced age, genetics, smoking, and low body weight, in addition to many diseases and drugs that impair bone health [1–3].

In the last decade, numerous genome-wide association studies (GWAS) have been conducted as a strategy to identify new genes and variants associated with complex diseases. In the field of OP, a number of GWAS have been performed to determine genetic association with BMD and osteoporotic fractures [3]. Initial GWAS studies have identified more than 50 loci associated with BMD [4–8]. Some of these loci correspond to genes involved in skeletal disorders other than OP, such as osteogenesis imperfecta (OI).

Although OP is a common complex disease and OI is a monogenic rare disease, both conditions are associated with bone fragility and increased fracture risk, even though the severity is usually much higher in OI [9]. Therefore, the fact that both disorders share several clinical features poses a diagnostic challenge for some mild forms of OI or severe OP. In fact, variants in genes such as *COL1A1* and *COL1A2* have been associated with both disorders [10–12] suggesting that some rare variants in OI genes might contribute importantly to the pathophysiology of—or even be responsible for—some cases of postmenopausal osteoporosis.

In this study, we aimed to evaluate whether rare genetic variants in genes associated with several bone phenotypes, particularly OI, could contribute to the development of extreme BMD values in patients without clear features of skeletal monogenic disorders. To do so, we investigated the presence of rare genetic variants in selected genes in a subset of women with the highest and the lowest lumbar spine (LS) Z-score values in a population-based cohort of postmenopausal women from the Barcelona area (BARCOS cohort).

Materials and methods

Study participants

The BARCOS cohort has been previously described [13, 14]. In short, it is a cross-sectional population-based

cohort that includes unselected postmenopausal women from the Barcelona area, without known mineral metabolic disorders, except for potential primary postmenopausal osteoporosis. BMD was measured (g/cm^2) in the lumbar spine (LS) (L1–L4) and the non-dominant femoral neck (FN) using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA; Hologic QDR 4500 SL, Hologic, Waltham, Mass). In our center, the technique has an in vivo coefficient of variance (CV) of 1.0% for the LS and 1.65% for the FN measurements. All participants underwent a baseline DXA and collection of a series of clinical variables. In addition, most had blood drawn for DNA extraction. Informed consent was obtained from all the participants. For this study, LS Z-scores were ordered from the highest to the lowest values. Two groups were created according to the highest and lowest Z-score values from the cohort (HZ and LZ groups, respectively). LS DXA images were carefully examined by an expert clinician to exclude those DXA exams with artifacts. Bioethical approval was granted by the Institutional Review Board of Universitat de Barcelona (IRB00003099).

Candidate gene selection

A literature-based selection of 127 BMD-related genes, corresponding to 0.5 Mb of exonic regions, was used in the design of a Roche KAPA Hyper Choice custom-capture kit. Genes were prioritized based on their relation to OI or OP as follows: First, genes with reported pathogenic variants causing OI or other bone-related diseases [15–21], and these were completed with genes associated with BMD in the GWAS studies from Morris et al. [8] and Estrada et al. [5] (supplemental table S1).

Sequencing analysis and genetic variant prioritization

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Library preparation and sequencing were performed at CNAG facilities (Barcelona, Spain). Captured fragments were sequenced in an Illumina NovaSeq 6000. Reads were then aligned to the hg38 reference genome with Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA-mem), duplicate-marked, recalibrated, and sorted before calling variants with the Genome Analysis Toolkit (GATK) haplotype caller (V4) following GATK standard parameters. Quality-filtering following GATK recommended hard filters (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035890471-Hard-filtering-germline-short-variants>) was applied. Intergenic, intragenic, intronic, upstream and downstream gene variants, as well as synonymous variants were excluded. Finally, 5'UTR,

3'UTR, splice region, missense, nonsense, and short indel variants were annotated with Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) version 1.6 and considered in the analysis.

Gene-Based Burden Testing

The Variant Call Format (VCF) file and a file containing sample information were used as input files. Genotypes that had > 5% of unavailable calls were filtered out, variants with 0 samples mutated were also excluded, and no outlier samples were filtered by the number of mutations nor the transversion/transition (tv/tr) ratio. In order to perform burden tests on the rare variants of the gene panel, R script “rvGWAS_numeric_phenotype.R” was used. The input files used were the output files from the quality control script. To assess rare variants with pathogenic prediction, variants were filtered out when the frequency of the variant was > 0.01 and CADD score was lower than 15. Bayesian rare variant Association Test using Integrated Nested Laplace Approximation (BATI) [22].

Results

Patient characteristics

Among the 104 samples from the BARCOS cohort representing the truncated ends of the Z-score distribution (52 from each extreme), 3 samples with highest Z-score did not pass the quality control. Finally, 49 samples belonging to the HZ group (Z-score range 0.70–3.80) and 52 from the LZ group (Z-score range −4.26 to −2.35), were included in the analysis. Clinical and densitometric characteristics of these 101 postmenopausal women are summarized in Table 1 and Supplemental Table S2. Age and years since menopause were not different between groups, while average body mass index (BMI) was significantly lower in women from the LZ

group. As expected, more women from the LZ group had sustained fragility fractures compared to the HZ subset.

Genetic findings

Two-hundred forty-five variants with a MAF < 0.01 remained after filtering which belonged to 78 genes (data not shown). Next, we selected those with the highest functional scores (cutoff = 25 in CADD), located within coding regions and identified only in one of the groups (either LZ or HZ). Finally, six variants were selected and looked for in the ClinVar (VarSome: the human genomic variant search engine) [23] and in the Human Gene Mutation Database (HGMD®), in order to know their clinical classification (Table 2). The main reason for the discrepancy between both databases is the source they use to get the information: mainly clinical laboratories for ClinVar and scientific publications for HGMD. Interestingly, most of them (5/6) were present in the LZ group (in genes *TCIRG1*, *COL1A2*, *SEC24D*, *LRP4*, and *ANO5*), and only one was from the HZ group (in the *LMNA* gene). According to the VarSome pathogenicity predictor, only variant p.Gly751Ser in *COL1A2* is classified as pathogenic and is associated with OI [24]; the other ones are considered either of uncertain significance (VUS) or benign/likely benign (in the case of the *SEC24D* variant). According to HGMD, the *COL1A2* variant is also classified as pathogenic for OI; the variant in *TCIRG1* is absent (although this gene has been associated with osteoclast-rich osteopetrosis [25]; the variant at *LRP4* is classified as likely pathogenic and is associated with 46XY disorder of sex development [26] (although this gene has also been implicated in osteosclerosis and high bone mass (HBM) [27]); the *SEC24D* variant is classified as likely pathogenic and has been related to OI [28]; the *ANO5* variant is classified as pathogenic and is related to gnathodiaphyseal dysplasia [29]; and finally, the *LMNA* variant, which is the only one identified in the HZ subset, is classified as pathogenic and associated with LMNA-linked congenital muscular dystrophy [30, 31].

Table 1 Clinical characteristics and lumbar spine and femoral neck DXA values of the truncated BARCOS cohort

Patient characteristics	LZ group (n = 52)	HZ group (n = 49)
Mean Age (years) ± SD	55.19 ± 8.465	55.3 ± 6.774
Mean LS BMD ± SD	0.628 ± 0.072	1.170 ± 0.086***
Mean FN BMD ± SD	0.624 ± 0.121	0.875 ± 0.115***
Mean BMI ± SD	25.939 ± 3.976	29.115 ± 4.665**
LS Z-score ± SD	−2.689 ± 0.350	1.328 ± 0.608***
FN Z-score ± SD	−1.228 ± 0.929	1.06 ± 0.899***
Years since menopause (years) ± SD	8.42 ± 7.815	6.21 ± 6.975
Individuals with fragility fracture, n (%)	16 (31%)	0 (0%)***

t-test: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)

BMD, bone mineral density (g/cm^2); BMI, body mass index (kg/m^2); LS, lumbar spine; FN, femoral neck; SD, standard deviation

Table 2 Rare variants identified in the truncated BARCOS cohort

Gene	Associated bone phenotype	Variant	Chromosome location	MAF gnomAD	CADD	ClinVar classification (Varsome 30–8–24)	HGMD classification	Sample	LS Z-score
<i>TCIRG1</i>	Osteopetrosis	c.2162 T>A p.(Ile721Asn)	chr11: 68050180	0.000509	31	VUS	Absent	LZ_52	–4.26
<i>COL1A2</i>	OI	c.2251G>A p.(Gly751Ser)	chr7: 94420604	N/A	28.9	Pathogenic	OI; Pathogenic	LZ_50	–3.19
<i>SEC24D</i>	OI/Cole-Carpenter syndrome	c.1576C>T p.(Leu526Phe)	chr4: 118752734	0.008910	28	Benign/likely benign	bone fragility disorder; likely pathogenic	LZ_32	–2.73
<i>LRP4</i>	Osteosclerosis/HBM	c.5660C>G p.(Ser1887Cys)	chr11: 46859041	0.001088	29.4	VUS; Likely benign	46,XY disorder of sex development; likely pathogenic	LZ_16	–2.43
<i>ANOS</i>	Gnathodysplasia	c.2411G>C p.(Cys804Ser)	chr11: 22274744	N/A	28.9	VUS	Limb-girdle muscular dystrophy; pathogenic	LZ_08	–2.39
<i>LMNA</i>	Muscular dystrophy	c.1871G>A p.(Arg624His)	chr1: 156138660	0.000014	25.1	VUS	Muscular Dystrophy, Emery-Dreifuss; Pathogenic	HZ_48	3.70

OI, osteogenesis imperfecta; HBM, high bone mass; VUS, variant of uncertain significance

Table 3 Results of BATI on genes involved in bone phenotype

Gene/gene group	Total mutations	BATI value	
		Δ DIC	Δ CPO
<i>LMNA</i>	2	6.452	0.025
<i>SQSTM1</i>	2	2.705	0.013
OI-related genes	14	–1.122	–0.016

Δ DIC Deviance Information Criterion difference; Δ CPO Conditional Predictive Ordinate difference

The patient with the lowest LS Z-score of the cohort (–4.26) carried the *TCIRG1* variant. Conversely, the patient with the *LMNA* variant exhibited the second highest LS Z-score (3.70; Table 2 and Supplemental Table S2). Clinical data on the patient with the *COL1A2* variant are presented in the next section.

Variant enrichment analysis (BATI/Burden Test) did not identify any gene with an excess of variants in the LZ samples (Table 3 and Supplemental Table S3). In particular, while only two genes had a positive Δ DIC (*SQSTM1*, *LMNA*), neither was close to the Δ DIC of 10 (standard cutoff value, considered equivalent to a *p*-value of 0.001).

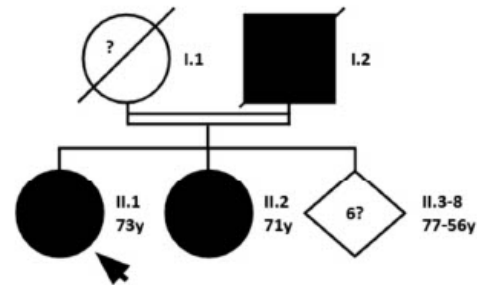


Fig. 1 Pedigree of the family in which the p.(Gly751Ser) variant in the *COL1A2* gene was identified. Filled symbols correspond to family members with known skeletal fragility. The arrow identifies the female of whom we obtained the only sample that was genetically analyzed. The white symbols represent family members for whom no information is available (?). Despite the consanguinity of I.1 and I.2 (first cousins), the presence of osteoporosis in two generations suggests a dominant pattern of inheritance, coinciding with the fact that the possibly causal mutation is in heterozygosity

Clinical description of the patient with the pathogenic variant in *COL1A2*

The *COL1A2* p.(Gly751Ser) variant, which has been related

to OI, was identified in a 73-year-old woman (age at the time of the current study; II.1 in Fig. 1) who presented with densitometric osteoporosis without a history of fractures. This woman has a family history of osteoporosis with fragility fractures (see pedigree in Fig. 1). She is the daughter of consanguineous parents (cousins), both deceased (I.1 and I.2). Her father (I.2) had sustained a femoral fracture and her younger sister (II.2) is diagnosed and treated for very severe densitometric osteoporosis without fractures. No data is available from her other 6 siblings (II.3–8). The proband is married and has a 36-year-old son of whom no data is available. Unfortunately, none of the family members wanted to be part of a further genetic study, so no additional genetic data could be obtained.

Discussion

Here we aimed to identify rare genetic variants in a list of candidate bone-related genes in order to broaden our understanding of the genetic complexity underlying a quantitative bone trait such as BMD. For this purpose, an in-house bone gene panel was designed and DNA samples from postmenopausal women with extreme lumbar spine BMD values and Z-scores were subjected to next-generation sequencing. After filtering by predicted functionality, six genetic variants were identified. The only one cataloged as pathogenic was a heterozygous variant in the *COL1A2* gene.

This variant, p.(Gly751Ser) in *COL1A2*, has been reported previously. De Paepe et al. [24] identified it in two sibs with severe osteogenesis imperfecta, who were homozygous for the missense change, and in other family members who were heterozygous and presented mild clinical manifestations of OI. Similar to our case, Spotila et al. [32] found this same variant in heterozygosity in a woman with postmenopausal osteoporosis. These cases evidence the phenotypic and genotypic overlap between osteoporosis and mild osteogenesis imperfecta and point to the milder character of the p.(Gly751Ser) variant in heterozygosity, which has been consistently associated with osteoporosis rather than OI.

Osteogenesis imperfecta (OI) is a phenotypically and genetically heterogeneous skeletal dysplasia characterized by bone fragility, growth deficiency, and skeletal deformity. The most frequent mutations causing OI are single-nucleotide substitutions that replace glycine residues or exon splicing defects in the *COL1A1* and *COL1A2* genes that encode the $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ collagen chains. Mutant collagen is partially retained intracellularly, and after secretion, it assembles in disorganized fibrils, altering mineralization. Alternatively, truncating mutations lead to nonsense-mediated mRNA decay and subsequent quantitative defects (about 50% reduction) of otherwise normal collagens. OI is characterized by a wide range of clinical outcomes ranging from

mild forms of skeletal fragility (often related to quantitative defects) to lethal phenotypes [33, 34]. The genetic spectrum of OI includes at least 16 other genes, most of them playing a pivotal role in synthesis, post-translational modification, and processing of type I collagen. All of this heterogeneity leads to a variety of inheritance patterns spanning from autosomal dominant and recessive as well as X-linked recessive which further complicate the disease classification and clinical characterization [19, 35].

Another gene associated with OI for which we found a rare variant is *SEC24D*, which encodes a component of the COPII complex involved in protein export from the endoplasmic reticulum (ER). Mutations in this gene have been associated with Cole-Carpenter syndrome, a recessive disorder affecting bone formation, resulting in craniofacial malformations and bones that break easily, as well as a syndromic form of osteogenesis imperfecta. Functional studies of fibroblasts from a Cole-Carpenter syndrome patient displayed moderate accumulation of collagen in a significantly enlarged ER, indicative of a collagen export defect. The patient, a 7-year-old boy, had moderately reduced BMD (-2.0 SD in a DXA whole body measurement), while the BMD of his heterozygous carrier parents, measured by DXA and peripheral quantitative computed tomography, was in the normal age-adjusted range [28, 36]. The variant found in our study, p.(Leu526Phe), is cataloged as likely pathogenic in HGMD, but the fact that it is present in heterozygosity would make the patient an asymptomatic carrier. Alternatively, we might speculate that the variant, together with other variants that may have gone undetected (such as second mutation in *SEC24D* or in a *SEC23A*), might indeed contribute to explain the low BMD (-2.73) of our patient. Further description of the BMD status of additional heterozygous carriers of this rare form of OI may help clarify the involvement of *SEC24D* in low bone mass phenotypes.

The woman with the lowest LS Z-score of our cohort carried the variant p.(Ile721Asn) in the T-cell immune regulator 1 gene (*TCIRG1*), which encodes the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar ATPase proton pump involved in acidification of the osteoclast resorption lacuna and in secretory lysosome trafficking [37]. Mutations in this gene are mainly involved in autosomal recessive osteopetrosis (ARO)—or exceptionally in autosomal dominant osteopetrosis (ADO)—due to the inefficient bone resorption by nonfunctional osteoclasts [25, 38], and in this scenario, it is difficult to reconcile the mutation in heterozygosity in our patient with her severe low bone mass (LBM). Nevertheless, variants in *TCIRG1* have been previously described in patients with LBM phenotype which experienced atypical femoral fractures [16]. Additionally, the p.(Ile721Asn) variant described here falls precisely in the proton pumping channel of the protein [37], and it is tempting to speculate that it might cause the channel to remain permanently open, acidifying the osteoclast lumen

space and increasing bone resorption. Functional assays would be required to prove this hypothesis.

Another woman from the LZ group carried a missense mutation in *ANO5*. Mutations in this gene are responsible for gnathodiaphyseal dysplasia (GDD), a rare skeletal syndrome characterized by osteopetrosis-like sclerosis of the long bones and fibrous dysplasia-like cemento-osseous lesions of the jaw bone. People with this condition have reduced BMD which causes the bones to be unusually fragile. As a result, they typically experience multiple bone fractures during childhood, often from mild trauma or with no apparent cause [29]. The *ANO5* gene encodes a Ca^{2+} -activated Cl^- channel involved in bone remodeling through the functional regulation of osteoclasts. Interestingly, most of the mutations in *ANO5* leading to anoctamin-5 deficiency, representing loss-of-function, are causative of several forms of limb-girdle muscular dystrophy (LGMDL2L), while missense mutations in anoctamin-5 are causative of GDD which follows an autosomal dominant mode of transmission, reflecting a gain-of-function phenotype. Significantly, patients with LGMDL2L exhibit no pathogenic phenotype related to the bone, which, conversely, is evident in patients with GDD. Of note, the genetic variant reported in the present study, p.Cys804Ser, was previously described in compound heterozygosity in patients diagnosed with LGMD instead of GDD. Our patient did not display characteristic GDD features nor a clinical LGMD diagnosis, but had severe osteoporosis (spinal T-score < -3.5 associated with a couple of postmenopausal fragility fractures). All things considered, it is unlikely that the variant explains this low bone mass phenotype. However, functional analyses and/or discovery of additional carrier patients would be necessary to get a definitive statement.

It is well known that alterations of the Wnt pathway have profound effects on bone properties, both increasing bone mass (HBM) or decreasing it (osteoporosis). *LRP4* mediates *SOST*-dependent inhibition of bone formation by facilitating the inhibitory action of sclerostin on *LRP5* [39]. It has been demonstrated that missense mutations in *LRP4* that prevent its interaction with *SOST*, decrease the inhibitory function of sclerostin in bone formation, generating an HBM phenotype [27, 40]. On the other hand, a *Lrp4*-deficient mutant mice revealed shortened total femur length, reduced cortical femoral perimeter, and reduced total femur bone mineral content and BMD [41] suggesting that mutations in different domains of *LRP4* may also have different effects on BMD [42]. According to HGMD, the variant found in our study was previously described as a secondary mutation in a patient with 46,XY disorder of sex development [27] and its putative contribution to the low bone density phenotype of our patient is presently unclear [26].

Finally, the variant found in the *LMNA* gene in the only woman with HBM might hardly explain her bone density

phenotype. It is well known that mutations in this gene are often associated with Emery-Dreifuss muscular dystrophy (for which no bone density defects have been described) [43] or premature aging syndromes (which typically lead to skeletal deformities and/or osteoporosis through activation of non-canonical pathways of osteoclastogenesis) [31]. Most probably, other genetic variants are involved in the HBM phenotype of our patient and this variant is a secondary finding.

The main limitation of this study is that the gene panel was mostly focused on genes involved in low bone mass phenotypes rather than those associated with HBM since the primary aim was to describe rare variants related to OI enriched in women with LBM. Therefore, mutations involved in HBM are underrepresented in our HZ group as well as the problem of studying recessive inheritance linked to the X chromosome only in the sample of women. Another limitation is the number of samples whereby we could not obtain statistically significant differences in the burden test. An additional limitation is that the lumbar spine was selected as the phenotyping site instead of the total hip, the latter being more reproducible in terms of BMD measurement. Unfortunately, total hip BMD was not extensively measured in our center at the time of DXA acquisition. However, the mean age of our study population was 55 years, an age in which spinal artifacts are not so common as in older individuals. In any case, all DXA scans were reviewed by an expert clinician to investigate the presence of artifacts. Also, in the early postmenopausal period, alterations in BMD occur quicker at the lumbar spine than at the hip [44], making it an adequate phenotyping site for the purpose of our study. Finally, the family of the member carrying the *COL1A2* variant was not willing to collaborate for a genetic study and we could not reach a conclusion about the implications of this variant in this family. One strength of this study is that using extreme-truncate selection designs could increase the power for detecting genetic variants associated with BMD. It is demonstrated by a previous GWAS performed by Duncan et al. (2011), where they replicated 21 of 26 known BMD-associated genes and additionally reported six new genes, most of them included in our gene panel [45]. Unlike the study by Duncan et al. which used a GWAS approach, we focused on sequencing a selected gene panel in order to identify rare genetic variants. Hence, both studies are complementary and contribute to deciphering the BMD genetics in postmenopausal women.

Conclusion

In this study, we identified rare genetic variants in genes previously described to be involved in bone monogenic phenotypes, in postmenopausal women split into two groups according to extreme BMD values and lumbar spine

Z-scores. The variant identified in *COLIA2* in a woman in the LZ group highlights the overlap between monogenic diseases such as osteogenesis imperfecta and complex diseases such as osteoporosis, which may share their genetic etiology. However, overall, we did not observe an enrichment of rare OI variants in the low BMD group, and except for the pathogenic variant in *COLIA2*, the variants could not be clearly associated with the bone density phenotype of these women, suggesting that there is little contribution of rare variants to postmenopausal osteoporosis.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00198-025-07413-4>.

Acknowledgements We want to thank Jaume Reig for the technical help.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. Funds for the study include grants PID2019-107188RB-C21 (Spanish MICINN) and CIBERER (U720). JDP was a recipient of the FI-SDUR predoctoral fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). The research was also supported by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (grant number CB16/1000245) and European Union Fund. DO is recipient of a Miquel Servet grant from ISCIII.

Data availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate All procedures performed in this study were in accordance with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Both the Bioethics Committee of Universitat de Barcelona and the Clinical Research Ethics Committee of Parc de Salut Mar have emitted a favorable bioethical statement regarding the present research. Written informed consents were obtained from all the participants.

Conflicts of Interest None.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

References

- Gregson CL, Armstrong DJ, Bowden J et al (2022) UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Arch Osteoporos* 17:58. <https://doi.org/10.1007/s11657-022-01061-5>
- Barron RL, Oster G, Grauer A et al (2020) Determinants of imminent fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 31:2103–2111. <https://doi.org/10.1007/s00198-020-05294-3>
- Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R et al (2019) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 30:3–44. <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4704-5>
- Medina-Gomez C, Kemp JP, Estrada K et al (2012) Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the WNT16 locus. *PLoS Genet* 8:e1002718. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002718>
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E et al (2012) Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 44:491–501. <https://doi.org/10.1038/ng.2249>
- Trajanoska K, Morris JA, Oei L et al (2018) Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ* 362:k3225. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3225>
- Gregson CL, Newell F, Leo PJ et al (2018) Genome-wide association study of extreme high bone mass: Contribution of common genetic variation to extreme BMD phenotypes and potential novel BMD-associated genes. *Bone* 114:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.06.001>
- Morris JA, Kemp JP, Youlten SE et al (2019) An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet* 51:258–266. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0302-x>
- El-Gazzar A, Högl W (2021) Mechanisms of bone fragility: from osteogenesis imperfecta to secondary osteoporosis. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22020625>
- Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC (2011) New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol* 7:540–557. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.81>
- Botor M, Fus-Kujawa A, Uroczynska M, et al (2021) Osteogenesis imperfecta: current and prospective therapies. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11101493>
- Peris P, Monégan A, Mäkitie RE et al (2023) Osteoporosis related to WNT1 variants: a not infrequent cause of osteoporosis. *Osteoporos Int* 34:405–411. <https://doi.org/10.1007/s00198-022-06609-2>
- Bustamante M, Nogués X, Mellibovsky L et al (2007) Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with bone mineral density and body mass index in Spanish postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 157:677–684. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0389>
- Bustamante M, Nogués X, Agueda L et al (2007) Promoter 2–1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck bmd in Spanish postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 81:327–332. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9069-2>
- Roca-Ayats N, Ng PY, Garcia-Giralt N et al (2018) Functional characterization of a GGPPS variant identified in atypical femoral fracture patients and delineation of the role of GGPPS in bone-relevant cell types. *J Bone Miner Res* 33:2091–2098. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3580>

16. Zhou W, van Rooij JG, van de Laarschot DM et al (2023) Prevalence of monogenic bone disorders in a Dutch cohort of atypical femur fracture patients. *J Bone Miner Res* 38:896–906. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4801>
17. Garcia-Giralto N, Roca-Ayats N, Abril JF et al (2022) Gene network of susceptibility to atypical femoral fractures related to bisphosphonate treatment. *Genes* 13. <https://doi.org/10.3390/genes13010146>
18. Jovanovic M, Guterman-Ram G, Marini JC (2022) Osteogenesis imperfecta: mechanisms and signaling pathways connecting classical and rare OI types. *Endocr Rev* 43:61–90. <https://doi.org/10.1210/edrv/bnab017>
19. Panzaru M-C, Florea A, Caba L, Gorduz EV (2023) Classification of osteogenesis imperfecta: importance for prophylaxis and genetic counseling. *World J Clin Cases* 11:2604–2620. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i12.2604>
20. Yu H, Li C, Wu H et al (2023) Pathogenic mechanisms of osteogenesis imperfecta, evidence for classification. *Orphanet J Rare Dis* 18:234. <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02849-5>
21. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY et al (2021) Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell* 184:1330–1347.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.002>
22. Susak H, Serra-Saurina L, Demidov G et al (2021) Efficient and flexible Integration of variant characteristics in rare variant association studies using integrated nested Laplace approximation. *PLoS Comput Biol* 17:e1007784. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007784>
23. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A et al (2019) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 35:1978–1980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
24. De Paape A, Nuytinck L, Raes M, Fryns JP (1997) Homozygosity by descent for a COL1A2 mutation in two sibs with severe osteogenesis imperfecta and mild clinical expression in the heterozygotes. *Hum Genet* 99:478–483. <https://doi.org/10.1007/s004300050392>
25. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C et al (2000) Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* 25:343–346. <https://doi.org/10.1038/77131>
26. Martinez de laPiscina I, de Mingo C, Riedl S et al (2018) GATA4 variants in individuals with a 46, XY disorder of sex development (DSD) may or may not be associated with cardiac defects depending on second hits in other DSD genes. *Front Endocrinol* 9:142. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00142>
27. Leupin O, Piters E, Halleux C et al (2011) Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem* 286:19489–19500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190330>
28. Garbes L, Kim K, Rieß A et al (2015) Mutations in SEC24D, encoding a component of the COPII machinery, cause a syndromic form of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 96:432–439. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.01.002>
29. Rolvien T, Koehn T, Komak U et al (2017) A novel ANO5 mutation causing gnathodiaphyseal dysplasia with high bone turnover osteosclerosis. *J Bone Miner Res* 32:277–284. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2980>
30. Helbling-Leclerc A, Bonne G, Schwartz K (2002) Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* 10:157–161. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200744>
31. Alcorta-Sevillano N, Macías I, Rodríguez CI, Infante A (2020) Crucial role of lamina A/C in the migration and differentiation of MSCs in bone. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9061330>
32. Spotila LD, Constantinou CD, Sereda L et al (1991) Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal osteoporosis: evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5423–5427. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5423>
33. Lindahl K, Åström E, Rubin C-J et al (2015) Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 23:1042–1050. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.81>
34. Garibaldi N, Besio R, Dalgleish R et al (2022) Dissecting the phenotypic variability of osteogenesis imperfecta. *Dis Model Mech* 15. <https://doi.org/10.1242/dmm.049398>
35. Kang H, Aryal ACS, Marini JC (2017) Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl Res* 181:27–48. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.005>
36. Melville DB, Montero-Balaguer M, Levic DS et al (2011) The fec1good mutation in zebrafish dysregulates COPII-dependent secretion of select extracellular matrix proteins in skeletal morphogenesis. *Dis Model Mech* 4:763–776. <https://doi.org/10.1242/dmm.007625>
37. Chu A, Ziragibi RA, Manolson MF (2021) The V-ATPase 3 subunit: structure, function and therapeutic potential of an essential biomolecule in osteoclastic bone resorption. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22136934>
38. Jodeh W, Katz AJ, Hart M et al (2024) Autosomal dominant osteopetrosis (ADO) caused by a missense variant in the TCIRG1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 109:1726–1732. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgae040>
39. Martínez-Gil N, Ugartondo N, Grinberg D, Bakcells S (2022) Wnt pathway extracellular components and their essential roles in bone homeostasis. *Genes* 13. <https://doi.org/10.3390/genes13010138>
40. Hendrickx G, Boudin E, Mateiu L et al (2024) An additional Lrp4 high bone mass mutation mitigates the Sost-knockout phenotype in mice by increasing bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 114:171–181. <https://doi.org/10.1007/s00223-023-01158-0>
41. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A (2009) Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One* 4:e7930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007930>
42. Fijalkowski I, Geets E, Steenackers E et al (2016) A novel domain-specific mutation in the sclerosteosis patient suggests a role of LRP4 as an anchor for sclerostin in human bone. *J Bone Miner Res* 31:874–881. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2782>
43. Muchir A, Worman HJ (2019) Emery-Dreifuss muscular dystrophy: focal point nuclear envelope. *Curr Opin Neurol* 32:728–734. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000741>
44. Finkelstein JS, Brockwell SE, Vinay M et al (2008) Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. *JCEM* 93:861–868. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1876>
45. Duncan EL, Dancy P, Kemp JP et al (2011) Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 7:e1001372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001372>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary material

Identifying of rare variants in genes related to bone phenotypes in a cohort of postmenopausal women

Patiño-Salazar, J.D.^{1*}; Ovejero, D.^{2*}; Gabernet, M.¹; Martínez-Gil, N.¹; Alcaide, E.¹; Mellibovsky, L.²; Nogués, X.²; Grinberg, D.¹; Balcells, S.^{1§}; Rabionet, R.^{1¶}; Garcia-Giralt, N.^{2¶}

Corresponding author:

§ Susanna Balcells: sbalcells@ub.edu

Supplemental Table 1: Bone-related genes included in the gene panel

GENE NAME	GENE SYNONYM(S)	FULL GENE NAME*	ENSEMBL GENE ID	CHROMOSOME LOCATION
OSTEOGENESIS IMPERFECTA GENES				
<i>BMP1</i>	<i>BMP-1, PCOLC</i>	Bone morphogenetic protein 1	ENSG00000168487	Chromosome 8: 22,165,140-22,212,326 forward strand - GRCh38:CM000670.2
<i>COL1A1</i>	<i>OI4</i>	Collagen Type I Alpha 1 Chain	ENSG00000108821	Chromosome 17: 50,184,101-50,201,632 reverse strand - GRCh38:CM000679.2
<i>COL1A2</i>	<i>OI4</i>	Collagen Type I Alpha 2 Chain	ENSG00000164692	Chromosome 7: 94,394,895-94,431,227 forward strand - GRCh38:CM000669.2
<i>CREB3L1</i>	<i>OASIS</i>	CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1	ENSG00000157613	Chromosome 11: 46,277,662-46,321,409 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>CRTAP</i>	<i>CASP, LEPREL3, P3H5</i>	Cartilage Associated Protein	ENSG00000170275	Chromosome 3: 33,114,014-33,147,773 forward strand - GRCh38:CM000665.2
<i>FKBP10</i>	<i>FKBP6, FKBP65, FLJ20683, FLJ22041, FLJ23833, hFKBP65</i>	FKBP Prolyl Isomerase 10	ENSG00000141756	Chromosome 17: 41,812,680-41,823,213 forward strand - GRCh38:CM000679.2
<i>IFITM5</i>	<i>BRIL, DSPA1, Hmp1, fragilis4</i>	Interferon Induced Transmembrane Protein 5	ENSG00000206013	Chromosome 11: 298,200-299,526 reverse strand - GRCh38:CM000673.2
<i>KDEL2</i>	<i>ELP-1, ERD2.2</i>	KDEL Endoplasmic Reticulum Protein Retention Receptor 2	ENSG00000136240	Chromosome 7: 6,445,953-6,484,190 reverse strand - GRCh38:CM000669.2
<i>MBTPS2</i>	<i>KFSD, S2P</i>	Membrane Bound Transcription Factor Peptidase, Site 2	ENSG00000012174	Chromosome X: 21,839,617-21,885,423 forward strand - GRCh38:CM000685.2
<i>MESD</i>	<i>BOCA, KIAA0081, MESDC2</i>	Mesoderm Development LRP Chaperone	ENSG00000117899	Chromosome 15: 80,946,289-80,989,828 reverse strand - GRCh38:CM000677.2
<i>P3H1</i>	<i>GROSI, LEPRE1, LEPRECAN, MGC117314</i>	Prolyl 3-hydroxylase 1	ENSG00000117385	Chromosome 1: 42,746,335-42,767,084 reverse strand - GRCh38:CM000663.2

<i>P4HB</i>	<i>DSI, ERBA2L, GIT, P4Hbeta, PDI, PDIA1, PO4DB, PO4HB, PROHB</i>	Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Beta	ENSG00000185624	Chromosome 17: 81,843,159-81,860,856 reverse strand - GRCh38:CM000679.2
<i>PLOD2</i>	<i>LH2, TLH</i>	Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2	ENSG00000152952	Chromosome 3: 146,035,139-146,163,725 reverse strand - GRCh38:CM000665.2
<i>PLS3</i>	<i>T-plastin</i>	Plastin-3	ENSG00000102024	Chromosome X: 115,561,174-115,650,861 forward strand - GRCh38:CM000685.2
<i>PPIB</i>	<i>B, CYP-SI, CYPB, OI9, PPIase, SCYLP</i>	Peptidylprolyl Isomerase B	ENSG00000166794	Chromosome 15: 64,155,740-64,163,134 reverse strand - GRCh38:CM000677.2
<i>SEC24D</i>	<i>KIAA0755</i>	SEC24 Homolog D, COPII Coat Complex Component	ENSG00000150961	Chromosome 4: 118,722,823-118,838,683 reverse strand - GRCh38:CM000666.2
<i>SERPINF1</i>	<i>EPC-I, PEDF, PIG35</i>	Serpin Family F Member 1	ENSG00000132386	Chromosome 17: 1,762,029-1,777,565 forward strand - GRCh38:CM000679.2
<i>SERPINH1</i>	<i>CBP1, CBP2, HSP47, SERPINH2</i>	Serpin Family H Member 1	ENSG00000149257	Chromosome 11: 75,562,056-75,572,783 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>SP7</i>	<i>OSX, osterix</i>	Sp7 Transcription Factor	ENSG00000170374	Chromosome 12: 53,326,575-53,345,315 reverse strand - GRCh38:CM000674.2
<i>SPARC</i>	<i>BM-40, ON, ONT</i>	Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich	ENSG00000113140	Chromosome 5: 151,661,096-151,686,975 reverse strand - GRCh38:CM000667.2
<i>TENT5A</i>	<i>C6orf37, FAM46A, FLJ20037</i>	Terminal nucleotidyltransferase 5A	ENSG00000112773	Chromosome 6: 81,491,439-81,752,774 reverse strand - GRCh38:CM000668.2
<i>TMEM38B</i>	<i>C9orf87, D4Erd89e, FLJ10493, TRIC-B, bA219P18.1</i>	Transmembrane Protein 38B	ENSG00000095209	Chromosome 9: 105,694,541-105,776,629 forward strand - GRCh38:CM000671.2
<i>WNT1</i>	<i>INT1</i>	Wnt Family Member 1	ENSG00000125084	Chromosome 12: 48,978,322-48,982,620 forward strand - GRCh38:CM000674.2
OTHER BONE METABOLISM AND FUNCTION GENES				
<i>ACP5</i>	<i>HPAP, TRAP, TRAcP</i>	Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant	ENSG00000102575	Chromosome 19: 11,574,653-11,579,993 reverse strand - GRCh38:CM000681.2
<i>ALPL</i>	<i>HOPS, TNALP, TNAP, TNSALP</i>	Alkaline Phosphatase, Biom mineralization Associated	ENSG00000162551	Chromosome 1: 21,509,397-21,578,410 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>AMER1</i>	<i>FAM123B, FLJ39827, RP11-403E24.2, WTX</i>	APC membrane recruitment protein 1	ENSG00000184675	Chromosome X: 64,185,117-64,205,708 reverse strand - GRCh38:CM000685.2
<i>ANKH</i>	<i>ANK, CCAL2, CMDJ, CPPDD, HANK, SLC62A1</i>	ANKH Inorganic Pyrophosphate Transport Regulator	ENSG00000154122	Chromosome 5: 14,704,800-14,871,778 reverse strand - GRCh38:CM000667.2
<i>ANO5</i>	<i>GDD1, LGMD2L, TMEM16E</i>	Anoctamin 5	ENSG00000171714	Chromosome 11: 21,782,659-22,283,567 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>AQP1</i>	<i>CHIP28, CO</i>	Aquaporin 1 (Colton Blood Group)	ENSG00000240583	Chromosome 7: 30,911,853-30,925,517 forward strand - GRCh38:CM000669.2

<i>ATAD3A</i>	<i>FLJ10709</i>	ATPase Family AAA Domain Containing 3A	ENSG00000197785	Chromosome 1: 1,512,162-1,534,685 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>ATP5F1A</i>	<i>ATP5A, ATP5A1, ATP5AL2, ATPM, OMR, ORM, hATP1</i>	ATP Synthase F1 Subunit Alpha	ENSG00000152234	Chromosome 18: 46,080,248-46,104,334 reverse strand - GRCh38:CM000680.2
<i>ATP5IF1</i>	<i>ATPI, ATPIF1, ATPIP, IP, MGC1167, MGC8898</i>	ATP Synthase Inhibitory Factor Subunit 1	ENSG00000130770	Chromosome 1: 28,236,109-28,246,906 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>BGLAP</i>	<i>OCN</i>	Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein	ENSG00000242252	Chromosome 1: 156,242,184-156,243,317 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>BMP2</i>	<i>BMP2A</i>	Bone morphogenetic protein 2	ENSG00000125845	Chromosome 20: 6,767,686-6,780,246 forward strand - GRCh38:CM000682.2
<i>BPGM</i>	<i>DPGM</i>	Bisphosphoglycerate Mutase	ENSG00000172331	Chromosome 7: 134,646,811-134,679,816 forward strand - GRCh38:CM000669.2
<i>CA2</i>	<i>CA-II, CAII, Car2</i>	Carbonic anhydrase 2	ENSG00000104267	Chromosome 8: 85,463,968-85,481,493 forward strand - GRCh38:CM000670.2
<i>CADMI</i>	<i>BL2, IGSF4, IGSF4A, NECL2, Nect-2, RA175, ST17, SYNCAM, SYNCAM1, TSLC1</i>	Cell Adhesion Molecule 1	ENSG00000182985	Chromosome 11: 115,169,218-115,504,957 reverse strand - GRCh38:CM000673.2
<i>CALCA</i>	<i>CALCI, CGRP, CGRP-alpha</i>	Calcitonin Related Polypeptide Alpha	ENSG00000110680	Chromosome 11: 14,966,622-14,972,354 reverse strand - GRCh38:CM000673.2
<i>CALCR</i>	<i>CT-R, CTR</i>	Calcitonin Receptor	ENSG00000004948	Chromosome 7: 93,424,486-93,574,730 reverse strand - GRCh38:CM000669.2
<i>CASR</i>	<i>FHH, GPRC2A, HHC, HHCI, NSHPT</i>	Calcium Sensing Receptor	ENSG00000036828	Chromosome 3: 122,183,668-122,291,629 forward strand - GRCh38:CM000665.2
<i>CCDC170</i>	<i>C6orf97, FLJ23305, bA282P11.1</i>	Coiled-Coil Domain Containing 17	ENSG00000120262	Chromosome 6: 151,494,017-151,621,193 forward strand - GRCh38:CM000668.2
<i>CD44</i>	<i>CD44R, CSPG8, HCELL, IN, MC56, MDU2, MDU3, MIC4, Pgp1</i>	CD44 Molecule (IN Blood Group)	ENSG00000026508	Chromosome 11: 35,138,882-35,232,402 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>CLCN5</i>	<i>CLC5, CLC-5, DENTS, NPHL1, NPHL2, XLRH, XRN, hCLC-K2, hCLC-K2</i>	Chloride Voltage-Gated Channel 5	ENSG00000171365	Chromosome X: 49,922,596-50,099,235 forward strand - GRCh38:CM000685.2
<i>CLCN7</i>	<i>CLC-7, CLC7, OPTA2, PPP1R63</i>	Chloride Voltage-Gated Channel 7	ENSG00000103249	Chromosome 16: 1,444,934-1,475,077 reverse strand - GRCh38:CM000678.2
<i>CTNNB1</i>	<i>CTNNB, armadillo, beta-catenin</i>	Catenin Beta 1	ENSG00000168036	Chromosome 3: 41,194,741-41,260,096 forward strand - GRCh38:CM000665.2
<i>CTSK</i>	<i>CTSO, CTSO2, PKND, PYCD</i>	Cathepsin K	ENSG00000143387	Chromosome 1: 150,794,880-150,809,577 reverse strand - GRCh38:CM000663.2

<i>DAAM2</i>	<i>KIAA0381, NPHS24</i>	Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 2	ENSG00000146122	Chromosome 6: 39,792,298-39,904,877 forward strand - GRCh38:CM000668.2
<i>DDX56</i>	<i>NOH61</i>	DEAD-Box Helicase 56	ENSG00000136271	Chromosome 7: 44,565,804-44,575,051 reverse strand - GRCh38:CM000669.2
<i>DKK1</i>	<i>DKK-1, SK</i>	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1	ENSG00000107984	Chromosome 10: 52,314,281-52,318,042 forward strand - GRCh38:CM000672.2
<i>DMP1</i>	<i>DMP-1, ARHP</i>	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	ENSG00000152592	Chromosome 4: 87,650,280-87,664,361 forward strand - GRCh38:CM000666.2
<i>ENPP1</i>	<i>M6S1, NPPS, PC-1, PCA1, PDNPI</i>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1	ENSG00000197594	Chromosome 6: 131,808,016-131,895,155 forward strand - GRCh38:CM000668.2
<i>ESR1</i>	<i>ER-alpha, ESR, Era, NR3A1</i>	Estrogen Receptor 1	ENSG00000091831	Chromosome 6: 151,656,691-152,129,619 forward strand - GRCh38:CM000668.2
<i>ETS2</i>	<i>Oncogene ETS-2</i>	ETS Proto-Oncogene 2, Transcription Factor	ENSG00000157557	Chromosome 21: 38,805,183-38,824,955 forward strand - GRCh38:CM000683.2
<i>FAM20C</i>	<i>DKFZp547D065, DMP4, G-CK, IMAGE:4942737</i>	FAM20C Golgi Associated Secretory Pathway Kinase	ENSG00000177706	Chromosome 7: 192,571-260,772 forward strand - GRCh38:CM000669.2
<i>FAM210A</i>	<i>C18orf19, HsT2329, MGC24180</i>	Family With Sequence Similarity 210 Member A	ENSG00000177150	Chromosome 18: 13,663,347-13,726,663 reverse strand - GRCh38:CM000680.2
<i>FBXO7</i>	<i>FBX7, Fbx, PARK15</i>	F-Box Protein 7	ENSG00000100225	Chromosome 22: 32,474,676-32,498,829 forward strand - GRCh38:CM000684.2
<i>FDPS</i>	<i>FPP Synthase</i>	Farnesyl Diphosphate Synthase	ENSG00000160752	Chromosome 1: 155,308,748-155,320,666 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>FGF23</i>	<i>FGF-23, HYPF</i>	Fibroblast Growth Factor 23	ENSG00000118972	Chromosome 12: 4,368,227-4,379,712 reverse strand - GRCh38:CM000674.2
<i>FGFRL1</i>	<i>FGFR5</i>	Fibroblast Growth Factor Receptor Like 1	ENSG00000127418	Chromosome 4: 1,009,936-1,026,898 forward strand - GRCh38:CM000666.2
<i>FUBP3</i>	<i>FBP3</i>	Far Upstream Element Binding Protein 3	ENSG00000107164	Chromosome 9: 130,578,965-130,638,352 forward strand - GRCh38:CM000671.2
<i>GALNT3</i>	<i>GalNAc-T3, HFTC, HHS</i>	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 3	ENSG00000115339	Chromosome 2: 165,747,588-165,794,659 reverse strand - GRCh38:CM000664.2
<i>GFM1</i>	<i>EFGM, EGF1, GFM, mtEF-G1</i>	G Elongation Factor Mitochondrial 1	ENSG00000168827	Chromosome 3: 158,644,527-158,695,581 forward strand - GRCh38:CM000665.2
<i>GGPS1</i>	<i>GGPPS1</i>	Geranylgeranyl Diphosphate Synthase 1	ENSG00000152904	Chromosome 1: 235,327,350-235,344,532 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>GJA1</i>	<i>CX43, GJAL, ODD, ODDD, ODOD, SDTY3</i>	Gap Junction Protein Alpha 1	ENSG00000152661	Chromosome 6: 121,435,595-121,449,727 forward strand - GRCh38:CM000668.2
<i>GORAB</i>	<i>FLJ11752, GO, NTKL-BP1, SCYL1BP1</i>	Golgin, RAB6 Interacting	ENSG00000120370	Chromosome 1: 170,531,819-170,553,834 forward strand - GRCh38:CM000663.2

<i>GRB10</i>	<i>KIAA0207, IRBP</i>	Growth Factor Receptor Bound Protein 10	ENSG00000106070	Chromosome 7: 50,590,063-50,793,462 reverse strand - GRCh38:CM000669.2
<i>IBSP</i>	<i>BSP, BSP-II, SP-II</i>	Integrin Binding Sialoprotein	ENSG00000029559	Chromosome 4: 87,799,554-87,812,435 forward strand - GRCh38:CM000666.2
<i>IDII</i>	<i>IPPII</i>	Isopentenyl-Diphosphate Delta Isomerase 1	ENSG00000067064	Chromosome 10: 1,039,152-1,049,119 reverse strand - GRCh38:CM000672.2
<i>IDUA</i>	<i>MPSI, MPSI</i>	Alpha-L-iduronidase	ENSG00000127415	Chromosome 4: 986,997-1,004,564 forward strand - GRCh38:CM000666.2
<i>IFIH1</i>	<i>Hlca, IDDM19, MDA-5, MDA5</i>	Interferon Induced With Helicase C Domain 1	ENSG00000115267	Chromosome 2: 162,267,074-162,318,684 reverse strand - GRCh38:CM000664.2
<i>IKBKG</i>	<i>FIP-3, FIP3, Fip3p, IKK-gamma, IKKAP1, IKKG, IP1, IP2, NEMO, ZC2HC9</i>	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit Gamma	ENSG00000269335	Chromosome X: 154,541,199-154,565,046 forward strand - GRCh38:CM000685.2
<i>KCNJ1</i>	<i>Kir1.1, ROMK1</i>	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 1	ENSG00000151704	Chromosome 11: 128,836,315-128,867,373 reverse strand - GRCh38:CM000673.2
<i>KREMEN1</i>	<i>KREMEN, KRM1</i>	Kringle Containing Transmembrane Protein 1	ENSG00000183762	Chromosome 22: 29,073,035-29,168,333 forward strand - GRCh38:CM000684.2
<i>LEMD3</i>	<i>MAN1</i>	LEM Domain Containing 3	ENSG00000174106	Chromosome 12: 65,169,583-65,248,355 forward strand - GRCh38:CM000674.2
<i>LEPROT</i>	<i>FLJ90360, OB-RGRP, OBRGRP, VPS55</i>	Leptin Receptor Overlapping Transcript	ENSG00000213625	Chromosome 1: 65,420,587-65,436,007 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>LGR4</i>	<i>GPR48</i>	Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 4	ENSG00000205213	Chromosome 11: 27,365,961-27,472,790 reverse strand - GRCh38:CM000673.2
<i>LMNA</i>	<i>CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMN1, LMNL1, MADA, PRO1</i>	Lamin A/C	ENSG00000160789	Chromosome 1: 156,082,573-156,140,081 forward strand - GRCh38:CM000663.2
<i>LRP4</i>	<i>CLSS, LRP-4, MEGF7, SOST2</i>	LDL Receptor Related Protein 4	ENSG00000134569	Chromosome 11: 46,856,717-46,918,642 reverse strand - GRCh38:CM000673.2
<i>LRP5</i>	<i>BMND1, EVR1, EVR4, HBM, LR3, LRP7, OPPG, OPS, OPTA1, VBCH2</i>	LDL Receptor Related Protein 5	ENSG00000162337	Chromosome 11: 68,312,591-68,449,275 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>LRP6</i>	<i>ADCAD2</i>	LDL Receptor Related Protein 6	ENSG00000070018	Chromosome 12: 12,116,025-12,267,044 reverse strand - GRCh38:CM000674.2
<i>MAFB</i>	<i>KRML</i>	MAF BZIP Transcription Factor B	ENSG00000204103	Chromosome 20: 40,685,848-40,689,236 reverse strand - GRCh38:CM000682.2
<i>MBL2</i>	<i>COLEC1, MBL, MBP, MBP-C, MBP1</i>	Mannose Binding Lectin 2	ENSG00000165471	Chromosome 10: 52,765,380-52,772,784 reverse strand - GRCh38:CM000672.2
<i>MMP2</i>	<i>CLG4, CLG4A, TBE-1</i>	Matrix Metalloproteinase 2	ENSG00000087245	Chromosome 16: 55,389,700-55,506,691 forward strand - GRCh38:CM000678.2

<i>MMP9</i>	<i>CLG4B</i>	Matrix Metalloproteinase 9	ENSG00000100985	Chromosome 20: 46,008,908-46,016,561 forward strand - GRCh38:CM000682.2
<i>MVD</i>	<i>MPD</i>	Mevalonate Diphosphate Decarboxylase	ENSG00000167508	Chromosome 16: 88,651,935-88,663,161 reverse strand - GRCh38:CM000678.2
<i>MYK</i>	<i>LRBP, MK</i>	Mevalonate Kinase	ENSG00000110921	Chromosome 12: 109,573,255-109,598,125 forward strand - GRCh38:CM000674.2
<i>MYO7A</i>	<i>DFNA11, DFNB2, NSRD2, USH1B</i>	Myosin VIIA	ENSG00000137474	Chromosome 11: 77,128,246-77,215,241 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>NOTCH2</i>	<i>HN2</i>	Notch Receptor 2	ENSG00000134250	Chromosome 1: 119,911,553-120,100,779 reverse strand - GRCh38:CM000663.2
<i>NSUN2</i>	<i>FLJ20303, MRT5, Misu, SAKI, TRM4</i>	NOP2/Sun RNA Methyltransferase 2	ENSG00000037474	Chromosome 5: 6,599,239-6,633,291 reverse strand - GRCh38:CM000667.2
<i>OSTM1</i>	<i>GL, HSPC019</i>	Osteoclastogenesis Associated Transmembrane Protein 1	ENSG00000081087	Chromosome 6: 108,029,245-108,165,854 reverse strand - GRCh38:CM000668.2
<i>PHEX</i>	<i>HPDR, HPDR1, HYP, HYP1, PEX, XLH</i>	Phosphate Regulating Endopeptidase X-Linked	ENSG00000102174	Chromosome X: 22,032,325-22,494,713 forward strand - GRCh38:CM000685.2
<i>PLEKHM1</i>	<i>KIAA0356</i>	Pleckstrin Homology And RUN Domain Containing M1	ENSG00000225190	Chromosome 17: 45,435,900-45,490,758 reverse strand - GRCh38:CM000679.2
<i>PLXNB2</i>	<i>KIAA0315, MML, PLEXB2</i>	Plexin B2	ENSG00000196576	Chromosome 22: 50,274,979-50,307,646 reverse strand - GRCh38:CM000684.2
<i>PTH1R</i>	<i>PTHR, PTHR1</i>	Parathyroid Hormone 1 Receptor	ENSG00000160801	Chromosome 3: 46,877,721-46,903,799 forward strand - GRCh38:CM000665.2
<i>PTHLH</i>	<i>HHM, PLP, PTHR, PTHRP</i>	Parathyroid Hormone Like Hormone	ENSG00000087494	Chromosome 12: 27,958,084-27,972,733 reverse strand - GRCh38:CM000674.2
<i>PYCR1</i>	<i>P5C</i>	Pyrroline-5-Carboxylate Reductase 1	ENSG00000183010	Chromosome 17: 81,932,384-81,942,412 reverse strand - GRCh38:CM000679.2
<i>PDLIM4</i>	<i>RIL</i>	PDZ And LIM Domain 4	ENSG00000131435	Chromosome 5: 132,257,696-132,273,454 forward strand - GRCh38:CM000667.2
<i>RIN3</i>	<i>FLJ22439</i>	Ras And Rab Interactor 3	ENSG00000100599	Chromosome 14: 92,513,781-92,688,994 forward strand - GRCh38:CM000676.2
<i>RPN2</i>	<i>RIBIIR, RPN-II, RPNII, SWP1</i>	Ribophorin II	ENSG00000118705	Chromosome 20: 37,178,410-37,241,619 forward strand - GRCh38:CM000682.2
<i>RPS6KA5</i>	<i>MSK1, RLPK</i>	Ribosomal Protein S6 Kinase A5	ENSG00000100784	Chromosome 14: 90,847,861-91,060,641 reverse strand - GRCh38:CM000676.2
<i>RSPO3</i>	<i>FLJ14440, THSD2</i>	R-Spondin 3	ENSG00000146374	Chromosome 6: 127,118,671-127,199,481 forward strand - GRCh38:CM000668.2

<i>RUNX2</i>	<i>AML3, CBFA1, CCD, CCD1, PEBP2A1, PEBP2aA1</i>	RUNX Family Transcription Factor 2	ENSG00000124813	Chromosome 6: 45,328,157-45,664,349 forward strand - GRCh38:CM000668.2
<i>SEMI</i>	<i>C7orf76, DSS1, ECD, FLJ42280, PSMD15, SHFD1, SHFM1, SHSF1, Shfdgl</i>	SEM1 26S Proteasome Subunit	ENSG00000127922	Chromosome 7: 96,481,626-96,709,880 reverse strand - GRCh38:CM000669.2
<i>SELENOW</i>	<i>SELW, SEPW1</i>	Selenoprotein W	ENSG00000178980	Chromosome 19: 47,778,677-47,784,686 forward strand - GRCh38:CM000681.2
<i>SFRP4</i>	<i>FRP-4, FRZB-2, frpHE</i>	Secreted frizzled related protein 4	ENSG00000106483	Chromosome 7: 37,905,932-38,025,695 reverse strand - GRCh38:CM000669.2
<i>SLC2A2</i>	<i>GLUT-2, GLUT2</i>	Solute Carrier Family 2 Member 2	ENSG00000163581	Chromosome 3: 170,996,347-171,026,743 reverse strand - GRCh38:CM000665.2
<i>SLC34A3</i>	<i>FLJ38680, NPTIIc</i>	Solute Carrier Family 34 Member 3	ENSG00000198569	Chromosome 9: 137,230,757-137,236,555 forward strand - GRCh38:CM000671.2
<i>SLC8A1</i>	<i>NCX1</i>	Solute Carrier Family 8 Member A1	ENSG00000183023	Chromosome 2: 40,097,270-40,611,053 reverse strand - GRCh38:CM000664.2
<i>SLCO2B1</i>	<i>OATP-B, OATP2B1, SLC21A9</i>	Solute carrier organic anion transporter family member 2B1	ENSG00000137491	Chromosome 11: 75,100,563-75,206,549 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>SMAD9</i>	<i>MADH6, MADH9, SMAD8, SMAD8/9</i>	SMAD Family Member 9	ENSG00000120693	Chromosome 13: 36,844,831-36,920,765 reverse strand - GRCh38:CM000675.2
<i>SNX10</i>	<i>OPTB8</i>	Sorting Nexin 10	ENSG00000086300	Chromosome 7: 26,291,862-26,374,383 forward strand - GRCh38:CM000669.2
<i>SOST1</i>	<i>DAND6, VBCH</i>	Sclerostin	ENSG00000167941	Chromosome 17: 43,753,738-43,758,791 reverse strand - GRCh38:CM000679.2
<i>SOX9</i>	<i>CMD1, CMPD1, SRA1</i>	SRY-Box Transcription Factor 9	ENSG00000125398	Chromosome 17: 72,121,020-72,126,416 forward strand - GRCh38:CM000679.2
<i>SPP1</i>	<i>BNSP, BSPI, ETA-1, OPN</i>	Secreted Phosphoprotein 1	ENSG00000118785	Chromosome 4: 87,975,667-87,983,532 forward strand - GRCh38:CM000666.2
<i>SPTBN1</i>	<i>SPTB2</i>	Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 1	ENSG00000115306	Chromosome 2: 54,456,317-54,671,446 forward strand - GRCh38:CM000664.2
<i>SQSTM1</i>	<i>A170, OSIL, PDB3, p60, p62, p62B</i>	Sequestosome 1	ENSG00000161011	Chromosome 5: 179,806,398-179,838,078 forward strand - GRCh38:CM000667.2
<i>STARD3NL</i>	<i>MENTHO, MGC3251</i>	STARD3 N-Terminal Like	ENSG0000010270	Chromosome 7: 38,178,245-38,230,670 forward strand - GRCh38:CM000669.2
<i>TCIRG1</i>	<i>ATP6N1C, ATP6V0A3, Atp6i, OC-116, OC116, TIRC7, a3</i>	T Cell Immune Regulator 1, ATPase H ⁺ Transporting V0 Subunit A3	ENSG00000110719	Chromosome 11: 68,039,025-68,050,895 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>TGFB1</i>	<i>CED, DPD1, TGFB, TGFBeta</i>	Transforming Growth Factor Beta 1	ENSG00000105329	Chromosome 19: 41,301,587-41,353,922 reverse strand - GRCh38:CM000681.2

<i>TMEM135</i>	<i>FLJ22104</i>	Transmembrane protein 135	ENSG00000166575	Chromosome 11: 87,037,844-87,328,824 forward strand - GRCh38:CM000673.2
<i>TNFRSF11A</i>	<i>CD265, FEO, LOH18CR1, ODFR, PDB2, RANK, TRANCE-R</i>	TNF Receptor Superfamily Member 11a	ENSG00000141655	Chromosome 18: 62,325,287-62,391,288 forward strand - GRCh38:CM000680.2
<i>TNFRSF11B</i>	<i>OCIF, OPG, TRI</i>	TNF Receptor Superfamily Member 11b	ENSG00000164761	Chromosome 8: 118,923,557-118,951,885 reverse strand - GRCh38:CM000670.2
<i>TNFSF11</i>	<i>CD254, ODF, OPGL, RANKL, TRANCE</i>	TNF Superfamily Member 11	ENSG00000120659	Chromosome 13: 42,562,736-42,608,013 forward strand - GRCh38:CM000675.2
<i>VDR</i>	<i>NR1H3, PPP1R163</i>	Vitamin D Receptor	ENSG00000111424	Chromosome 12: 47,841,537-47,943,048 reverse strand - GRCh38:CM000674.2
<i>WDR89</i>	<i>C14orf150, MGC9907</i>	WD Repeat Domain 89	ENSG00000140006	Chromosome 14: 63,597,039-63,641,871 reverse strand - GRCh38:CM000676.2
<i>WNT16</i>		Wnt Family Member 16	ENSG00000002745	Chromosome 7: 121,325,367-121,341,104 forward strand - GRCh38:CM000669.2
<i>ZMPSTE24</i>	<i>FACE-1, HGPS, PRO1, STE24, Ste24p</i>	Zinc Metalloproteinase STE24	ENSG00000084073	Chromosome 1: 40,258,041-40,294,180 forward strand - GRCh38:CM000663.2

*full gene names as in <https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=BGLAP>

Supplemental Table 2: Characteristics of participants included in the study

SAMPLE ID	Age (years)	Lumbar Spine BMD	Lumbar Spine Z-score	Lumbar Spine T-score	BMI	Years since menopause	Fragility fracture
LZ_52	67	0.347	-4.26	-6.3	21.09	22	Yes
LZ_51	65	0.486	-3.28	-5.0	21.62	20	Yes
LZ_50	48	0.628	-3.19	-3.7	26.52	0	No
LZ_49	44	0.634	-3.15	-3.7	22.77	5	No
LZ_48	51	0.549	-3.15	-4.5	26.38	6	Yes
LZ_47	39	0.722	-3.12	-2.9	22.48	1	No
LZ_46	58	0.561	-3.06	-4.4	21.83	0	No
LZ_45	56	0.564	-3.04	-4.3	23.03	16	No
LZ_44	59	0.565	-3.04	-4.3	28.89	17	No
LZ_43	56	0.567	-3.02	-4.3	23.74	14	No
LZ_42	65	0.524	-3.01	-4.7	23.53	15	No
LZ_41	55	0.591	-2.85	-4.1	21.10	3	No
LZ_40	64	0.550	-2.83	-4.5	26.67	15	No
LZ_39	55	0.594	-2.83	-4.1	22.60	1	No
LZ_38	48	0.677	-2.83	-3.3	22.50	6	No
LZ_37	45	0.678	-2.82	-3.3	21.48	3	No
LZ_36	49	0.681	-2.80	-3.3	25.67	0	No
LZ_35	68	0.556	-2.79	-4.4	28.51	17	No
LZ_34	59	0.604	-2.76	-4.0	33.46	10	No

LZ_33	68	0.564	-2.73	-4.3	20.54	19	Yes
LZ_32	53	0.608	-2.73	-3.9	21.97	5	No
LZ_31	54	0.609	-2.72	-3.9	28.76	14	No
LZ_30	40	0.694	-2.70	-3.1	33.67	0	No
LZ_29	50	0.613	-2.70	-3.9	25.97	6	No
LZ_28	58	0.614	-2.69	-3.9	29.15	4	Yes
LZ_27	49	0.709	-2.59	-3.0	25.30	1	Yes
LZ_26	52	0.634	-2.55	-3.7	32.45	13	Yes
LZ_25	45	0.716	-2.54	-2.9	26.17	8	Yes
LZ_24	63	0.595	-2.51	-4.0	34.72	14	No
LZ_23	81	0.579	-2.50	-4.2	28.06	31	Yes
LZ_22	54	0.640	-2.50	-3.6	34.68	5	No
LZ_21	50	0.643	-2.48	-3.6	22.90	3	No
LZ_20	63	0.601	-2.47	-4.0	24.24	11	No
LZ_19	47	0.726	-2.46	-2.9	28.10	2	No
LZ_18	44	0.728	-2.45	-2.8	20.83	0	No
LZ_17	43	0.730	-2.43	-2.8	22.27	4	No
LZ_16	47	0.731	-2.43	-2.8	25.21	3	No
LZ_15	69	0.608	-2.42	-3.9	25.15	19	Yes
LZ_14	58	0.653	-2.41	-3.5	29.59	6	Yes
LZ_13	55	0.653	-2.41	-3.5	27.50	1	No
LZ_12	54	0.654	-2.40	-3.5	28.83	4	Yes
LZ_11	59	0.654	-2.40	-3.5	27.93	14	No
LZ_10	59	0.654	-2.40	-3.5	25.70	0	No
LZ_09	54	0.655	-2.40	-3.5	23.31	1	No
LZ_08	57	0.656	-2.39	-3.5	23.83	15	Yes
LZ_07	59	0.658	-2.38	-3.5	29.64	13	No
LZ_06	54	0.658	-2.38	-3.5	28.55	11	Yes
LZ_05	46	0.738	-2.37	-2.7	18.77	4	No
LZ_04	59	0.659	-2.37	-3.5	28.80	4	No
LZ_03	47	0.739	-2.37	-2.7	21.20	-6	No
LZ_02	66	0.617	-2.36	-3.8	30.84	26	Yes
LZ_01	62	0.619	-2.35	-3.8	30.36	12	Yes
HZ_01	53	1.091	0.70	0.5	28.04	5	No
HZ_02	62	1.051	0.70	0.1	25.30	6	No
HZ_03	48	1.151	0.71	1.0	28.89	2	No
HZ_04	50	1.096	0.73	0.5	27.01	2	No
HZ_05	59	1.097	0.74	0.5	29.90	0	No
HZ_06	80	1.037	0.74	0.0	30.41	29	No
HZ_07	56	1.100	0.76	0.5	36.44	6	No
HZ_08	52	1.101	0.77	0.6	32.05	4	No
HZ_09	70	1.030	0.77	-0.1	29.27	22	No
HZ_10	51	1.106	0.80	0.6	27.34	2	No
HZ_11	55	1.106	0.80	0.6	26.17	8	No

HZ_12	49	1.167	0.83	1.2	28.91	3	No
HZ_13	65	1.072	0.85	0.3	24.20	10	No
HZ_14	53	1.116	0.87	0.7	33.78	1	No
HZ_15	60	1.076	0.87	0.3	30.12	11	No
HZ_16	61	1.076	0.87	0.3	27.50	9	No
HZ_17	52	1.118	0.89	0.7	27.18	2	No
HZ_18	78	1.072	1.02	0.3	29.30	No inf	No
HZ_19	56	1.148	1.10	1.0	28.55	0	No
HZ_20	52	1.149	1.11	1.0	41.78	7	No
HZ_21	51	1.153	1.13	1.0	28.19	5	No
HZ_22	51	1.159	1.18	1.1	24.22	10	No
HZ_23	51	1.163	1.21	1.1	24.34	0	No
HZ_24	42	1.218	1.21	1.6	24.51	4	No
HZ_25	52	1.166	1.23	1.1	28.13	3	No
HZ_26	54	1.176	1.30	1.2	27.41	1	No
HZ_27	51	1.178	1.31	1.3	28.93	0	No
HZ_28	51	1.184	1.35	1.3	24.24	4	No
HZ_29	53	1.185	1.36	1.3	27.92	15	No
HZ_30	51	1.193	1.42	1.4	31.25	1	No
HZ_31	59	1.210	1.54	1.5	20.58	19	No
HZ_32	57	1.210	1.54	1.5	23.71	1	No
HZ_33	51	1.212	1.55	1.6	25.59	0	No
HZ_34	54	1.227	1.66	1.7	26.29	1	No
HZ_35	53	1.239	1.74	1.8	26.45	3	No
HZ_36	61	1.220	1.89	1.6	39.90	21	No
HZ_37	70	1.218	1.89	1.6	33.23	19	No
HZ_38	55	1.287	2.09	2.2	42.52	1	No
HZ_39	50	1.290	2.11	2.3	29.41	0	No
HZ_40	62	1.282	2.32	2.2	32.05	10	No
HZ_41	56	1.322	2.33	2.6	27.01	0	No
HZ_42	51	1.161	2.40	1.1	30.90	9	No
HZ_43	55	1.159	2.50	No inf	No inf	3	No
HZ_44	56	1.176	2.50	No inf	No inf	3	No
HZ_45	67	1.315	2.70	No inf	No inf	No inf	No
HZ_46	51	1.388	2.80	3.2	35.30	3	No
HZ_47	57	1.413	2.98	3.4	27.05	8	No
HZ_48	64	1.397	3.70	No inf	No inf	No inf	No
HZ_49	59	1.437	3.80	No inf	20.00	No inf	No

BMD: Bone Mineral Density (g/cm²); BMI: Body Mass Index (Kg/m²)

Supplemental Table 3. Results of BATI on genes involved in bone phenotype

Gene	Total mutations	BATI value	
		Δ DIC	Δ CPO
<i>LMNA</i>	2	6.452	0.025
<i>SQSTM1</i>	2	2.705	0.013
<i>COL1A1</i>	4	-0.025	0.002
<i>RUNX2</i>	2	-0.292	-0.007
<i>PLOD2</i>	2	-0.344	-0.007
<i>TNFSF11</i>	2	-0.765	-0.002
<i>LRP5</i>	2	-1.201	-0.003
<i>IDUA</i>	3	-1.247	-0.005
<i>TCIRG1</i>	4	-1.291	-0.013
<i>DMP1</i>	2	-1.451	-0.009
<i>SLC34A3</i>	2	-1.453	-0.009
<i>PTH1R</i>	3	-1.503	-0.023
<i>NOTCH2</i>	3	-1.527	-0.007
<i>COL1A2</i>	2	-1.620	-0.025
<i>ANO5</i>	2	-1.793	-0.008
<i>TMEM135</i>	2	-1.861	-0.007
<i>MMP2</i>	2	-1.971	-0.013
<i>ATP5F1A</i>	2	-1.979	-0.015
<i>ENPP1</i>	2	-2.028	-0.012
<i>AMER1</i>	3	-2.032	-0.012
<i>ADAMTS2</i>	2	-2.512	-0.030
<i>MAFB</i>	2	-2.631	-0.032
<i>LRP4</i>	3	-3.258	-0.039

 Δ DIC Deviance Information Criterion difference Δ CPO Conditional Predictive Ordinate difference

Artículo 2

Focal dermal hypoplasia: a probable underrecognized low bone mass disorder secondary to aberrant Wnt signaling

Resumen:

Un hombre caucásico español de 29 años, sin antecedentes familiares relevantes, fue atendido en el servicio de Medicina Interna del Hospital del Mar, debido a una displasia esquelética no diagnosticada asociada a baja masa ósea y varias fracturas por fragilidad a lo largo de su infancia y adolescencia. Las pruebas de DXA realizadas a lo largo de su vida mostraron valores de DMO muy bajos; sus *T-scores* en columna vertebral y cuello femoral fueron de -4,3 y -3,5, respectivamente. Los análisis de sangre y orina fueron normales. Otras características relevantes incluyeron sindactilia en mano y pie derechos, *aplasia cutis*, hipoplasia del hemicuerpo derecho, malformaciones vertebrales, húmeros de aspecto anormal y síndrome de Asperger, entre otras. La secuenciación WES reveló una variante probablemente patogénica en el gen *PORCN* p.(Arg296Pro) en mosaicismo. Las mutaciones de *PORCN* causan hipoplasia dérmica focal (FDH), un trastorno ectomesodérmico ultra-raro ligado al cromosoma X, caracterizado por varios de los hallazgos que presentó el paciente. Sin embargo, la baja densidad mineral ósea (DMO) no se ha asociado clásicamente con la enfermedad. Cabe destacar que *PORCN* es clave para la señalización canónica de Wnt. El análisis de la literatura ha revelado otros casos de FDH con fragilidad esquelética durante la infancia. Además, estudios preclínicos con inhibidores de *PORCN*, actualmente en desarrollo como la terapia antitumoral, han mostrado efectos perjudiciales rápidos sobre la masa ósea. En conjunto, estos hallazgos indican que la FDH es probablemente una causa monogénica poco reconocida de baja masa ósea debido a una señalización defectuosa de la vía de Wnt.

Referencia:

Ovejero D, Garcia-Giralt N, Patiño-Salazar JD, Rabionet R, Nogués X. Focal dermal hypoplasia: a probable underrecognized low bone mass disorder secondary to

aberrant Wnt signaling. Osteoporos Int. 2025 Mar;36(3):555-559. doi:
10.1007/s00198-024-07382-0

CASE REPORT



Focal dermal hypoplasia: a probable underrecognized low bone mass disorder secondary to aberrant Wnt signaling

Diana Ovejero¹ · Natalia García-Giralt¹ · Juan David Patiño-Salazar² · Raquel Rabionet² · Xavier Nogués^{1,3}

Received: 14 October 2024 / Accepted: 29 December 2024 / Published online: 23 January 2025
 © International Osteoporosis Foundation and Bone Health and Osteoporosis Foundation 2025

Abstract

A 29-year-old Spanish Caucasian man, without relevant family history, was attended in our unit due to an undiagnosed skeletal dysplasia associated with low bone mass and several fragility fractures throughout his childhood and adolescence. DXA exams throughout his life showed very low BMD values; currently, his spinal and femoral neck T-scores were -4.3 and -3.5 , respectively. Blood and urinary tests were normal. Other relevant features included right hand and foot syndactyly, aplasia cutis, right hemibody hypoplasia, vertebral malformations, abnormal-looking humeri, and Asperger's syndrome among others. Whole exome sequencing retrieved a highly probable pathogenic variant in the *PORCN* gene p.(Arg296Pro) in mosaicism. *PORCN* mutations cause focal dermal hypoplasia (FDH), an X-linked ultra-rare ecto-mesodermal disorder characterized by several of the findings the patient presented. However, low BMD has not been classically associated with the disease. Noteworthy, *PORCN* is key for canonical Wnt signaling. Literature scrutiny has yielded other cases of FDH with skeletal fragility during childhood. In addition, preclinical studies with *PORCN* inhibitors, currently under development as an antitumoral therapy, have shown rapid detrimental effects on bone mass. Collectively, these findings indicate that FDH is probably an underrecognized monogenic cause of low bone mass due to defective Wnt signaling.

Keywords Goltz syndrome · Low bone mass · Skeletal dysplasia · Wnt signaling

Case report

We present a 29-year-old man who attended our unit for a skeletal dysplasia associated with low bone mass. He was the first and only child of unrelated parents, born at term after an uneventful pregnancy. There was no family history of skeletal diseases. At birth, the following features were detected: right-hand and foot syndactyly and isolated phalange hypoplasia, hypospadias, and hyperplasia of the right lower lip. At that time, he and his mother underwent karyotype testing which was normal. The patient began

ambulation at 13 months of age and suffered a diaphyseal right femoral fracture after a low-trauma fall at 18 months. Subsequently, he was tested for osteogenesis imperfecta (OI) (i.e., sequencing of *COL1A1* and *COL1A2* at that time), which was negative. He sustained other fragility fractures throughout his childhood but his parents did not remember the exact locations. He underwent several DXA exams throughout his childhood and adolescence that showed very low BMD values. Growth rate and dentition were delayed, and teeth were abnormally small and sharp. At 10 years of age, he was treated for some months with alendronate. At ages 15 and 16, he sustained three right humeral fractures in the setting of low-impact falls. Since then, he has not reported any new fractures. Other features include mild intellectual disability, Asperger's syndrome, and chronic constipation.

Physical examination evidenced hemibody asymmetry (left side bigger than right side), and a slim habitus, with a height of 170 cm (expected mid-parental height of 195.5 cm), weight of 48 kg, and BMI of 16.6 kg/m². Arm span was not longer than height. Prominent craniofacial features included aplasia cutis in the right temporo-occipital

✉ Diana Ovejero
 dovejero@researchmar.net

¹ Hospital del Mar Research Institute, Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Barcelona, Spain

² Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain

³ Internal Medicine Service, Hospital del Mar de Barcelona, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

area, low ear implantation, and a surgically intervened lip. At the trunk, thoracic kyphosis, mild pectus excavatum, and right shoulder hypoplasia were observed. At the appendicular level, right-sided syndactyly and hypoplasia of the right hand's third finger phalange stood out. Joint hyperlaxity was not detected. Images are displayed in Fig. 1.

A radiographic skeletal study revealed abnormal-looking humeri, characterized by thin shafts and relatively enlarged humeral heads. The right femoral neck appeared shortened. Thoracic scoliosis and hyperkyphosis were evident. A spinal MRI revealed increased atlanto-axial distance (5 mm), and fusion of C2-C3 vertebrae. Osteopathia striata was noted in the femoral and tibial metaphyses. Radiographic images are shown in Fig. 2.

He has undergone several DXA exams throughout adulthood which have shown very low BMD (e.g., last DXA showed Z-scores at spine – 4.3, femoral neck – 3.5, total hip – 2.9) but that has hardly changed since he was 16 (Supplementary material 1).

Blood and urinary mineral panel and endocrine panel were normal except for mildly elevated PINP levels that have recently normalized (Supplementary material 2).

To investigate the possibility of structural variants being the cause of his disorder, a microarray analysis was performed, which did not show relevant alterations. Whole exome sequencing was subsequently performed focusing on genes associated with the phenotypic observations. Detailed information on genetic testing methodology, selected human phenotype ontology terms, reference databases, variant

Fig. 1 Clinical findings observed on Physical Examination. **A** Slim habitus, hemibody asymmetry (evident right shoulder hypoplasia). **B** Syndactyly of the right foot's second and third toes. **C** Surgically intervened of fourth and fifth fingers of the right hand and hypoplasia of the right hand's third finger phalange



Fig. 2 Radiological findings. **A** Thin and elongated right humeral shaft with a relatively enlarged humeral head. **B** Osteopathia striata (vertical striations) in the left distal tibial metaphysis. **C** Dextroconvex thoracic scoliosis. **D** Relatively enlarged right femoral head (arrow). **E** Spinal MRI: increased atlantouaxial distance (0.53 cm), hyperkyphosis, fusion of C2 and C3 vertebrae (red arrow), and very mild vertebral wedging associated with Schmorl nodes highly suggestive of Scheuermann disease



classification, bioinformatic analysis, and analyzed genes is described in Supplementary materials 3–6.

The only relevant variant identified was a missense mutation in the Porcupine O-acyltransferase (*PORCN*) gene (OMIM:300651) located in chromosomal region Xp11.23: c.887G>C; p(Arg296Pro). This mutation was captured in 50% of the reads indicating mosaicism as seen in the IGV image (Supplementary material 6). These results were further confirmed through Sanger sequencing which was also performed in the mother who did not carry the variant, supporting a *de novo* mosaic event (Supplementary material 7). The variant was not found in the dbSNP database nor in gnomAD, is highly conserved across species (Supplementary material 8), and is listed as pathogenic for focal dermal hypoplasia (FDH) (OMIM 305600) in HGMD [1]. Its CADD score is 29.4, suggesting a pathogenic effect. Therefore, following ACMG criteria (PS2, PM2, PP3, PP5), we classify the variant as likely pathogenic (see Table 3 of Richards et al. 2015 for full descriptions of the criteria [2]).

The *PORCN* gene encodes the Protein-serine O-palmitoleoyltransferase porcupine which is a membrane-bound O-acyltransferase (GO: 0016413) that is involved in the palmitoylation (GO: 0018345) of Wnt proteins. Palmitoylation is essential for Wnt secretion, which is key for both canonical and non-canonical Wnt signaling (GO:0016055). The p(Arg296Pro) substitution falls in exon 10 (Supplementary material 9), which encodes part of the protein's palmitoleoyl-CoA binding site. In particular, Val296 is one of the residues responsible for accommodating the palmitoleate moiety [3]. A figure displaying the variant's position and domain both in WT and in its mutated forms indicate that mutations at this site are very probably pathogenic as shown in Supplementary material 10.

Overall, genetic and clinical investigations indicated that the patient was affected with FDH.

The patient and mother provided written informed consent to publish their clinical and genetic findings.

Discussion

FDH, also known as Goltz syndrome, is an ultra-rare entity with fewer than 400 cases reported worldwide. It is an X-linked disease with a variable penetrance in affected females due to X-chromosome inactivation. In men, the incidence is much lower (approximately 10% of affected individuals), and in the vast majority is the consequence of a somatic mutation [4].

FDH's clinical presentation is highly variable with many affected individuals exhibiting only a subset of the characteristic features. Dermatological findings are particularly diverse including aplasia cutis, urticaria, and warts among others. Ocular malformations are also common. Skeletal abnormalities are very characteristic, with malformations of the hands and feet, osteopathia striata, and hypoplasia of long bones being especially frequent. Craniofacial and skeletal asymmetries, scoliosis, and anomalies of the clavicles, ribs, and vertebral bodies, as well as dental alterations, have also been reported, with enamel hypoplasia and hypodontia, among others, being especially common [4]. Other clinical findings include constipation, gastroesophageal reflux, gastroparesis, short stature, low weight gain, urogenital malformations, and in approximately 20% of affected subjects, intellectual disability and behavioral alterations have been observed [4].

The reported patient displayed many classical findings of FDH. However, we also observed clinical features that are not listed as “characteristic” such as the abnormal-appearing humeri, and most prominently, the low bone mass associated with fragility fractures. While it is possible that the patient's low BMI could contribute to his low BMD, data on young malnourished individuals with very low weight, such as patients with anorexia nervosa, indicate that BMD may drop to Z-scores of around – 2 [5], suggesting that other factors are responsible for the extreme BMD phenotype observed in our patient. Notably, the association between FDH and skeletal fragility is not entirely new. A cross-sectional survey-based study that evaluated dermatological and skeletal findings through a 30-item questionnaire in 17 patients found that three of the participants, who were ≤ 16 years old at the time of the study, had a history of multiple fractures [6]. These three children underwent DXA scanning: BMD was reported to be very low in one of them (an 11-year-old girl with a history of an arm and pelvic fracture), not reported in another, and normal in the other. This suggests that specific variants in the *PORCN* gene could have a determinant impact on the development of skeletal fragility.

There are other rare although well-known disorders in which pathogenic variants in genes involved in the Wnt pathway give rise to abnormal skeletal phenotypes. Within

this group, there are diseases that cause low bone mass, such as pseudoglioma-osteoporosis syndrome (OMIM 259770), a recessive disorder secondary to biallelic mutations with loss-of-function in *LRP5* (OMIM: 603,506) [7], or OI type XV (OMIM 615220), secondary to *WNT1* (OMIM: 164,820) mutations [8]. Both of these genes are key for correct canonical Wnt signaling which is pivotal for bone formation [9]. However, FDH, which involves altered canonical and non-canonical Wnt signaling, still remains unrecognized in this regard. The extreme rarity of the disorder, the lack of a thorough mineral metabolic evaluation in these patients, and their clinical variability have probably contributed to overlooking bone mass status in this disorder.

Skeletal findings in preclinical studies with *PORCN* inhibitors also exemplify how low BMD is mechanistically plausible in FDH. These drugs are currently under development as a promising antitumoral therapy given Wnt signaling hyperactivity has been identified as an underlying pathophysiologic mechanism in several types of cancers [10]. In this setting, Funck-Brentano and collaborators [10] have evaluated the skeletal effects of *PORCN* inhibitors in mice, demonstrating defective bone formation and increased resorption leading to significant decreases in BMD, cortical thickness of the femoral shaft, and vertebral trabecular volume. Very similar results were observed in the study by Madan et al., in which the effects of two types of *PORCN* inhibitors on the bone were studied in a group of mice [11]. After 4 weeks of treatment, there was evidence of BMD and bone volume losses associated with an increase in adipocytes in the bone marrow. Concomitant treatment with alendronate was able to mitigate some of these effects on the skeleton. In the near future, clinical studies will reveal whether these drugs also have a negative impact on bone health in humans. Noteworthy, a mouse model for FDH has been generated through conditional deletion of the *Porcn* gene, exhibiting dermatological and skeletal findings that resemble the human counterpart. However, BMD and bone strength were not assessed in these mice [12].

In summary, we have presented the most thorough report of mineral metabolic investigations in the setting of FDH, highlighting the presence of low bone mass as a clinically relevant although probably overlooked feature of this disorder. Importantly, functional studies are still needed to confirm the effects of specific *PORCN* variants on bone metabolism. Still, our findings strongly suggest that individuals with FDH and patients treated with *PORCN* inhibitors should undergo bone mass evaluation. Overall, these data provide a deeper understanding of the implications of the Wnt pathway on bone metabolism which is important from a physiopathologic perspective and for future drug development.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00198-024-07382-0>.

Funding Dr. Xavier Nogués is funded by the Centro de Investigación Biomédica en Red Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CB16/10/00245); Dr. Diana Ovejero is funded with a Miguel Servet grant by the Instituto de Salud Carlos III (CP23/00035); Raquel Rabionet receives funding by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2021SGR-01093) and the Agencia Estatal de Investigación (PID2022-141461OB-I00).

Declarations

Conflicts of Interest None.

References

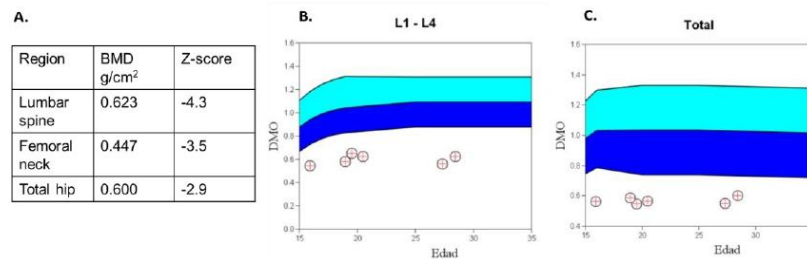
- Stranneheim H, Lagerstedt-Robinson K, Magnusson M et al (2021) Integration of whole genome sequencing into a healthcare setting: high diagnostic rates across multiple clinical entities in 3219 rare disease patients. *Genome Med* 13:40
- Richards S, Aziz N, Bale S et al (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424
- Liu Y, Qi X, Donnelly L, Elghobashi-Meinhardt N, Long T, Zhou RW, Sun Y, Wang B, Li X (2022) Mechanisms and inhibition of porcupine-mediated Wnt acylation. *Nature* 607:816–822
- Sutton VR (1993) PORCN-related developmental disorders. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A (eds) *GeneReviews*(®). Seattle (WA)
- Bemer P, Di Lodovico L, Haykanush O, Theodon H, Briot K, Carlier R, Dicembre M, Duquesnoy M, Melchior JC, Hanachi M (2021) Bone mineral density at extremely low weight in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 95:423–429
- Gunasekera NS, Divito JK, Kupper TS, Huang JT, Divito SJ (2017) Cross-sectional study evaluating skin, hair, nail, and bone disease in patients with focal dermal hypoplasia. *Pediatr Dermatol* 34:197–198
- Pekkinen M, Grigeliuniene G, Akin L et al (2017) Novel mutations in the LRP5 gene in patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Med Genet A* 173:3132–3135
- Fahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F (2013) Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 50:345–348
- Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19:179–192
- Funck-Brentano T, Nilsson KH, Brommage R, Henning P, Lerner UH, Koskela A, Tuukkanen J, Cohen-Solal M, Moverare-Skrtic S, Ohlsson C (2018) Porcupine inhibitors impair trabecular and cortical bone mass and strength in mice. *J Endocrinol* 238:13–23
- Madan B, McDonald MJ, Foxa GE, Diegel CR, Williams BO, Virshup DM (2018) Bone loss from Wnt inhibition mitigated by concurrent alendronate therapy. *Bone Res* 6:17
- Barrott JJ, Cash GM, Smith AP, Barrow JR, Murtaugh LC (2011) Deletion of mouse PORCN blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12752–12757

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material 1. Bone densitometry (DXA) throughout the years (16-28 year of age)



A. Current DXA values (BMD and Z-scores) at age 28. B. Lumbar Spine BMD values throughout the years. C. Total hip BMD values throughout the years. For both the B and C figures, the X axis refers to age in years and the Y axis refers to BMD values in g/cm². The blue sections within the graph indicate "normal" reference values.

Supplementary material 2. Biochemical findings.

Blood and urinary tests during adulthood only showed vitamin D deficiency which was corrected with vitamin D supplements. Calcium, phosphate, PTH and the bone turnover markers including C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX), bone alkaline phosphatase, and non-specific alkaline phosphatase were within normality, except for very slightly increased procollagen 1 intact N-terminal (P1NP) values which have normalized in the last years. Measurement of thyroid hormones, growth hormone, cortisol, gonadotropins, testosterone, and estradiol during adolescence, was normal.

Supplementary material 3. Genetic investigations.

Initially, the main clinical suspicion was Adams-Oliver syndrome, which is characterized by aplasia cutis congenita of the scalp and terminal transverse limb defects¹. Osteopathia striata and cranial sclerosis secondary to *AMER1* mutations² and Osteogenesis imperfecta and were also contemplated as a possible diagnosis.

Nonetheless, since the patient's phenotype was atypical in the setting of the aforementioned disorders, a microarray analysis was first performed to investigate for potential cytogenetic imbalances, copy number variants and loss-of-heterozygosity

(LOH) regions with the CytoScan™ 750K Arrays (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Results were considered normal.

Next, whole exome sequencing was performed in the Reference Laboratory Genetics (Hospitalet de Llobregat, Spain) using SureSelect Human All Exon V8 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) and a NextSeq Illumina platform (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic pipeline was performed using RefLabDB (proprietary pipeline and database from Reference Laboratory Genetics) and QCI-Interpret-Translational™ (QIAGEN, Aarhus, Denmark). Genetic variants were identified using the reference genome (hg19) after enrichment using DRAGEN Enrichment, Version 3.8.4, and filtered according to the following criteria: call quality>20, coverage>10x, Genotype Quality>20 and Allele fraction>15.

The following gene selection was performed to investigate the presence of non-synonymous variants with a minor allele frequency <1%:

- Adams-Oliver syndrome gene panel (Reference Laboratory Genetics' proprietary panel)
- NGS panels for Intellectual disability -microarray and sequencing (v5.50), Mosaic skin disorders – deep sequencing (v2.1) of the PanelAPP database.
- Genes under the following HPO terms: HP:0001249 Intellectual disability, HP:0001057 Aplasia cutis congenita, HP:0001159, Syndactyly, HP:0011842 Abnormal skeletal morphology, the last included all causing genes for OI, *AMER1* and other monogenic causes of low bone mass.

The complete list of examined genes is available in supplementary material 4.

Employed reference databases included population-based database: gnomAD and EXAC, and clinical databases: *Human Gene Mutation Database* (HGMD version 2022.4), ClinVar, LOVD, and a proprietary clinical database (RefLabDB).

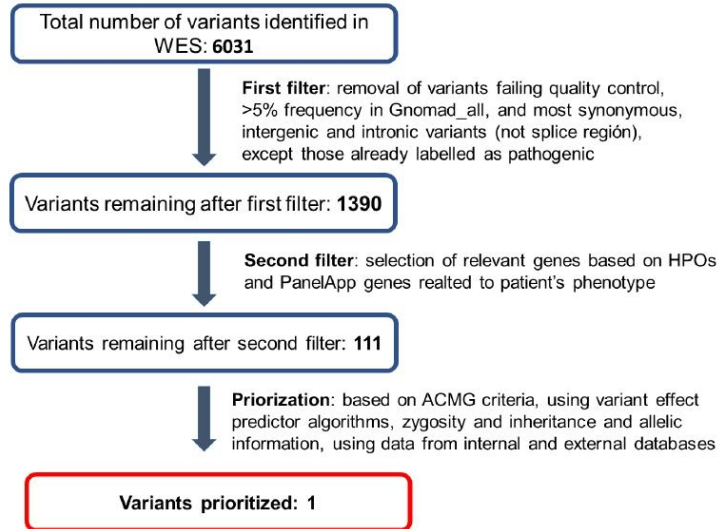
Variant classification was performed according to the recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), 2015) and the Association for Clinical Genomic Science (ACGS).

Only variants that were considered pathogenic, probably pathogenic or variants of unknown significance (VUS), localized in the selected genes were reported.

Bioinformatic analysis to evaluate the possible impact of the identified variants in structure and functionality of the protein and conservation was performed with CADD score. To study variants that could affect splicing, the metapredictor Splice AI was used.

REFERENCES

1. Lehman A, Wuyts W, Patel MS. Adams-Oliver Syndrome - RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al, eds. *GeneReviews*((R)). 1993.
2. Gear R, Savarirayan R. Osteopathia Striata with Cranial Sclerosis. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al, eds. *GeneReviews*((R)). 1993.

Supplementary material 4. Stepwise variant filtering and prioritization diagram.

Supplementary material 5. Complete list of selected genes analyzed through whole exome sequencing in patient with undiagnosed skeletal dysplasia and low bone mass.

AAAS, AAGAB, AARS1, AASS, ABAT, ABCA12, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCB7, ABCC6, ABCC8, ABCC9, ABCD1, ABCD4, ABCG5, ABCG8, ABHD12, ABHD16A, ABHD5, ABL1, ACAD9, ACADM, ACADS, ACADSB, ACADVL, ACAN, ACAT1, ACBD5, ACD, ACE, ACER3, ACO2, ACOX1, ACOX2, ACP5, ACSF3, ACSL4, ACTA1, ACTA2, ACTB, ACTG1, ACTG2, ACTL6A, ACTL6B, ACTN2, ACVR1, ACVRL1, ACY1, ADA, ADA2, ADAM22, ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTS2, ADAMTS3, ADAMTSL1, ADAMTSL2, ADAMTSL4, ADAR, ADARB1, ADAT3, ADCY10, ADCY3, ADCY5, ADCY6, ADD1, ADD3, ADGRG1, ADGRG6, ADGRL1, ADGRV1, ADH5, ADK, ADNP, ADPRS, ADRA2B, ADSL, AEBP1, AFF2, AFF3, AFF4, AFG2A, AFG2B, AFG3L2, AGA, AGAP1, AGBL5, AGGF1, AGL, AGMO, AGO1, AGO2, AGPAT2, AGPS, AGRN, AGT, AGTPBP1, AGTR1, AGXT, AHCY, AHDC1, AHI1, AHR, AHSG, AIFM1, AIMP1, AIMP2, AIP, AIPL1, AIRE, AK2, AK9, AKR1D1, AKT1, AKT3, ALAD, ALB, ALDH18A1, ALDH1A2, ALDH3A2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDOA, ALDOB, ALG1, ALG11, ALG12, ALG13, ALG14, ALG2, ALG3, ALG6, ALG8, ALG9, ALKBH8, ALMS1, ALOX12B, ALOXE3, ALPK3, ALPL, ALS2, ALX1, ALX3, ALX4, AMER1, AMMECR1, AMPD2, AMT, ANAPC1, ANAPC7, ANK1, ANK2, ANK3, ANKH, ANKLE2, ANKRD11, ANKRD17, ANKRD55, ANO10, ANO5, ANOS1, ANTXR1, ANTXR2, ANXA11, AP1B1, AP1G1, AP1S1, AP1S2, AP2M1, AP2S1, AP3B1, AP3B2, AP3D1, AP4B1, AP4E1, AP4M1, AP4S1, AP5Z1, APC, APC2, APOA1, APOA2, APOB, APOE, APP, APTX, AQP2, AR, ARCN1, ARF1, ARF3, ARFGEF1, ARFGEF2, ARG1, ARHGAP29, ARHGAP31, ARHGAP35, ARHGDI, ARHGEF18, ARHGEF2, ARHGEF9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ARL13B, ARL14EP, ARL2BP, ARL3, ARL6, ARL6IP1, ARL6IP6, ARMC5, ARMC9, ARNT2, ARPC4, ARSA, ARSB, ARSI, ARSK, ARSL, ARV1, ARVCF, ARX, ASAH1, ASCC1, ASCC3, ASCL1, ASH1L, ASL, ASNS, ASPA, ASPH, ASPM, ASPN, ASS1, ASTN1, ASXL1, ASXL2, ASXL3, ATAD1, ATAD3A, ATG7, ATIC, ATL1, ATL3, ATM, ATN1, ATP10A, ATP11A, ATP13A2, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP2A2, ATP2B1, ATP5F1A, ATP5F1D, ATP5F1E, ATP6AP1, ATP6AP2, ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0A4, ATP6V0C, ATP6V1A, ATP6V1B2, ATP6V1E1, ATP7A, ATP7B, ATP8A2, ATP8B1, ATP9A, ATPAF2, ATR, ATRIP, ATRX, ATXN2L, AUH, AUTS2, AVP, AVPR2, B2M, B3GALNT2, B3GALT6, B3GAT3, B3GLCT, B4GALNT1, B4GALT1, B4GALT7, B4GAT1, B9D1, B9D2, BAAT, BAG3, BANF1, BAP1, BAZ1B, BBIP1, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BCAP31, BCAS3, BCKDHA, BCKDHB, BCKDK, BCL11A, BCL11B, BCL7B, BCOR, BCORL1, BCR, BCS1L, BDNF, BEST1, BGN, BHLHA9, BICD2, BICRA, BIN1, BLM, BLNK, BLOC1S1, BLTP1, BMP1, BMP15, BMP2, BMP4, BMP6, BMPER, BMPR1A, BMPR1B, BMS1, BNC1, BNC2, BOLA3, BPNT2, BPTF, BRAF, BRAT1, BRCA1, BRCA2, BRCC3, BRD4, BRF1, BRIP1, BRPF1, BRSK2, BRWD3, BSCL2, BSND, BTB, BTK, BTNL2, BTRC, BUB1, BUB1B, BUB3, BUD23, C12orf4, C12orf57, C18orf32, C19orf12, C1R, C1S, C2CD3, C2orf69, C4A, C4B, CA2, CA4, CA8, CABP4, CACNA1A, CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1E, CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I, CACNA2D1, CACNA2D2, CACNB4, CACNG2, CAD, CADM3, CALCR, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2G, CAMK4, CAMKMT, CAMTA1, CANT1, CAPN1, CAPN15, CAPN3, CAPZA2, CARS1, CARS2, CASK, CASP10, CASR, CASZ1, CAV1, CAVIN1, CBL, CBS, CBY1, CC2D1A, CC2D2A, CCBE1, CCDC103, CCDC134, CCDC141, CCDC186, CCDC22, CCDC28B, CCDC32, CCDC39, CCDC40, CCDC47, CCDC65, CCDC78, CCDC8, CCDC88A, CCDC88C, CCL2, CCM2, CCN2,

112

EHHADH, EHMT1, EIF2AK2, EIF2AK3, EIF2AK4, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4,
 EIF2B5, EIF2S3, EIF3F, EIF4A3, EIF4H, EIF5A, ELAC2, ELANE, ELF4, ELMO2, ELN,
 ELOVL4, ELP1, ELP2, EMC1, EMC10, EMD, EMG1, EMILIN1, EML1, EMX2, EN1,
 ENG, ENPP1, ENTPD1, EOGT, EOMES, EP300, EPB41, EPB41L1, EPB42, EPCAM,
 EPG5, EPHA7, EPHX2, EPRS1, EPS15L1, ERAP1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC1,
 ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC6L2, ERCC8, ERF, ERGIC1,
 ERGIC3, ERLIN1, ERLIN2, ERMARD, ESCO2, ESPN, ESR1, ESR2, ESS2, ETFA,
 ETFB, ETFDH, ETHE1, EVC, EVC2, EXOC2, EXOC6B, EXOC7, EXOC8, EXOSC1,
 EXOSC2, EXOSC3, EXOSC5, EXOSC8, EXOSC9, EXT1, EXT2, EXTL3, EYA1, EYS,
 EZH2, F10, F11, F13A1, F13B, F2, F5, F7, F8, F9, FA2H, FAAH2, FAH, FAM111A,
 FAM111B, FAM120C, FAM13A, FAM149B1, FAM161A, FAM20C, FAM50A, FAN1,
 FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL,
 FANCM, FAR1, FARS2, FARSA, FARSB, FAS, FASLG, FAT4, FBLN1, FBLN5, FBN1,
 FBN2, FBP1, FBRSL1, FBXL3, FBXL4, FBXO11, FBXO28, FBXO31, FBXW11,
 FBXW4, FBXW7, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCSK, FDFT1, FDXR, FERMT1,
 FERMT3, FEZF1, FGA, FGB, FGD1, FGD4, FGF10, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16,
 FGF17, FGF20, FGF23, FGF3, FGF8, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4,
 FGG, FH, FHL1, FIBP, FICD, FIG4, FITM2, FKBP10, FKBP14, FKBP6, FKRP, FKTN,
 FLAD1, FLCN, FLI1, FLII, FLNA, FLNB, FLNC, FLRT1, FLRT3, FLT4, FLVCR1,
 FLVCR2, FMN2, FMR1, FN1, FOCAD, FOLR1, FOS, FOXA2, FOXC1, FOXC2,
 FOXE1, FOXE3, FOXF1, FOXG1, FOXH1, FOXI1, FOXJ1, FOXP1, FOXP2, FOXP3,
 FOXP4, FOXRED1, FRAS1, FREM1, FREM2, FRG1, FRMD4A, FRMD5, FRMPD4,
 FRRS1L, FRY, FRZB, FSCN2, FSHR, FTCD, FTO, FTSJ1, FUCA1, FUS, FUT8, FUZ,
 FXN, FXYD2, FZD2, FZD4, FZR1, G6PC1, G6PC3, GAA, GABBR2, GABRA1,
 GABRA2, GABRA3, GABRA5, GABRB2, GABRB3, GABRD, GABRG2, GAD1,
 GALT, GALE, GALK1, GALNS, GALNT2, GALNT3, GALT, GAMT, GAN, GARS1,
 GAS1, GAS2L2, GAS8, GATA1, GATA2, GATA4, GATA5, GATA6, GATAD2B,
 GATM, GBA1, GBA2, GBE1, GBF1, GCDH, GCH1, GCK, GCLC, GCM2, GCSH,
 GDAP1, GDF1, GDF11, GDF3, GDF5, GDF6, GDI1, GDNF, GEMIN4, GEMIN5,
 GFAP, GFER, GFI1, GFM1, GFM2, GFPT1, GFRA1, GGCX, GGPS1, GGT1, GH1,
 GHR, GIGYF1, GINS1, GJA1, GJA5, GJA8, GJB1, GJB2, GJB3, GJB4, GJB6,
 GJC2, GK, GLA, GLB1, GLDC, GLDN, GLE1, GLI1, GLI2, GLI3, GLIS3, GLMN,
 GLRA1, GLRA2, GLRB, GLS, GLUD1, GLUL, GLYCTK, GM2A, GMNN,
 GMPPA, GMPPB, GNAI1, GNAI4, GNAI1, GNAI2, GNAI3, GNAO1, GNAQ, GNAS,
 GNB1, GNB2, GNB4, GNB5, GNE, GNPAT, GNPTAB, GNPTG, GNRH1,
 GNRHR, GNS, GON7, GORAB, GOSR2, GOT2, GP1BB, GPAA1, GPC3, GPC4,
 GPC6, GPHN, GPI, GPKOW, GPR101, GPR161, GPR35, GPR88, GPSM2, GPT2,
 GPX4, GRB10, GREB1L, GRHL3, GRIA1, GRIA2, GRIA3, GRIA4, GRID2, GRIK2,
 GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2D, GRIP1, GRM1, GRM7, GSC, GSS, GSTM3,
 GSX2, GTF2E2, GTF2H5, GTF2I, GTF2IRD1, GTF2IRD2, GTF3C3, GTPBP2,
 GTPBP3, GUCA1B, GUCY2D, GUF1, GUSB, GYG1, GYPC, GZF1, H1-4, H3-3A, H3-
 3B, H4C11, H4C3, H4C5, H4C9, HAAO, HACD1, HACE1, HADH, HADHA, HADHB,
 HAMP, HARS1, HAX1, HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2, HCCS, HCFC1, HCN1,
 HCN4, HDAC4, HDAC6, HDAC8, HEATR3, HEATR5B, HECW2, HELLS, HEPACAM,
 HEPHL1, HERC1, HERC2, HES7, HESX1, HEXA, HEXB, HEY2, HFE, HGD, HGSNAT,
 HHAT, HIBCH, HIC1, HID1, HIKESHI, HINT1, HIRA, HIVEP2, HJV, HK1, HLA-B, HLA-
 C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLADRB1, HLCS, HMBS,
 HMGA2, HMGB1, HMGB3, HMGCL, HMOX1, HMX1, HNF1B, HNF4A, HNMT,
 HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPK, HNRNPR,
 HNRNPU, HOXA1, HOXA11, HOXA13, HOXB1, HOXD10, HOXD13, HPD, HPDL,
 HPGD, HPRT1, HRAS, HS2ST1, HS6ST1, HS6ST2, HSD17B10, HSD17B4, HSD3B7,

HSPA9, HSPB1, HSPB8, HSPD1, HSPG2, HTRA1, HTRA2, HTT, HUWE1, HYAL1, HYCC1, HYDIN, HYLS1, HYOU1, IARS1, IARS2, IBA57, ICOS, IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B, IDS, IDUA, IER3IP1, IFIH1, IFITM5, IFNG, IFNGR1, IFT122, IFT140, IFT172, IFT27, IFT43, IFT52, IFT56, IFT57, IFT74, IFT80, IFT81, IFT88, IGBP1, IGF1, IGF1R, IGF2, IGFALS, IGHMBP2, IGLL1, IGSF3, IHH, IKBKB, IKBKG, IL10, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL17RA, IL17RD, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL21, IL21R, IL23R, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL36RN, IL6, IL6ST, IL7R, IMPA1, IMPDH1, IMPDH2, IMPG1, IMPG2, INF2, INPP4A, INPP5E, INPP5K, INPPL1, INS, INSR, INTS1, INTS8, INTU, INVS, IPO8, IQCB1, IQCE, IQSEC1, IQSEC2, IRAK1, IREB2, IRF2BP2, IRF2BPL, IRF4, IRF5, IRF6, IRF8, IRX5, ISCA1, ISCA2, ITCH, ITFG2, ITGA3, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGB4, ITGB6, ITPA, ITPR1, IVD, IVNS1ABP, IYD, JAG1, JAG2, JAKMIP1, JAM2, JAM3, JARID2, JMJD1C, JPH1, JRK, JUP, KANK1, KANSL1, KARS1, KAT5, KAT6A, KAT6B, KAT8, KATNB1, KATNIP, KBTBD13, KCNA1, KCNA2, KCNA4, KCNAB2, KCNB1, KCNC1, KCNC2, KCNC3, KCND2, KCNE5, KCNH1, KCNJ1, KCNJ10, KCNJ11, KCNJ13, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ6, KCNJ8, KCNK3, KCNK4, KCNK9, KCNMA1, KCNN2, KCNN3, KCNN4, KCNQ1, KCNQ1OT1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ5, KCNT1, KCNT2, KCTD1, KCTD3, KCTD7, KDEL2, KDM1A, KDM3B, KDM4B, KDM5B, KDM5C, KDM6A, KDM6B, KDR, KDSR, KIAA0319L, KIAA0586, KIAA0753, KIAA0825, KIAA1549, KIDINS220, KIF11, KIF14, KIF15, KIF1A, KIF1B, KIF1C, KIF21B, KIF22, KIF2A, KIF3B, KIF4A, KIF5A, KIF5C, KIF7, KIFBP, KISS1, KISS1R, KIT, KIZ, KL, KLC2, KLF1, KLF13, KLF7, KLHL15, KLHL20, KLHL40, KLHL41, KLHL7, KLHL9, KLLN, KLRC4, KMT2A, KMT2B, KMT2C, KMT2D, KMT2E, KMT5B, KNL1, KNSTRN, KPTN, KRAS, KRIT1, KRT1, KRT10, KRT14, KRT16, KRT17, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT81, KRT83, KRT86, KRT9, KY, KYNU, L1CAM, L2HGDH, LACC1, LAGE3, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMC2, LAMC3, LAMP2, LARGE1, LARP7, LARS1, LARS2, LAS1L, LBR, LCA5, LDHD, LDLR, LDLRAP1, LEMD2, LEMD3, LETM1, LFNG, LGI3, LGI4, LHX1, LHX3, LHX4, LIAS, LIFR, LIG3, LIG4, LIMK1, LINGO1, LINGO4, LINS1, LIPE, LIPT1, LIPT2, LMAN1, LMAN2L, LMBR1, LMBRD1, LMBRD2, LMNA, LMNB1, LMNB2, LMOD3, LMX1B, LNP, LONP1, LOX, LOXL3, LPIN2, LRAT, LRBA, LRIF1, LRP2, LRP4, LRP5, LRP6, LRPPRC, LRRC32, LRRC56, LRRC8A, LRRK1, LRSAM1, LSM11, LSS, LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, LTC4S, LUZP1, LYRM7, LYSET, LYST, LZTFL1, LZTR1, MAB21L1, MAB21L2, MACF1, MACROH2A1, MAD2L2, MADD, MAF, MAFB, MAG, MAGEL2, MAGT1, MAK, MAL, MALT1, MAMLD1, MAN1B1, MAN2B1, MAN2C1, MANBA, MAOA, MAP1B, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K1, MAP3K20, MAP3K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK10, MAPK8IP3, MAPKAPK5, MAPRE2, MAPT, MARCHF6, MARS1, MARS2, MASP1, MAST1, MAT1A, MAT2A, MATN3, MBD5, MBOAT7, MBTPS1, MBTPS2, MC2R, MC4R, MCCC1, MCCC2, MCFD2, MCIDAS, MCM3AP, MCM4, MCM5, MCM7, MCOLN1, MCPH1, MCTP2, MDH1, MDH2, MDM2, MDM4, MECOM, MECP2, MECP2, MED12, MED12L, MED13, MED13L, MED17, MED23, MED25, MED27, MEF2C, MEFV, MEGF10, MEGF8, MEIS2, MEN1, MEOX1, MERTK, MESD, MESP2, MET, METTL23, METTL27, METTL5, MFAP5, MFF, MFN2, MFSD2A, MFSD8, MGAT2, MGME1, MGP, MIA3, MICOS13, MICU1, MID1, MID2, MIF, MINPP1, MIPEP, MITF, MKKS, MKRN3, MKS1, MLC1, MLH1, MLH3, MLX, MLXIPL, MLYCD, MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC, MME, MMEL1, MMGT1, MMP1, MMP13, MMP14, MMP2, MMP23B, MMP9, MMUT, MN1, MNX1, MOCS1, MOCS2, MOGS, MORC2, MPC1, MPDU1, MPDZ, MPL, MPLKIP, MPV17, MPZ, MRAP, MRAS, MRE11, MRPL12, MRPS16, MRPS2, MRPS22, MRPS25, MRPS28, MRPS34, MS4A1, MSH2, MSH6, MSL2, MSL3, MSMO1, MST1, MSTO1, MSX1, MSX2, MTAP, MTFMT, MTHFD1, MTHFR, MTHFS, MTM1, MTMR14, MTMR2, MTO1, MTOR, MTR, MTRFR, MTRR, MTSS2, MTPP, MTX2, MUC1, MUC5B, MUSK, MVD,

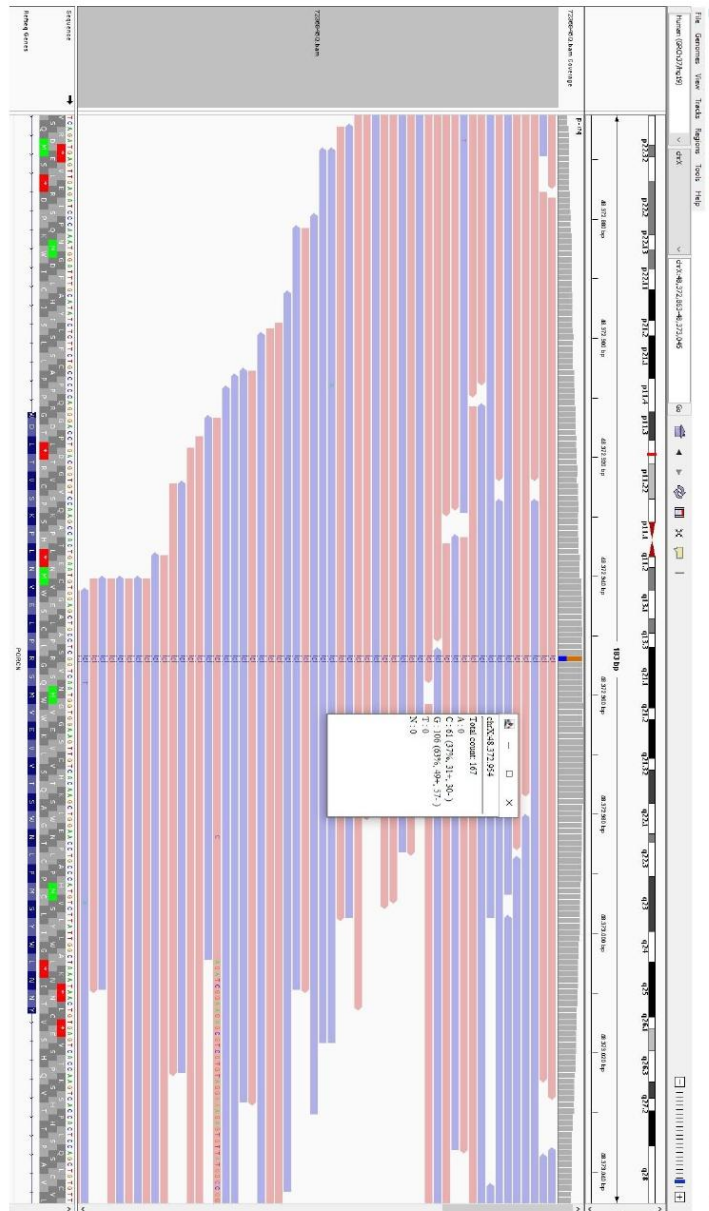
MVK, MYBPC1, MYCN, MYD88, MYF5, MYF6, MYH11, MYH14, MYH2, MYH3, MYH7, MYH8, MYL1, MYL11, MYL2, MYLK, MYMK, MYMX, MYO18B, MYO1H, MYO5A, MYO7A, MYO9A, MYOD1, MYORG, MYOT, MYPN, MYRF, MYSM1, MYT1L, NAA10, NAA15, NAA20, NAB2, NACC1, NADK2, NADSYN1, NAGA, NAGLU, NAGS, NALCN, NANS, NAPB, NARS1, NARS2, NAT8L, NBAS, NBEA, NBN, NCAPD2, NCAPD3, NCAPG2, NCAPH, NCDN, NCF1, NCF2, NCF4, NCKAP1, NCKAP1L, NDE1, NDN, NDNF, NDP, NDRG1, NDST1, NDUFA1, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFAF8, NDUFB10, NDUFB11, NDUFB3, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEB, NECAP1, NECTIN1, NECTIN4, NEDD4L, NEFL, NEK1, NEK10, NEK2, NEK8, NEK9, NELFA, NEMF, NEPR, NEU1, NEUROD2, NEXMIF, NF1, NF2, NFASC, NFE2L2, NFIA, NFIB, NFIX, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFU1, NGF, NGLY1, NHEJ1, NHERF1, NHLRC2, NHP2, NHS, NIN, NIPA1, NIPA2, NIPBL, NKAP, NKX2-1, NKX2-5, NKX2-6, NKX3-2, NKX6-2, NLGN3, NLGN4X, NLRP1, NLRP12, NLRP3, NME5, NME8, NMNAT1, NNT, NOD2, NODAL, NOG, NONO, NOP10, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOVA2, NPAP1, NPC1, NPC2, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NPM1, NPPA, NPR2, NPR3, NPRL2, NPRL3, NR0B1, NR2E3, NR2F1, NR3C1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NRAS, NRCAM, NRL, NRROS, NRTN, NRXN1, NSD1, NSD2, NSDHL, NSF, NSMCE2, NSMCE3, NSMF, NSRP1, NSUN2, NSUN3, NT5C2, NT5C3A, NT5E, NTN1, NTNG1, NTNG2, NTRK1, NTRK2, NUBPL, NUDT2, NUP107, NUP133, NUP188, NUP214, NUP37, NUP62, NUP85, NUP88, NUS1, NXN, NYX, OBSL1, OCA2, OCLN, OCRL, ODAD1, ODAD2, ODAD3, ODAD4, ODC1, OFD1, OGDHL, OGT, OPA1, OPA3, OPHN1, ORAI1, ORC1, ORC4, ORC6, OSGEF, OSTM1, OTC, OTUD5, OTUD6B, OTULIN, OTX2, OXR1, P3H1, P4HA2, P4HA2, P4HB, P4HTM, PABPN1, PACS1, PACS2, PAFAH1B1, PAH, PAICS, PAK1, PAK2, PAK3, PALB2, PALLD, PALS1, PAM16, PAN2, PAPP2, PAPSS2, PARN, PARP6, PARS2, PAX1, PAX2, PAX3, PAX6, PAX7, PAX8, PBX1, PC, PCARE, PCCA, PCCB, PCDH12, PCDH15, PCDH19, PCDHGC4, PCGF2, PCLO, PCNA, PCNT, PCSK9, PCYT1A, PCYT2, PDCD10, PDCD6IP, PDE10A, PDE11A, PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE6A, PDE6B, PDE6D, PDE6G, PDE8B, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PDHA1, PDHB, PDHX, PDLIM4, PDP1, PDPN, PDSS1, PDSS2, PDX1, PDXK, PDZD8, PEPD, PERCC1, PERP, PET100, PEX1, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PFKM, PGAP1, PGAP2, PGAP3, PGK1, PGM1, PGM2L1, PGM3, PHACTR1, PHC1, PHEX, PHF14, PHF21A, PHF6, PHF8, PHGDH, PHIP, PHKA2, PHKB, PHKG2, PHOX2B, PHYH, PI4KA, PIBF1, PIDD1, PIEZO1, PIEZO2, PIGA, PIGB, PIGC, PIGF, PIGG, PIGH, PIGK, PIGL, PIGN, PIGO, PIGP, PIQ, PIGS, PIGT, PIGU, PIGV, PIGW, PIGY, PIK3C2A, PIK3CA, PIK3CD, PIK3R1, PIK3R2, PIP5K1C, PISD, PITRM1, PITX1, PITX2, PITX3, PJA1, PKDCC, PKHD1, PLA2G6, PLAA, PLAG1, PLAGL1, PLAU, PLCB1, PLCB3, PLCB4, PLCH1, PLEC, PLEKHG2, PLEKHG5, PLEKHM1, PLG, PLK4, PLOD1, PLOD2, PLOD3, PLP1, PLPBP, PLXNA1, PLXNA2, PLXND1, PMM2, PMP2, PMP22, PMPCA, PMPCB, PMS1, PMS2, PMVK, PNKD, PNKP, PNP, PNPLA2, PNPLA6, PNPO, PNPT1, POC1A, PODXL, POF1B, POFUT1, POGLUT1, POGZ, POLA1, POLD1, POLE, POLG, POLG2, POLR1A, POLR1B, POLR1C, POLR1D, POLR2A, POLR3A, POLR3B, POLR3GL, POLR3H, POLR3K, POLRMT, POMGNT1, POMGNT2, POMK, POMP, POMT1, POMT2, POP1, POR, PORCN, POU1F1, POU2AF1, POU3F3, POU3F4, POU4F1, PPARG, PPFIBP1, PPIB, PPIL1, PPM1B, PPM1D, PPOX, PPP1CB, PPP1R12A, PPP1R15B, PPP1R17, PPP1R21, PPP2CA, PPP2R1A, PPP2R3C, PPP2R5D, PPP3CA, PPT1, PQBP1, PRCD, PRDM12, PRDM13, PRDM16, PRDM5, PRDX1,

PREPL, PRG4, PRICKLE1, PRICKLE2, PRIM1, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A,
 PRKAR1B, PRKCD, PRKCG, PRKCSH, PRKCZ, PRKD1, PRKDC, PRKG1, PRKG2,
 PRKRA, PRLR, PRMT7, PRNP, PRODH, PROK2, PROKR2, PROM1, PROP1,
 PRORP, PRPF3, PRPF31, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPH2, PRPS1, PRR12, PRRT2,
 PRRX1, PRSS12, PRTN3, PRUNE1, PRX, PSAP, PSAT1, PSEN1, PSEN2, PSENE1,
 PSMB1, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMC1, PSMC3, PSMC3IP, PSMC5, PSMD12,
 PSMG2, PSPH, PSTPIP1, PTCH1, PTCH2, PTCHD1, PTDSS1, PTEN, PTF1A,
 PTH1R, PTHLH, PTPN11, PTPN2, PTPN22, PTPN23, PTPN4, PTRH2, PTRHD1, PTS,
 PUF60, PUM1, PURA, PUS1, PUS3, PUS7, PYCR1, PYCR2, PYGL, PYROXD1,
 QARS1, QDPR, QRIC1, RAB11A, RAB11B, RAB14, RAB18, RAB23, RAB33B,
 RAB39B, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB5IF, RAB7A, RABL3, RAC1, RAC2, RAC3,
 RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAF1, RAG1, RAG2, RAI1, RALA, RALGAP1,
 RANBP2, RAP1B, RAP1GDS1, RAPSN, RARB, RARS1, RARS2, RASA1,
 RASA2, RASGRP1, RAX, RB1, RBBP8, RBCK1, RBL2, RBM10, RBM28, RBM8A,
 RBMX, RBP3, RBPJ, RBSN, RCBTB1, RD3, RDH11, RDH12, RECQL4, REEP1,
 REEP6, RELN, REN, RERE, REST, RET, RETREG1, REV3L, RFC1, RFC2, RFT1,
 RFWD3, RFX3, RFX4, RFX5, RFX7, RFXANK, RFXAP, RGR, RHBDF2, RHEB, RHO,
 RHOA, RHOB, RIC1, RIN2, RINT1, RIPK4, RIPPLY2, RIT1, RLBP1, RLIM,
 RMND1, RNASEH1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNASEH2D, RNASEH2E,
 RNF113A, RNF125, RNF13, RNF135, RNF168, RNF2, RNF213, RNF216, RNF220,
 RNF6, RNPC3, ROBO1, ROBO3, ROGDI, ROM1, ROR2, RORA, RP1, RP1L1,
 RP2, RP9, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RPGRIP1L, RPIA, RPL10, RPL11, RPL13,
 RPL15, RPL18, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35, RPL35A, RPL5, RPS10,
 RPS15A, RPS17, RPS19, RPS20, RPS23, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29,
 RPS6KA3, RPS7, RRAS, RRAS2, RREB1, RRM2B, RRP7A, RSPH1, RSPH3,
 RSPH4A, RSPH9, RSPO2, RSPRY1, RSRC1, RTEL1, RTL1, RTN2, RTN4IP1, RTTN,
 RUBCN, RUNX1, RUNX2, RUSC2, RXYLT1, RYR1, RYR2, SACS, SAG, SALL1,
 SALL4, SAMD12, SAMD9, SAMD9L, SAMHD1, SAR1B, SARDH, SARS1, SARS2,
 SASH3, SASS6, SATB1, SATB2, SBDS, SBF1, SBF2, SC5D, SCAF4, SCAMP5,
 SCAPER, SCARB2, SCARF2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A,
 SCN8A, SCN9A, SCNN1, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SCO2, SCUBE3, SCYL1,
 SCYL2, SDCCAG8, SDHA, SDHAF1, SDHB, SDHC, SDHD, SEC23A, SEC23B,
 SEC24C, SEC24D, SEC31A, SEC61A1, SEC63, SECISBP2, SELENOI, SELENON,
 SEM1, SEMA3A, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3E, SEMA4A, SEMA4D, SEMA5A,
 SEMA6B, SEPSECS, SEPTIN9, SERAC1, SERPINA1, SERPINE1, SERPINF1,
 SERPINF2, SERPINH1, SET, SETBP1, SETD1A, SETD1B, SETD2, SETD5, SETX,
 SF3B2, SF3B4, SFRP4, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, SFXN4, SGCA, SGCB,
 SGCD, SGCG, SGMS2, SGPL1, SGSH, SH2B1, SH3BP2, SH3KBP1, SH3PXD2B,
 SH3TC2, SHANK2, SHANK3, SHH, SHMT2, SHOC2, SHOX, SHPK, SHROOM4,
 SIAH1, SIGMAR1, SIK1, SIK3, SIL1, SIM1, SIN3A, SIN3B, SIX1, SIX2, SIX3, SIX5,
 SIX6, SKI, SKIC2, SKIC3, SLC10A1, SLC10A7, SLC11A1, SLC12A1, SLC12A2,
 SLC12A3, SLC12A5, SLC12A6, SLC13A5, SLC16A1, SLC16A2, SLC17A5, SLC18A2,
 SLC18A3, SLC19A3, SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC20A2,
 SLC22A12, SLC22A4, SLC25A1, SLC25A12, SLC25A15, SLC25A19, SLC25A20,
 SLC25A21, SLC25A22, SLC25A24, SLC25A26, SLC25A38, SLC25A4, SLC25A46,
 SLC26A2, SLC26A4, SLC26A9, SLC27A4, SLC29A3, SLC2A1, SLC2A10, SLC2A2,
 SLC2A9, SLC30A10, SLC30A9, SLC33A1, SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3,
 SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35B2, SLC35C1, SLC35D1, SLC36A2, SLC37A4,
 SLC38A3, SLC39A13, SLC39A14, SLC39A8, SLC3A1, SLC40A1, SLC45A1,
 SLC46A1, SLC4A1, SLC4A11, SLC4A4, SLC52A2, SLC52A3, SLC5A5, SLC5A6,
 SLC5A7, SLC6A1, SLC6A14, SLC6A17, SLC6A19, SLC6A20, SLC6A3, SLC6A5,

SLC6A8, SLC6A9, SLC7A14, SLC7A7, SLC9A3, SLC9A6, SLC9A7, SLC02A1, SLITRK6, SLURP1, SLX4, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD6, SMARCA2, SMARCA4, SMARCA5, SMARCA1, SMARCB1, SMARCC2, SMARCD1, SMARCD2, SMARCE1, SMC1A, SMC3, SMCHD1, SMG8, SMG9, SMO, SMOC1, SMPD1, SMPD4, SMPX, SMS, SNAI2, SNAP25, SNAP29, SNIP1, SNRNP200, SNRNPB, SNRPN, SNX10, SNX14, SNX27, SOBP, SOCS1, SOD1, SON, SORD, SORL1, SOS1, SOS2, SOST, SOX10, SOX11, SOX18, SOX2, SOX3, SOX4, SOX5, SOX6, SOX9, SP110, SP7, SPAG1, SPARC, SPART, SPAST, SPATA7, SPECC1L, SPEF2, SPEG, SPEN, SPG11, SPG7, SPI1, SPIB, SPIDR, SPINK5, SPINT2, SPOP, SPP1, SPR, SPRED1, SPRED2, SPRTN, SPRY4, SPTA1, SPTAN1, SPTB, SPTBN1, SPTBN2, SPTBN4, SPTLC1, SPTLC2, SQSTM1, SRC, SRCAP, SRD5A3, SREBF1, SRGAP3, SRP54, SRPX2, SRRM2, SRSF2, SRY, SSR4, ST3GAL3, ST3GAL5, STAC3, STAG1, STAG2, STAMPB, STAR, STARD7, STAT1, STAT3, STAT4, STAT5B, STAT6, STEEP1, STIL, STIM1, STK11, STK36, STN1, STRA6, STRADA, STS, STT3A, STT3B, STUB1, STX16, STX1A, STX1B, STX3, STXBP1, STXBP2, SUCLA2, SUCLG1, SUFU, SUGCT, SUMF1, SUOX, SUPT16H, SURF1, SUZ12, SVBP, SVIL, SYK, SYN1, SYNCRIP, SYNE1, SYNE2, SYNGAP1, SYNJ1, SYP, SYT1, SYT14, SYT2, SZT2, TAB2, TAC3, TACO1, TACR3, TAF1, TAF13, TAF15, TAF1C, TAF2, TAF4, TAF6, TAF8, TAFAZZIN, TALDO1, TANC2, TANGO2, TAOX1, TAP1, TAP2, TAPBP, TAPT1, TARS1, TASP1, TAT, TBC1D20, TBC1D23, TBC1D24, TBC1D2B, TBC1D7, TBCD, TBCE, TBCK, TBL1X, TBL1XR1, TBL2, TBR1, TBX1, TBX15, TBX18, TBX2, TBX22, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6, TBXAS1, TBXT, TCF12, TCF20, TCF3, TCF4, TCF7L2, TCIRG1, TCN2, TCOF1, TCTN1, TCTN2, TCTN3, TDGF1, TDP2, TECPR2, TECR, TEK, TELO2, TENM3, TENT5A, TERT, TET2, TET3, TF, TFAP2A, TFAP2B, TFE3, TFG, TFR2, TG, TGDS, TGFBI, TGFB2, TGFB3, TGFBP1, TGFBP2, TGIF1, TGM1, TGM6, TH, THG1L, THOC2, THOC6, THPO, THRA, THRB, THSD4, THUMP1, TIAM1, TIMM22, TIMM50, TIMM8A, TIMMDC1, TINF2, TJP2, TK2, TKFC, TKT, TLK2, TLL1, TLR3, TLR4, TMCO1, TMEM106B, TMEM107, TMEM126B, TMEM138, TMEM147, TMEM165, TMEM216, TMEM218, TMEM222, TMEM231, TMEM237, TMEM240, TMEM260, TMEM270, TMEM38B, TMEM43, TMEM53, TMEM63C, TMEM67, TMEM70, TMEM94, TMLHE, TMPRSS6, TMTC3, TMX2, TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF1A, TNFSF11, TNFSF12, TNFSF15, TNK1, TNNT1, TNNT3, TNPO2, TNPO3, TNR, TNRC6B, TNXB, TOE1, TOGARAM1, TOM1, TOMM40, TOMM70, TONSL, TOP3A, TOPORS, TOR1A, TOR1AIP1, TP53, TP53RK, TP63, TP73, TPI1, TPK1, TPM2, TPM3, TPO, TPP1, TPP2, TPRKB, TRAF3IP1, TRAF7, TRAFIP, TRAK1, TRAPPC10, TRAPPC11, TRAPPC12, TRAPPC14, TRAPPC2, TRAPPC2L, TRAPPC4, TRAPPC6B, TRAPPC9, TREM2, TREX1, TRH, TRIM2, TRIM32, TRIM37, TRIM8, TRIO, TRIP11, TRIP12, TRIP13, TRIP4, TRIT1, TRMT1, TRMT10A, TRMT5, TRNT1, TRPM3, TRPS1, TRPV3, TRPV4, TRPV6, TRRAP, TSC1, TSC2, TSEN15, TSEN2, TSEN34, TSEN54, TSFM, TSHB, TSHR, TSPAN12, TSPAN7, TSPAP1, TSR2, TTC12, TTC19, TTC21B, TTC5, TTC8, TTI2, TTN, TTPA, TTR, TUB, TUBA1A, TUBB, TUBB2A, TUBB2B, TUBB3, TUBB4A, TUBB4B, TUBG1, TUBGCP2, TUBGCP4, TUBGCP6, TUFM, TULP1, TUSC3, TWIST1, TWIST2, TWNK, TXN2, TXNDC15, TXNL4A, TXNRD2, TYMP, TYMS, TYROBP, U2AF2, UBA1, UBA2, UBA5, UBAC2, UBB, UBE2A, UBE2T, UBE3A, UBE3B, UBE4A, UBE4B, UBR1, UBR7, UBTF, UCHL1, UFC1, UFD1, UFM1, UFSP2, UGDH, UGP2, UGT1A1, UMOD, UMPS, UNC119, UNC45A, UNC80, UPB1, UPF1, UPF3B, UQCC2, UQCRC2, UQCRCQ, UROC1, UROD, UROS, USB1, USF3, USH1C, USH1G, USH2A, USP18, USP27X, USP45, USP48, USP7, USP8, USP9X, VAC14, VAMP1, VAMP2, VAMP7, VANG1, VANG2, VARS1, VARS2, VCP,

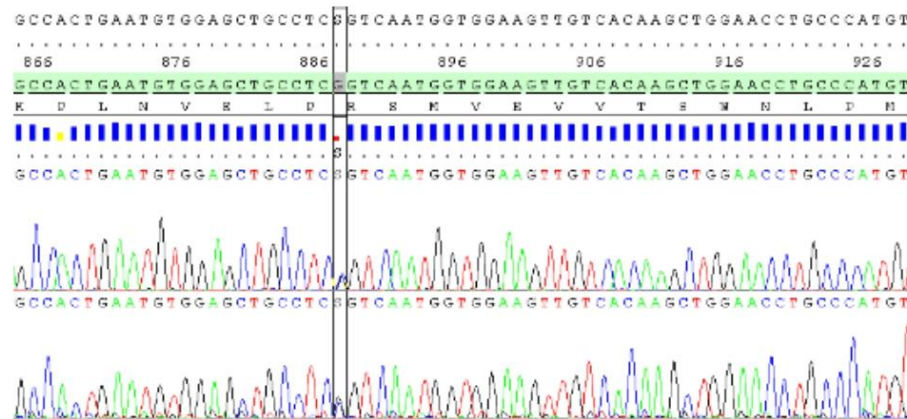
VDR,VHL, VIPAS39, VLDLR, VMA21, VPS11, VPS13A, VPS13B, VPS13D, VPS16, VPS33A, VPS33B, VPS35L, VPS37A, VPS37D, VPS41, VPS4A, VPS50, VPS51,VPS53, VRK1, VSX1, VWA1, VWA3B, VWF, WAC, WARS2, WAS, WASF1, WASHC4, WASHC5, WBP11, WDFY3, WDPCP, WDR11, WDR19, WDR26, WDR35, WDR37, WDR4, WDR45, WDR45B, WDR48, WDR62, WDR73, WDR81, WFS1, WIPF1, WIP12, WLS, WNK1, WNK3, WNT1, WNT10B, WNT3,WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT7A, WNT9B, WRAP53, WRN, WT1, WWOX, XPA, XPC, XPNPEP3, XPR1, XRCC2, XRCC4, XYLT1, XYLT2, YAP1, YARS1, YARS2,YEATS2, YIF1B, YIPF5, YME1L1, YRDC, YWHAE, YWHAG, YY1, YY1AP1, ZBTB11, ZBTB18, ZBTB20, ZBTB24, ZBTB42, ZBTB7A, ZC3H14, ZC4H2, ZDHHHC9, ZEB2, ZFHX4, ZFP57, ZFPM2, ZFR, ZFYVE26, ZFYVE27, ZIC1, ZIC2, ZIC3, ZMIZ1, ZMPSTE24, ZMYM2, ZMYM3, ZMYND10, ZMYND11, ZNF141, ZNF142, ZNF148, ZNF292, ZNF335, ZNF341, ZNF407, ZNF408, ZNF423, ZNF462, ZNF469, ZNF513, ZNF526, ZNF592, ZNF668, ZNF687, ZNF699, ZNF711, ZNHIT3, ZPR1, ZSWIM6, ZSWIM7.

Supplementary material 6. Integrative Genomics Viewer (IGV) image of *PORCN* in the proband indicating a mosaic state of the identified variant

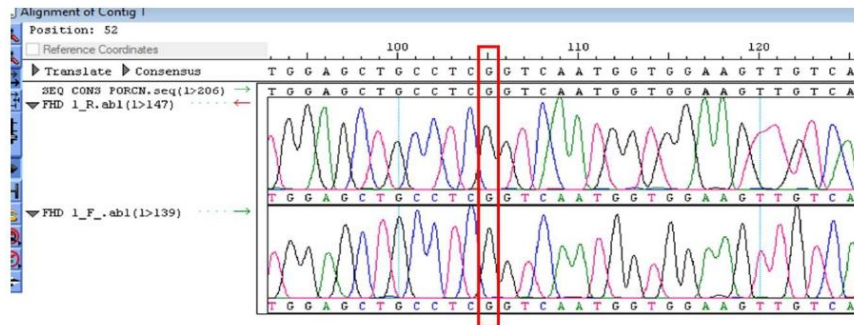


Supplementary Material 7. Sanger sequencing images. A. Image of the proband's Sanger sequencing of *PORCN*. The missense mosaic mutation is pointed out in the rectangle. B. Image of the proband's mother Sanger sequencing of the same *PORCN* region. The rectangle indicates shows an exclusive guanosine signal.

A. Proband's Sanger image

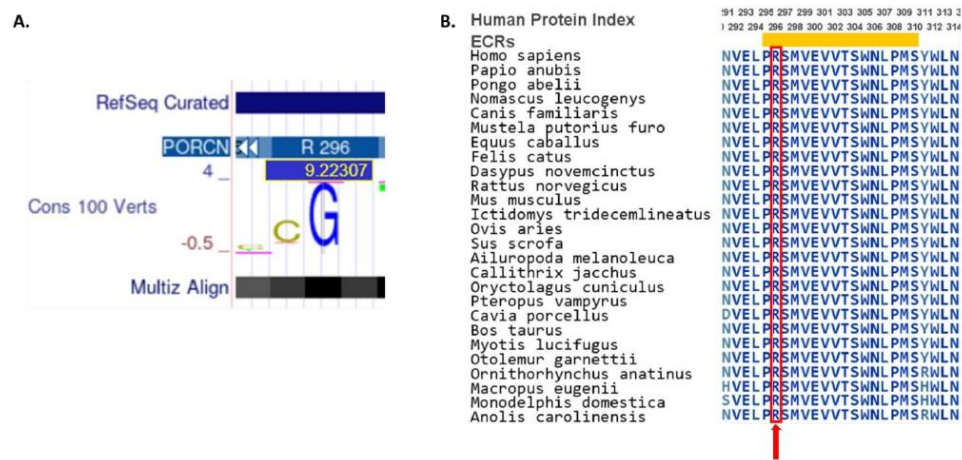


B. Proband's mother Sanger image



Supplementary Material 8. Conservation across species of the nucleic base and aminoacid residue mutated in the proband

- A. Conservation of the nucleic base. Image extracted and adapted from UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>) indicating that the guanosine base at the c.887 position, which is the one substituted by cytosine in the proband, is highly conserved across species, also reflected by a score of 9,22 from the 100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP (phyloP100way).
- B. Conservation of the aminoacid residue (red rectangle). Image extracted and adapted from <https://media.githubusercontent.com/media/aminodektc/61/master>. The yellow rectangle points to an evolutionary conserved region (ECR).



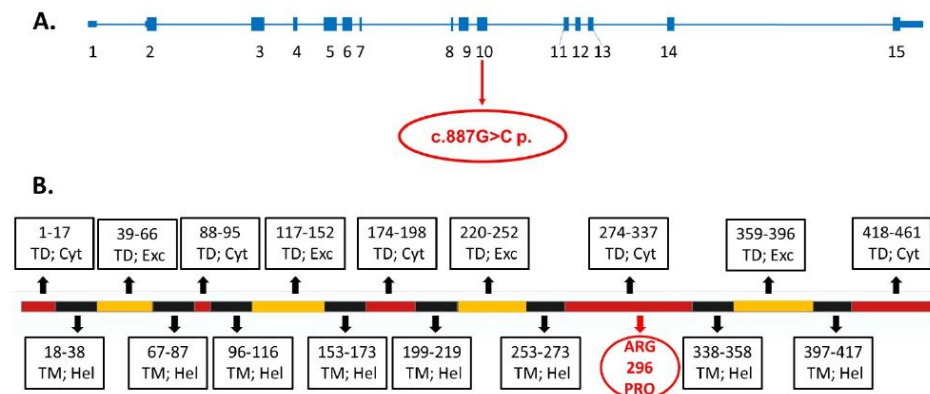
Supplementary Material 9. Two-dimensional representation of PORCN gene (A), and of the Protein-serine O-palmitole poyltransferase porcupine protein (B).

A. Blue boxes represent the exons. The proband's variant, which is localized in exon 10, is highlighted in the red circle.

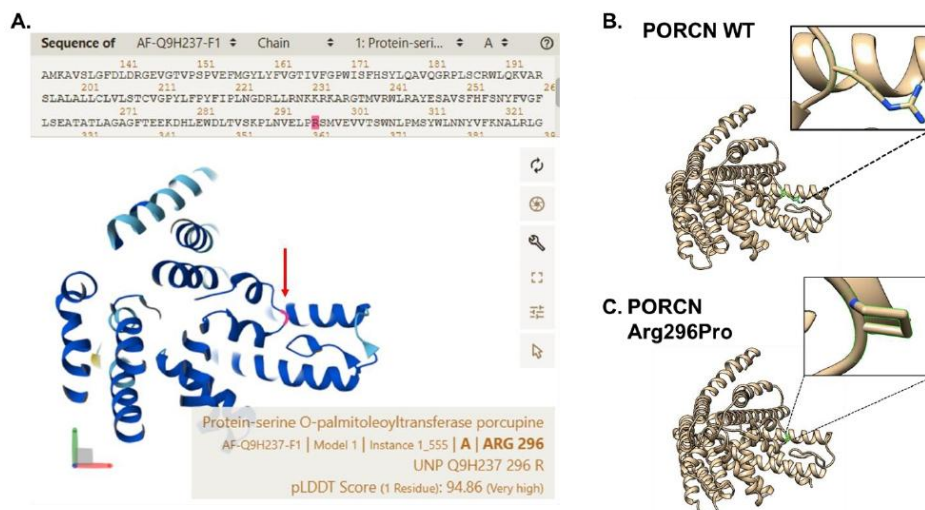
B. Numbers in the boxes represent aminoacid positions. Red segments represent cytoplasmic domains; black segments represent helicoidal domains; yellow segments represent extracellular domains. The proband's variant aminoacid position is shown in the red circle.

Abbreviations: TD: topological domain; Cyt: cytoplasmatic; Exc: Extracellular; TM: transmembrane; Hel: helicoidal.

To create the images, data was extracted from UCSC and Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)



Supplementary Material 10. Three-dimensional reconstruction of the protein-serine O-palmitoleoyltransferase porcupine protein (PORCN) in WT and mutated forms. A. 3D reconstruction of the WT protein through AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9H237>). The arginine residue at position 296 (pink residue pointed by red arrow) has a very high per-residue model confidence score (pLDDT) of 94,86 (ranges between 0 and 100), indicating that mutations at this site are very probably pathogenic. B. A model of the WT PORCN protein with the WT Arg296 residue magnified in the box. C. A model of the PORCN protein with the proband's variant p.(Arg296Pro) shown in the magnified box. Figures 10B and 10C were also downloaded from the AlphaFold website and visualized with the UCSF Chimera software version 1.18.0. To obtain the p.(Arg296Pro) variant in the model, the rotamers option in the structure editing tool was used with all default parameters chosen.



CAPÍTULO 2: VALIDACIONES FUNCIONALES DE VARIANTES GENÉTICAS RARAS ASOCIADAS CON UN TRASTORNO ESQUELÉTICO CON ALTA MASA ÓSEA.

Artículo 3

Functional assessment of rare genetic variants found in a family with skeletal dysplasia and high bone mass

Resumen:

Aquí, realizamos validaciones funcionales *in silico* e *in vitro* de cinco variantes genéticas halladas en un caso familiar de displasia ósea esclerosante que también presentaba lesiones óseas lucentes. Para ello, se hicieron análisis *in silico* de cinco variantes genéticas en los genes *TBX18*, *SEMA4D*, *PTCH1*, *ADGRE5* y *PTK7*, analizando también posibles cambios en la estabilidad proteica. Se realizaron ensayos de gen reportero luciferasa para validar funcionalmente la variante de *TBX18*. Se determinó la expresión de biomarcadores osteoblásticos en células MC3T3 tratadas con medio acondicionado obtenido a partir de cultivos de células HEK que expresan de forma estable *Sema4d* wt y mutada para validar funcionalmente la variante encontrada en este gen. Las variantes *missense* p.Arg349Gln en *TBX18*, p.Val212Met en *SEMA4D*, p.Asp436Asn en *PTCH1*, p.Glu724Gly en *ADGRE5* y p.Thr675Met en *PTK7* no generan cambios aparentes en el plegamiento ni en las estructuras tridimensionales de las proteínas, ni comprometen su estabilidad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre *TBX18* wt y *TBX18* p.Arg349Gln. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre *Sema4d* wt y mutada en ninguno de los biomarcadores analizados, tanto en el estado basal como tras la inducción de la diferenciación a osteoblastos. Sin embargo, se observó una tendencia al alza en la expresión de ARNm de todos los biomarcadores osteoblásticos tras la diferenciación a osteoblastos en células tratadas con *Sema4d* mutada, en comparación con las células tratadas con *Sema4d* wt y las células sin tratamiento con medio acondicionado. De acuerdo con nuestro análisis *in silico*, ninguna de las variantes encontradas genera una alteración en la estructura conformacional ni en

la estabilidad de las proteínas implicadas. Además, en nuestro sistema, la variante p.Arg349Gln en *TBX18* no afecta la actividad transcripcional de este factor. Asimismo, nuestros ensayos de diferenciación de osteoblastos para validar funcionalmente la variante p.Val212Met en *SEMA4D* no permitieron obtener resultados concluyentes, aunque, según los análisis *in silico*, esta variante probablemente no afecta a la capacidad inhibitoria de la osteoblastogénesis de la semaforina 4D.

Referencia:

Functional assessment of rare genetic variants found in a family with skeletal dysplasia and high bone mass. Juan David Patiño-Salazar, Diana Ovejero, Natalia Garcia-Giralt, María Gabernet, Javier Forte-Martínez, Mónica Cozar, Susanna Balcells, Daniel Grinberg, Xavier Nogués, Iñigo Etxebarria Foronda, Raquel Rabionet. *Manuscrito en preparación*.

Functional assessment of rare genetic variants found in a family with skeletal dysplasia and high bone mass

Juan David Patiño-Salazar¹, Diana Ovejero², María Gabernet¹, Javier Forte-Martínez¹,
Mónica Cozar¹, Susanna Balcells¹, Daniel Grinberg¹, Xavier Nogués², Iñigo Etxebarria
Foronda³, Raquel Rabionet¹, Natalia Garcia-Giralt²

¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain.

²Musculoskeletal Research Group, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Centro de Investigación Biomédica en Red en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), ISCIII, Barcelona, Spain.

³Traumatology and Orthopedic Surgery Department, Hospital Alto Deba, Gipuzkoa, Spain

Corresponding author:

Raquel Rabionet: kelly.rabionet@ub.edu

Financiación: Este artículo se somete en cumplimiento del compromiso que se adquirió al obtener la BECA FEIOMM de Investigación Básica 2023 para realizar el proyecto “Estudio Funcional de Variantes en LRP6 Asociadas a Alta Masa Ósea”.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Abstract

Introduction: Sclerosing bone dysplasias are a group of bone pathologies caused by an imbalance in bone metabolism, due to decreased bone resorption or stimulation of bone formation signalling pathways. This group of pathologies is clinically and genetically diverse and phenotypically characterized by a significantly increased bone mass resulting in a broad range of secondary clinical complications.

Objective: To perform *in silico* and *in vitro* functional validations of five candidate genetic variants found in a familial case of a sclerosing bone dysplasia that also featured lucent bone lesions.

Methods: *In silico* structural analyses of 5 genetic variants in the genes *TBX18*, *SEMA4D*, *PTCH1*, *ADGRE5*, and *PTK7* were performed, also analysing possible changes in the protein stability. *In vitro* functional assays were performed for *TBX18* and *SEMA4D*. In particular the *TBX18* variant was validated by Luciferase gene reporter assays, while the *SEMA4D* variant was validated through the determination of osteoblastic biomarkers in MC3T3 cells treated with conditioned medium from cell cultures stably expressing wt or mutated *Sema4d*.

Results: The missense variants p.Arg349Gln in *TBX18*, p.Val212Met in *SEMA4D*, p.Asp436Asn in *PTCH1*, p.Glu724Gly in *ADGRE5* and p.Thr675Met in *PTK7* do not generate any apparent change in the folding or three-dimensional structures of the proteins, nor do they compromise protein stability. There was no statistically significant difference between wt and mutant (p.Arg349Gln) *TBX18* transcription activation activity. No statistically significant differences were observed between wt and mutated *Sema4d* on any of the biomarkers analysed, neither in the basal state nor after inducing differentiation to osteoblasts. Nevertheless, an increased trend was observed in the mRNA expression of all the osteoblastic biomarkers after differentiation, in cells treated with mutated *Sema4d* compared to wt *Sema4d* or no treatment.

Conclusion: Our *in silico* and functional studies do not support any of these variants as causes of the phenotype found in the familial case of sclerosing bone dysplasia.

Key words: Rare genetic variants, High bone mass, Skeletal dysplasia, *TBX18*, *SEMA4D*

Introduction

Skeletal dysplasias are a group of bone pathologies that include 461 genetic bone disorders and have been associated with one or more of 437 genes. Most of the severe monogenic skeletal dysplasias are dominant disorders, frequently caused by de novo mutations (1,2). In particular, sclerosing bone dysplasias are caused by an imbalance in bone metabolism, resulting from impaired bone resorption or from excessive activation of bone formation signalling pathways (3,4). Because sclerosing skeletal dysplasias have great variability with a broad range of secondary clinical complications, it is difficult to establish a precise diagnosis (1). Therefore, research is needed on new diagnostic approaches for these diseases and for a better understanding of their pathophysiology.

Our research team previously reported a familial case of sclerosing bone dysplasia characterized by high bone mass (HBM) and lucent bone lesions (5). In this case, we observed a unique skeletal phenotype with a combination of sclerotic features and lucent bone lesions, as well as elevated impact microindentation (IMI) values, in three members of a family: the proband, his son, and his daughter. BMD was very high in the proband and his daughter. The proband's daughter also had idiopathic scoliosis (IS), as well as mild thrombocytopenia and mild structural thyroid abnormalities, which were the only extra-skeletal abnormalities identified.

Whole exome sequencing (WES) of the affected members of the family members revealed rare variants in genes involved in homeobox transcriptional regulation, osteoblast and osteoclast function, and Wnt signaling pathways involved in bone formation. Specifically, 5 rare putatively pathogenic variants were prioritized in genes associated with bone metabolism: *TBX18*, *SEMA4D*, *PTCH1*, *ADGRE5*, and *PTK7*. The *PTK7* variant was considered potentially relevant to the development of idiopathic scoliosis (IS), while the *TBX18* and *SEMA4D* variants emerged as the most promising candidates for the observed lucent bone lesions and HBM, respectively, given their high predicted pathogenicity and putative role in bone biology (5).

The transcription factor *TBX18* is a member of an evolutionary conserved family of transcription factors that play important roles in organ formation during embryogenesis. It has a DNA-binding T-box domain that enables repression activity by antagonizing transcriptional activators. The protein has an eh1 domain that enables the formation of homo- or heterodimers (6). Mutations in *TBX18* have been linked to urinary tract malformations and congenital heart defects. In mouse models, both under- and over-expression of *TBX18* have resulted in severe skeletal ossification anomalies, indicating its important role in bone formation. Particularly, it has been linked with endochondral formation (7,8). The *SEMA4D* gene encodes a 150 kDA class IV transmembrane semaphorin. *SEMA4D* is abundantly expressed on the cell membrane of both osteoclast progenitors and mature osteoclasts, while its expression is low or no detectable in osteoblasts. The binding of *SEMA4D* to the PLEXIN-B1 receptor, which is highly expressed in osteoblasts, activates a signaling cascade that inhibits osteoblastic differentiation. Therefore, *SEMA4D* regulates bone remodeling by directly blocking osteoblast differentiation and repelling osteoblast by increasing their motility (9–13).

In this work, we aimed to perform *in silico* and *in vitro* functional analyses to assess whether these genetic variants could be related to the phenotypic features of the skeletal dysplasia identified in this family.

Material and Methods

Variants under study

The five variants investigated in this study are all missense and are listed in Table 1.

In silico studies

The models of the wt proteins with the variant residues magnified in the boxes were downloaded from the AlphaFold website <https://alphafold.ebi.ac.uk/> and visualized with the UCSF Chimera software version 1.18.0. Each of the variants were obtained from the wt models using Chimera software. The rotamers option in the structure editing tool was used with all default parameters chosen. For the prediction of protein stability, the Maestro web server of University of Salzburg was used <https://pbwww.services.came.sbg.ac.at/maestro/web/maestro/workflow>

Vector construction of TBX18 and SEMA4D

Vectors expressing the wildtype sequences of *TBX18* (pCMV6-TBX18, RC211838, OriGene Technologies, Inc.) or *Sema4d*-Fc-His (Addgene (ref #72157)) and a pGL3-Promoter reporter vector (Promega) were purchased and edited by site directed mutagenesis (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent)) using the primers listed in table S1 to obtain the missense variants p.Lys163Glu (positive control published by Vivante et al. (8)) and p.Arg349Gln in *TBX18*, p.Val212Met in *Sema4d* and the response element to *TBX18* (8), respectively. In all cases, the presence of point mutations and absence of errors were verified through Sanger sequencing (Figure S1). Additionally, nanoluc vector pNL1.1.TK[Nluc/TK] (Promega) was used for normalization of luciferase activity in the assays. For generation of the stable cell line, the wt and mutated versions of *Sema4d* were inserted into pcDNA™3.1 (+).

Cell culture

HEK293 cells were cultured and maintained in DMEM medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Origin: Brazil), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) (complete media), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. MC3T3 cells were cultured and maintained in Alpha-MEM medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Origin: Brazil), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) (complete media), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Stable cell line generation

To create stably transfected cells, 2500 ng of the pcDNA 3.1-*Sema4d* wt and 2500 ng of pcDNA 3.1-*Sema4d*-p.Val212Met constructs were transfected in HEK293 cells seeded in 6-well plates, using lipofectamin 3000 according to the manufacturer's instructions. At 48h post-transfection, cells were treated with 2.5 mg/mL of Geneticin (G418 Sulfate, Gibco) for

approximately two weeks (previously, a Geneticin mortality curve was performed for HEK293 cells and a 2.5 mg/mL concentration was selected for the obtention of stably transfected clones (Figure S2)). The surviving cells were collected and seeded in 96-well plates for three weeks, in serial dilutions to obtain the lowest possible number of cells per well. Five clones for pcDNA 3.1-*Sema4d* wt and six clones for pcDNA 3.1-*Sema4d*-p.Val212Met were obtained. To confirm the presence and integrity of the transfected constructs, genomic DNA was extracted and PCR amplifications were performed using specific primers for the *Sema4d* insert (Table S1). One clone per transfected vector was selected and verified by Sanger sequencing (Figure S3). The selected clones were maintained in DMEM medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Origin: Brazil), and 2.5 mg/mL Geneticin (Gibco) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Luciferase gene reporter assay

HEK293 cells were seeded at a density of 200,000 cells per well in 12-well plates. After 24 hours, the medium was replaced with 1 ml of DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were then transfected with 995 ng of TBX18 vector –either empty, WT, C+ or mutated vectors–, along with the pGL3 reporter vector with the TBX18 response element in a ratio of 2:1. Additionally, 5 ng of normalizer vector were included in the transfection mixture. The transfection was carried out with lipofectamin 3000 following the manufacturer's instruction. 48 hours post-transfection, cells were lysed to do the reporter assay using the Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Luciferase activity was determined with a Glomax Multi+ luminometer (Promega). All transfections were performed in triplicate, and experiments were repeated nine times.

Treatment of osteoblastic cells with Sema4d conditioned media

MC3T3 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in a 12-well plate with 80% Alpha-MEM medium (Gibco) and 20% conditioned medium. The conditioned medium was obtained from HEK293 stable cells seeded in 75cm² flasks until confluence. The culture medium was replaced with Alpha-MEM without FBS and antibiotic. After 24H, the medium was collected and mixed with 80% Alpha-MEM medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Origin: Brazil), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) and added to the MC3T3 cells. After 24 H, osteoblast differentiation was induced by adding 100µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and 5mM β-glycerophosphate (Thermo Fisher Scientific) to the complete medium for 7 days, replacing the medium every 72 h. Next, the RNA was extracted with High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's recommendations. Two µg of RNA were used for retro-transcription using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), followed by RT-qPCR with LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Basel, Switzerland) in a LightCycler480 (Roche, Basel, Switzerland) following the commercial protocol. Primers were designed from available mouse sequences using the primer analysis software Primer3 (Table S2). A mouse *Gapdh* gene was used as an internal control. The comparative threshold (Ct) method was used for data analysis expressed as $2^{-\Delta Ct}$. Three independent experiments were carried out for each biomarker.

Western blot assay

To assess the expression levels of mouse-*Sema4d* in the conditioned medium of HEK293 stable cells, the medium was collected after 24h of culture. The protein contained in the medium was concentrated with the Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices kit (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's protocol. Then, half of the total volume obtained (40µL) with the unquantified protein concentrate, were separated by electrophoresis in an SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), transferred to a hydrophobic PVDF transfer membrane (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA), and incubated with anti-His 6x Tag antibody (Invitrogen Catalog # MA1-21315), 1:500 was used. The membranes were developed using a peroxidase-conjugated secondary antibody anti-mouse IgG (A5906) 1:10000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), producing a total of 1 experiment for each sample.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), applying one-way or two-way Anova as appropriate. Data are expressed as mean $\pm$ SD and are representative of three or more independent experiments.

Results

***In silico* structural analysis of the candidate proteins likely involved in the bone phenotype**

We performed an *in silico* analysis of the five protein variants previously identified as candidates in a familial case of bone dysplasia (5): p.Arg349Gln (TBX18), p.Val212Met (SEMA4D), p.Asp436Asn (PTCH1), p.Glu724Gly (ADGRE5) and p.Thr675Met (PTK7).

Variant (p.Arg349Gln) in TBX18 is located in a disordered structure (Figure 1A, B) that is not so exposed to the surface to allow interactions with DNA or other proteins. The variant is close to, but outside of an alpha helix belonging to the functional T-Box domain that runs from aa 141 to 330. In the protein stability analysis (Table 1), a $\Delta\Delta G$ of -0.08 kcal/mol was observed for the TBX18 variant p.Arg349Gln, indicating that it is a neutral mutation.

Variant p.Val212Met in SEMA4D, and its corresponding position in Sema4d (*Mus musculus*) are located in the SEMA functional domain (Figure 3A, B); however, it is located in a beta-sheet structure towards the inside of the folded protein, which hinders its interaction with other proteins (Figure 1C, D, E, F). A $\Delta\Delta G$ of 0.123 kcal/mol for the human protein and 0.075 kcal/mol for the murine protein (Table 1), was observed for the SEMA4D variant p.Val212Met, suggesting that it is a neutral mutation.

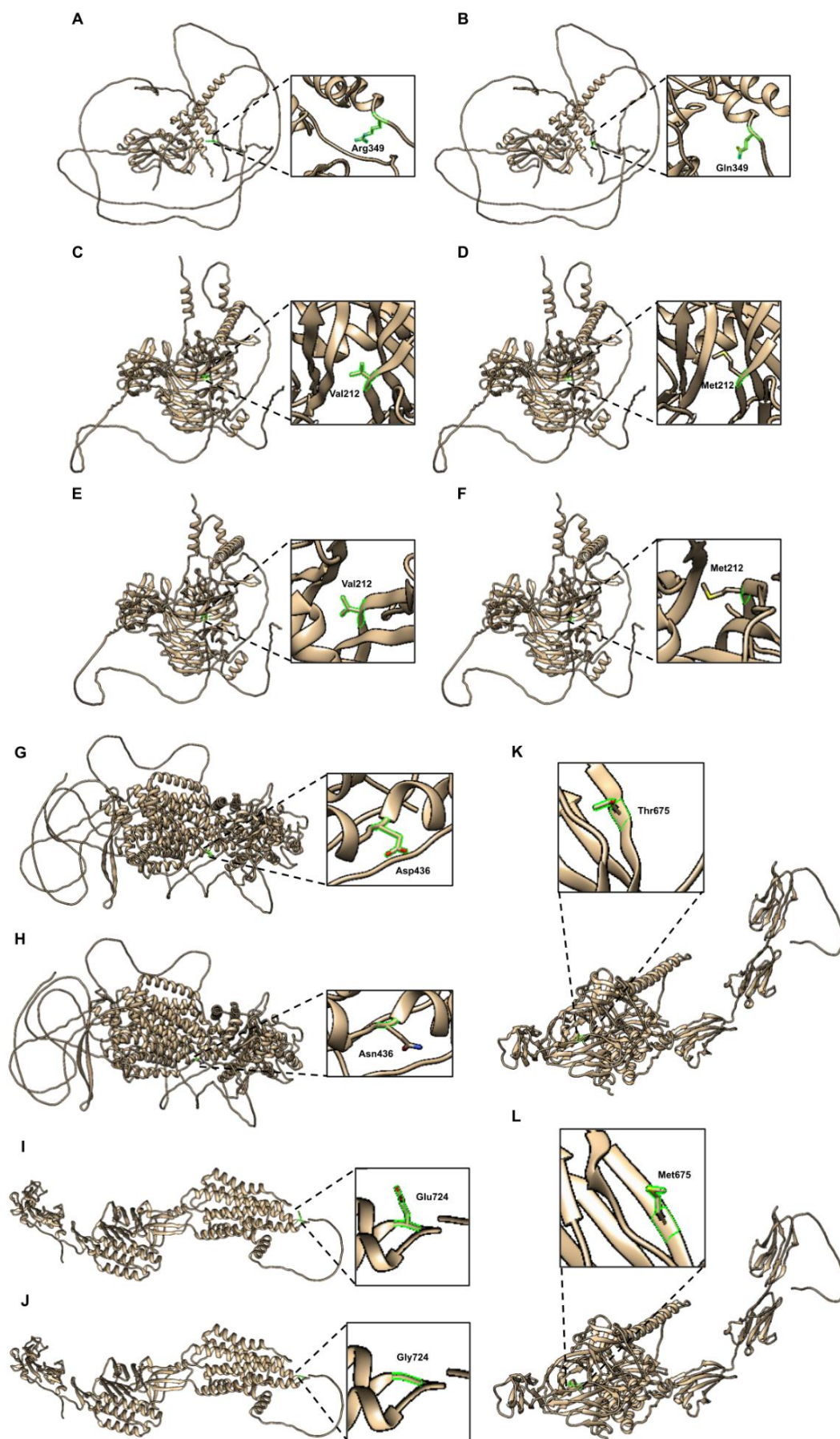


Figure 1. Three-dimensional models of the five candidate protein variants. A and B. TBX18, wt and mutated. C and D. human SEMA-4D wt and mutant. E and F. Murine Sema-4D wt and mutated. G and H. PTCH1 wt and mutated. I and J. ADGRE5 wt and mutated. K and L. PTK7 wt and mutated. The amino acids corresponding to the wt or variant sequences are shown in each of the boxes.

The analysis of the PTCH1 variant p.Asp436Asn, is (Figures 1G (wt) and 1H (p.Asp436Asn)) shows that the mutated amino acid is located in the functional sterol-sensing domain) which includes the aa 438-598 according to Uniprot (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q13635/entry#family_and_domains). Even though the mutation involves a change from an amino acid with a negatively charged polar radical group (Asp) to one with an uncharged polar radical group (Asn) (14), the mutation is neutral according to its $\Delta\Delta G$ of -0.079 kcal/mol (Table 1).

Variant p.Glu724Gly in ADGRE5 is located in a coil that joins two alpha-helices (Figures 1I and 1J) and downstream from the EGF-like calcium-binding functional domains, found between amino acids 22 to 257, and the GPS functional motif located between amino acids 495 to 543 (https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48960/entry#family_and_domains). In terms of stability analysis, this variant has a $\Delta\Delta G$ of 0.275 kcal/mol which means that it is a neutral mutation (Table 1), although the mutation generated a change between an amino acid with a negatively charged polar radical group and one with an aliphatic non-polar radical group (14).

Finally, the effect of the variant p.Thr675Met in PTK7 is shown in figures 1K (wt) and 1L (mutated) with magnification of the mutated amino acid found in a beta-sheet structure in the Ig-like C2-type 7 domain, which is located between amino acids 578-680, and upstream from the region of interaction with CTNNB1, which is located between amino acids 794-1070 (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q13308/entry#family_and_domains). In the protein stability analysis (Table 1), a $\Delta\Delta G$ of 0.053 kcal/mol was observed for this variant indicating that it is a neutral mutation.

The missense variants p.Arg349Gln (TBX18), p.Val212Met (SEMA4D), p.Asp436Asn (PTCH1), p.Glu724Gly (ADGRE5) and p.Thr675Met (PTK7) did not appear to generate any changes in the folding or three-dimensional structures of the proteins, as shown in the full structural models (Figure 1A-1L). Likewise, protein stability analyses indicated that none of these variants exerted a significant impact on protein stability (Table 1).

Table 1. Prediction of $\Delta\Delta G$ of the protein models mutated

Gene	Protein	Variant	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)*
<i>TBX18</i>	T-Box Transcription Factor 18	p.Arg349Gln	-0.08
<i>SEMA4D Homo sapiens</i>	Semaphorin 4D	p.Val212Met	0.123
<i>Sema4D Mus musculus</i>	Semaphorin 4D	p.Val212Met	0.075
<i>PTCH1</i>	Patched 1	p.Asp436Asn	-0.079
<i>ADGRE5</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor E5	p.Glu724Gly	0.275
<i>PTK7</i>	Protein Tyrosine Kinase 7	p.Thr675Met	0.053

* $\Delta\Delta G_{pred} < -1.0$ kcal/mole indicates a destabilizing mutation

$\Delta\Delta G_{pred} > 1.0$ kcal/mole indicates a stabilizing mutation

$-1.0 \leq \Delta\Delta G_{pred} \leq 1.0$ kcal/mole indicates a neutral mutation (15)

Functional validation of the p.Arg349Gln variant identified in the *TBX18* transcription factor

The p.Arg349Gln variant found in the *TBX18* transcription factor was selected as one of the candidates for functional validation given the putative role of this transcription factor in bone development. Moreover, the variant displayed the highest predicted pathogenicity, i.e. a CADD score of 29, and was considered to be deleterious by SIFT and probably damaging by PolyPhen in the previous study (5). The *TBX18* gene is composed of 8 exons and codes for a protein of 607 amino acids (Figure 2A). This protein has three domains located between 18 and 330 amino acids: the NLS region (amino acids 18-28) corresponding to the nuclear localisation peptide; the engrailed homology-1 EH1 motif located between amino acids 36 and 40; and the functional DNA binding domain called T-box domain, located between amino acids 141 and 330 (Figure 2A). The p.Arg349Gln variant is encoded in exon 7, near the T-box domain. Interestingly, residue 349 is fully conserved among the *TBX18* from different vertebrate species as depicted in Figure 2B.

A luciferase reporter assay was performed in order to assess the role of the p.Arg349Gln variant in the *TBX18* regulatory activity. The pGL3 reporter vector containing the response element to *TBX18* was co-transfected into HEK293 cells along with expression vectors encoding either wt *TBX18*, p.Lys163Glu *TBX18* (used as a positive control), p.Arg349Gln *TBX18* or an empty *TBX18* expression vector. Figure 3C depicts the luciferase activity of nine independent experiments. Construct p.Arg349Gln *TBX18* presented similar luciferase activity than wt *TBX18*. On the other hand, statistically significant differences were found between the activity of the p.Lys163Glu *TBX18* vector and those of wt *TBX18* (p -value= 4.1×10^{-5}), and p.Arg349Gln *TBX18* (p -value= 4.1×10^{-5} ; Figure 3C).

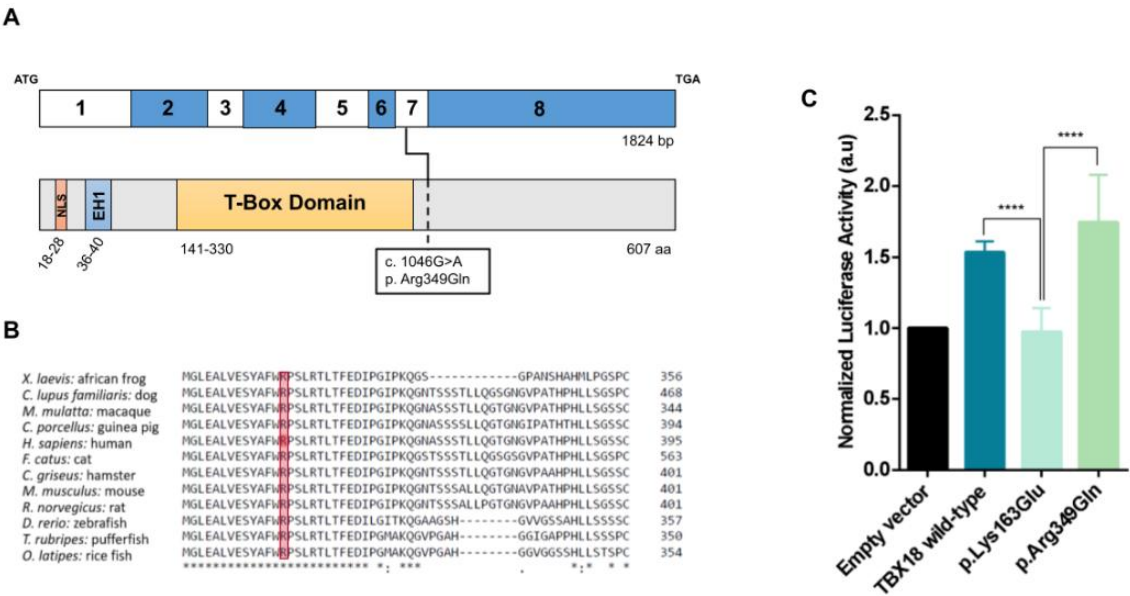


Figure 2. Functional validation of the TBX18 p.Arg349Gln variant A. Schematic representation of the cDNA (top) and protein domains (bottom). TBX18 contains a nuclear localisation signal (NLS, orange), an engrailed homology-1 motif (EH1, blue), and a T-Box DNA-binding domain (yellow). Image taken and adapted from Vivante et al. 2015. B. Multiple alignment of TBX18 sequences from different vertebrate species. Residue Arg349 is marked with the red box. (*) Indicates a fully conserved residue; (:) indicates conservation of residues with similar properties; (.) indicates conservation of residues with weakly similar properties. C. Luciferase transcriptional reporter assay for TBX18 wt and mutant constructs. Luciferase activity in each condition was normalised by empty vector activity. Results are expressed as the mean±SD (Standard Deviation) of 9 independent experiments. One-way Anova test: **** p<0.0001.

Functional validation of the p.Val212Met variant identified in the SEMA4D protein

Next, the p.Val212Met variant in SEMA4D was selected for functional validation, given the putative role of SEMA4D in bone biology and because it displayed the second highest CADD score (of 22.9), and was considered to be deleterious by SIFT and probably damaging by PolyPhen (5). The SEMA4D human (Figure 3A) and murine (Figure 3B) coding regions are split into 16 exons, encompass 2589 and 2586 nucleotides, respectively, and code for proteins of 862 amino acids (in the human) and 861 amino acids (in mouse).

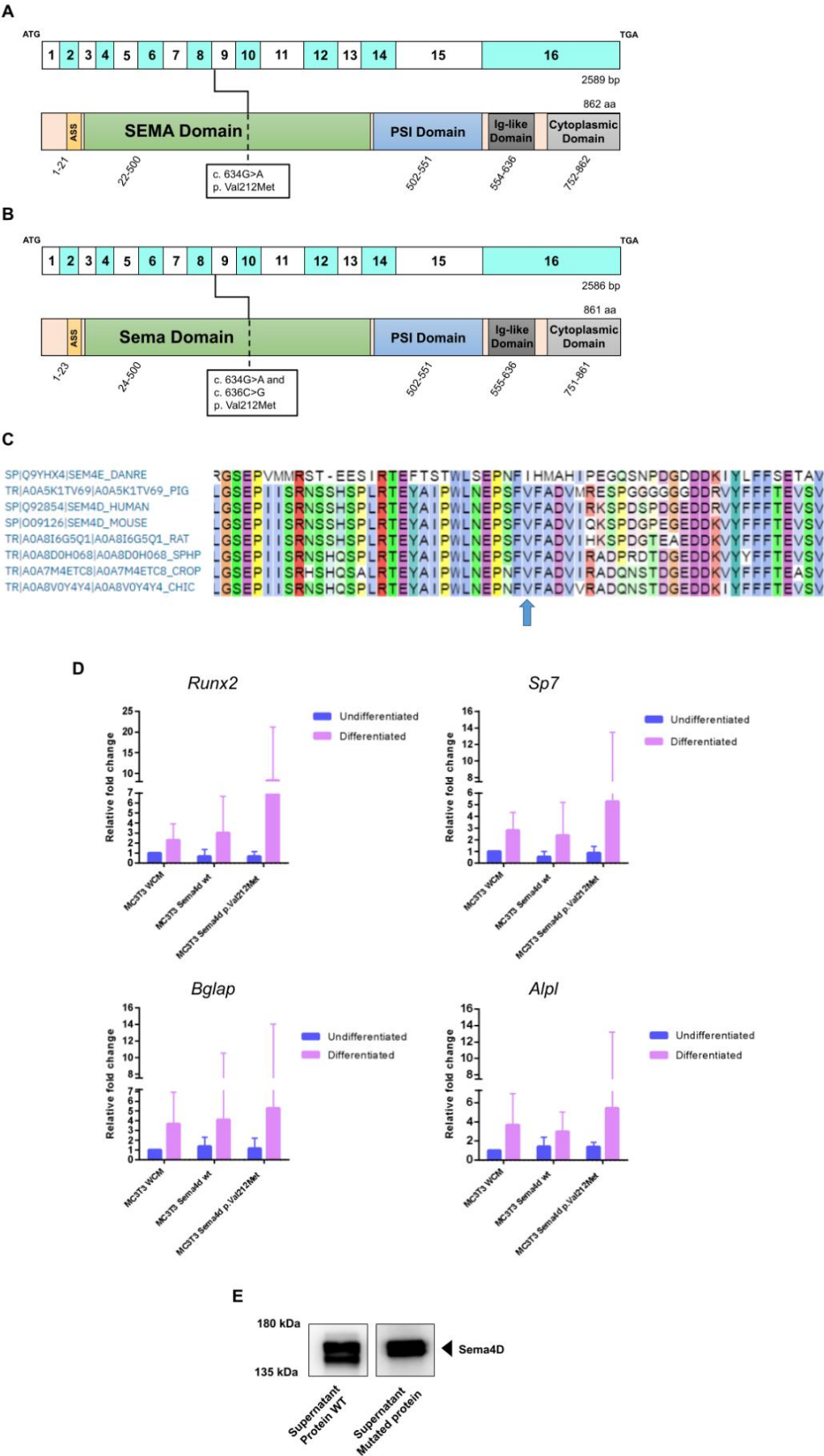


Figure 3. Functional validation of the p.Val212Met variant found in the SEMA4D protein. A. Schematic representation of the cDNA (top) and protein domains (bottom) of the human SEMA4D protein. B. Schematic representation of the cDNA (top) and protein domains (bottom) of the mouse Sema4D protein. ASS: Amino-terminal signal sequence. PSI: Protein-Sialylation Inhibitor (cysteine-rich region). C. Partial alignment of SEMA4D sequences from different vertebrate species. The residue Val212 is marked with the blue arrow. D. Expression of osteoblast mRNA markers in cells treated with conditioned medium before (blue bars) and after (violet bars) induction of differentiation with 5mM β -glycerophosphate and 100 μ g/mL ascorbic acid for 7 days. Results are expressed as the mean $\pm$ SD (Standard Deviation) of 3 independent experiments. E. Western blot to analyse the expression of Sema4D in the culture medium supernatant of the stable cell line generated. The result corresponds to a single replicate.

Both the human and murine SEMA4D proteins have five domains: The amino-terminal signal sequence, ASS (amino acids 1-21 and 1-23, respectively); the SEMA domain (amino acids 22-500 and 24-500, respectively); the PSI domain: Protein-Sialylation Inhibitor, which is a cysteine-rich region (amino acids 502-551 in both proteins); the Ig-like domain (amino acids 554-636 and 555-636, respectively) and the Cytoplasmic domain between amino acids 752-862 and 751-861, respectively (Figures 3A and 3B). The p.Val212Met variant is located at the beginning of exon 9, in the SEMA domain, which is involved in the direct interaction with plexin B1 at the surface of osteoblasts. At the cDNA level, in *Homo sapiens* the p.Val212Met variant involves the change of a single nucleotide G>A, at position 634 (Figure 3A), while for *Mus musculus*, the variant is generated by the change of two nucleotides G>A and C>G at positions 634 and 636, respectively (Figure 3B). The residue 212 is well conserved among the SEMA4D from different vertebrate species as depicted in Figure 3C.

To assess the role of the p.Val212Met variant in osteoblastogenesis, we determined the mRNA expression of four osteoblast biomarkers, *Runx2*, *Sp7*, *Bglap* and *Alpl*, in MC3T3 cells treated with conditioned medium containing either wt Sema4d, mutant Sema4d or no Sema4d (Figure 3D). Although no statistically significant differences were observed between wt Sema4d and mutant Sema4d for any of the biomarkers analyzed, an increased trend was observed in the expression of all the osteoblastic biomarkers in differentiated osteoblasts, when cells were treated with the mutated Sema4d. Finally, we performed a western blot to analyse the presence of the wt and mutated semaphorin protein in the conditioned medium with which we treated the MC3T3 cells, to check that it was being properly secreted (Figure 3E).

Discussion

Here, we performed functional tests of five variants previously found in a familial case of bone dysplasia. To do this, we first performed an *in silico* approach by analysing the three-dimensional models of the wt and variant proteins to observe whether the variants were predicted to cause any conformational changes in the structure or folding of the proteins. In addition, we analysed whether the variants were predicted to lead to changes in protein stability. None of the variants was predicted to cause significant conformational changes or to modify protein stability. Nevertheless, based on prediction scores from SIFT, Polyphen

and CADD, and on their role in bone development and function, we selected the variants found in TBX18 (p.Arg349Gln) and SEMA4D (p.Val212Met) for *in vitro* studies consisting of either a Luciferase reporter assay to evaluate the effect of p.Arg349Gln on the regulatory function of TBX18, or an MC3T3 osteoblast differentiation assay with conditioned medium containing the wt or variant SEMA4D protein to assess the variant's effect on the biological function of the protein.

TBX18 has been reported to be a regulator of transcription acting mainly through repression. TBX18 is a member of the T-box transcription factor family, which is expressed in various organs during embryogenesis (7). Various human disorders, mainly related to cardiac conditions, have been linked to mutations in the T-box gene family. However, severe skeletal ossification defects in the vertebral column in *Tbx18*-deficient mice have been reported, (16).

In the variant TBX18 p.Arg349Gln analyzed in this study, the substitution of arginine (Arg) to glutamine (Gln) at the position 349 implicates a change in the physicochemical properties of the amino acid. Arginine is a positively charged amino acid with a long side chain, while glutamine is uncharged and has a short side chain (14). This alteration could affect interaction with DNA. Even though the residue is found close but outside the T-box domain, the change in the properties of the residue could have an impact on the transcriptional activity (17). However, our luciferase assay results demonstrated that the activity of the p.Arg349Gln TBX18 variant did not differ from that of wild-type TBX18, indicating that the amino acid substitution does not significantly affect the function of the protein. Contrary to what would be expected for a transcriptional repressor, the results of our luciferase assays showed an increase in activity when cells were transfected with wild-type TBX18, in comparison to cells transfected with empty vector. A possible explanation for this unexpected result may be found in Rivera-Reyes et al. 2018 (18), where molecular partners of TBX18 are identified, some of which act to co-activate, rather than repress transcription. It would be interesting to test whether any of these co-activators are present in the HEK293 cells we used. Mutation p.Lys163Glu was reported in Vivante et al. 2015 (8). In our results, this mutation behaves significantly different from wt TBX18, failing to activate transcription, in agreement with this previous study. Taken together, our results do not support a functional role for variant p.Arg349Gln of TBX18.

SEMA4D is a gene encoding the 4D semaphorin protein, a member of the highly conserved semaphorin family (13,19,20). SEMA4D plays an important role in the development of the GABAergic synapse, in cell-cell signalling, in the regulation of the immune system (21) and, some years ago, evidence of its involvement in bone remodelling was found (22). SEMA4D is expressed in osteoclasts and binds to the Plexin-B1 receptor (PLXNB1) on the surface of osteoblasts, inhibiting osteoblast differentiation. Binding of SEMA4D to PLXNB1 activates a small protein RHOA GTPase and subsequently suppresses osteoblast differentiation through blocking insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-mediated signalling. Studies in mice lacking *Sema4d* showed high bone mass with increased bone formation activity and increased bone strength. Furthermore, *Plxnb1* knockout mice showed bone phenotypes similar to those observed in *Sema4d*-deficient mice, suggesting that SEMA4D and PLXNB1 act in the same pathway. Also, assays carried out on calvarial cells cultured under

osteogenic conditions showed that SEMA4D was able to suppress bone nodule formation, alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin (*Bglap*) and collagen type I (*Col1a1*) expression in a dose-dependent manner (23).

For the functional validation of the SEMA4D p.Val212Met variant, we used a commercially available mouse plasmid to obtain the wt Sema4d protein, and engineered cell lines stably expressing and secreting either wt or mutant murine Sema4d to then treat osteoblasts with these soluble proteins. In our differentiation assays of osteoblasts treated with conditioned medium we could not observe an inhibitory effect of wt Sema4d on osteoblastogenesis, nor significant differences between wt and mutant Sema4d. However, we observed a trend towards increased expression of osteoblastic markers after treatment with mutated SEMA4D. The lack of the expected repression of osteoblast differentiation based on the literature (23–26) could be explained by an insufficient concentration of the protein in the conditioned medium. Although in the western blot assay we observed expression of the wt and mutant protein in the conditioned medium, we were not able to quantify its concentration. As mentioned above, the inhibitory capacity of SEMA4D on osteoblastogenesis has been demonstrated in a dose-dependent manner (23). Indeed, Yang YH et al. (2016) (27) reported the inhibitory effect of Semaphorin 4D in osteoblastogenesis, using the soluble protein collected and purified from transient transfection of 293T cells, at concentrations from 0 to 400 ng/mL, finding greater inhibitory effect at the higher concentration. However, in assays performed with conditioned medium obtained from wt osteoclast culture added to calvarial cells, no effects were observed on bone nodule formation, nor on ALP activity, nor on the expression of osteoblastic biomarkers such as *Bglap* and *Col1a1*, suggesting that membrane-bound Sema4D has a larger role in suppression of bone formation than the treatment with the soluble portion alone (23). On the other hand, *in vitro* assays with conditioned media have some limitations. There is a high heterogeneity and variability in the composition of secretomes depending on cell type, culture conditions and number of cellular passages, as well as the way in which the conditioned media are obtained (28–30). These variables may have affected the results we obtained in our trials. Future studies involving a precise characterisation of the secretome of our stable cells, along with a precise determination of the concentration of secreted Sema4d protein in the conditioned medium will be necessary to have conclusive results.

In the *in silico* studies, we did not observe relevant changes in the conformational structure or stability of the proteins in any of the variants analysed. These findings lead us to suggest that there may be other variants in non-coding regions or some rare penetrant variant with a greater effect that we may have overlooked in our analysis and that may be responsible for the bone phenotype in the family case studied. Further studies and analyses should be conducted to confirm these suspicions.

There are some limitations to this work, *in vitro* functional validations have only been performed for two of the variants found, which gives us a partial view of the study that should be completed at least with *in vitro* studies of the other variants. Furthermore, the use of conditioned medium is also a limiting factor in the present work, as it can be affected by the

type of cells used, the number of cell passages and the culture conditions, factors that often cannot be fully controlled.

Conclusion

In conclusion, according to our *in silico* analysis, none of the variants found generate an alteration in the conformational structure or stability of the proteins involved. Furthermore, in our system, the p.Arg349Gln variant in *TBX18* does not affect the activity of this transcription factor. Finally, our osteoblast differentiation assays to functionally validate the p.Val212Met variant in *SEMA4D* did not allow us to find conclusive results, requiring future experiments to solve this.

References

1. Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2019 Dec;179(12):2393–419. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.61366>
2. Tang J, Zhou C, Shi H, Mo Y, Tan W, Sun T, et al. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias using whole exome sequencing in China. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020 Aug;507:187–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.031>
3. Offiah AC, Hall CM. The radiologic diagnosis of skeletal dysplasias: past, present and future. *Pediatr Radiol* [Internet]. 2020 Nov;50(12):1650–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00247-019-04533-y>
4. Greenspan A. Sclerosing bone dysplasias--a target-site approach. *Skeletal Radiol* [Internet]. 1991;20(8):561–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01106087>
5. Ovejero D, Garcia-Giralt N, Martínez-Gil N, Rabionet R, Balcells S, Grinberg D, et al. Clinical description and genetic analysis of a novel familial skeletal dysplasia characterized by high bone mass and lucent bone lesions. *Bone* [Internet]. 2022 Aug;161:116450. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2022.116450>
6. Yi CH, Terrett JA, Li QY, Ellington K, Packham EA, Armstrong-Buisseret L, et al. Identification, mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: EOMES, TBX6, TBX18, and TBX19. *Genomics* [Internet]. 1999 Jan 1;55(1):10–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1998.5632>
7. Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. Epigenetic regulation of Tbx18 gene expression during endochondral bone formation. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2015 Feb;359(2):503–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-2028-0>
8. Vivante A, Kleppa MJ, Schulz J, Kohl S, Sharma A, Chen J, et al. Mutations in TBX18 Cause Dominant Urinary Tract Malformations via Transcriptional Dysregulation of Ureter Development. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2015 Aug 6;97(2):291–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.07.001>
9. Takegahara N, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2005 Sep

- 29;360(1461):1673–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2005.1696>
10. Tamagnone L, Comoglio PM. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2000 Sep;10(9):377–83. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01816-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01816-x)
 11. Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, Wang X, Shi W, Araki H, et al. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* [Internet]. 2000 Nov;13(5):621–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00062-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00062-5)
 12. Verlinden L, Vanderschueren D, Verstuyf A. Semaphorin signaling in bone. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2016 Sep 5;432:66–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.009>
 13. Lontos K, Adamik J, Tsagianni A, Galson DL, Chirgwin JM, Suvannasankha A. The Role of Semaphorin 4D in Bone Remodeling and Cancer Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018 Jun 19;9:322. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00322>
 14. The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology* [Internet]. 1986 Mar 21 [cited 2025 Aug 14];119(2):205–18. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80075-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80075-3)
 15. Capriotti E, Fariselli P, Rossi I, Casadio R. A three-state prediction of single point mutations on protein stability changes. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2008 Mar 26;9 Suppl 2(Suppl 2):S6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-S2-S6>
 16. Bussen M, Petry M, Schuster-Gossler K, Leitges M, Gossler A, Kispert A. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev* [Internet]. 2004 May 15;18(10):1209–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.300104>
 17. Brendel V, Karlin S. Association of charge clusters with functional domains of cellular transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989 Aug;86(15):5698–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.15.5698>
 18. Rivera-Reyes R, Kleppa MJ, Kispert A. Proteomic analysis identifies transcriptional cofactors and homeobox transcription factors as TBX18 binding proteins. *PLoS One* [Internet]. 2018 Aug 2;13(8):e0200964. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200964>
 19. Hall KT, Boumsell L, Schultze JL, Boussiotis VA, Dorfman DM, Cardoso AA, et al. Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Oct 15;93(21):11780–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.21.11780>
 20. Janssen BJC, Robinson RA, Pérez-Brangulí F, Bell CH, Mitchell KJ, Siebold C, et al. Structural basis of semaphorin-plexin signalling. *Nature* [Internet]. 2010 Oct 28;467(7319):1118–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09468>
 21. Vodrazka P, Korostylev A, Hirschberg A, Swiercz JM, Worzfeld T, Deng S, et al. The

- semaphorin 4D-plexin-B signalling complex regulates dendritic and axonal complexity in developing neurons via diverse pathways. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2009 Oct;30(7):1193–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06934.x>
22. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* [Internet]. 2020 Sep 10;9(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9092073>
 23. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* [Internet]. 2011 Oct 23;17(11):1473–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2489>
 24. Hisamoto M, Kimura S, Iwata K, Iwanaga T, Yokoyama A. Inhibition of RANKL and Sema4D improves residual ridge resorption in mice. *Scientific Reports* [Internet]. 2022 Mar 8 [cited 2025 Aug 19];12(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-08016-3>
 25. Ishii T, Ruiz-Torruella M, Kim JY, Kanzaki H, Albassam A, Wisitrasameewong W, et al. Soluble Sema4D cleaved from osteoclast precursors by TACE suppresses osteoblastogenesis. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2023 Jun;27(12):1750–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.17416>
 26. Discovery and identification of semaphorin 4D as a bioindicator of high fracture incidence in type 2 diabetic mice with glucose control. *Journal of Advanced Research* [Internet]. 2025 Mar 10 [cited 2025 Aug 19]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2025.03.014>
 27. Yang YH, Buhamrah A, Schneider A, Lin YL, Zhou H, Bugshan A, et al. Semaphorin 4D Promotes Skeletal Metastasis in Breast Cancer. *PLoS One* [Internet]. 2016 Feb 24;11(2):e0150151. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150151>
 28. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics* [Internet]. 2011 Feb;11(4):794–804. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000530>
 29. Veronesi F, Borsari V, Sartori M, Orciani M, Mattioli-Belmonte M, Fini M. The use of cell conditioned medium for musculoskeletal tissue regeneration. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018 Jun;233(6):4423–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26291>
 30. Rosochowicz MA, Lach MS, Richter M, Suchorska WM, Trzeciak T. Conditioned Medium – Is it an Undervalued Lab Waste with the Potential for Osteoarthritis Management? *Stem Cell Reviews and Reports* [Internet]. 2023 Feb 15 [cited 2025 Aug 19];19(5):1185–213. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-023-10517-1>

Supplementary Material

Functional assessment of rare genetic variants found in a family with skeletal dysplasia and high bone mass

Juan David Patiño-Salazar¹, Diana Ovejero², María Gabernet¹, Javier Forte-Martínez¹, Mónica Cozar¹, Susanna Balcells¹, Daniel Grinberg¹, Xavier Nogués², Iñigo Etxebarria Foronda³, Raquel Rabionet¹, Natalia Garcia-Giralt²

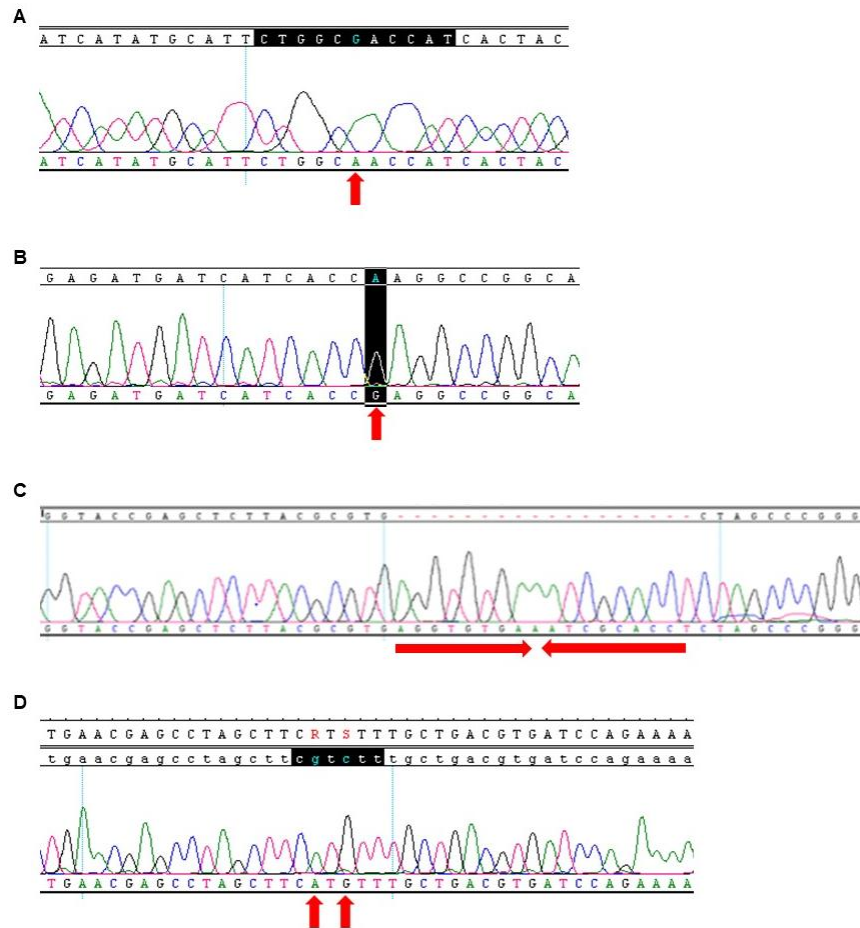
¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain.

²Musculoskeletal Research Group, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Centro de Investigación Biomédica en Red en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), ISCIII, Barcelona, Spain.

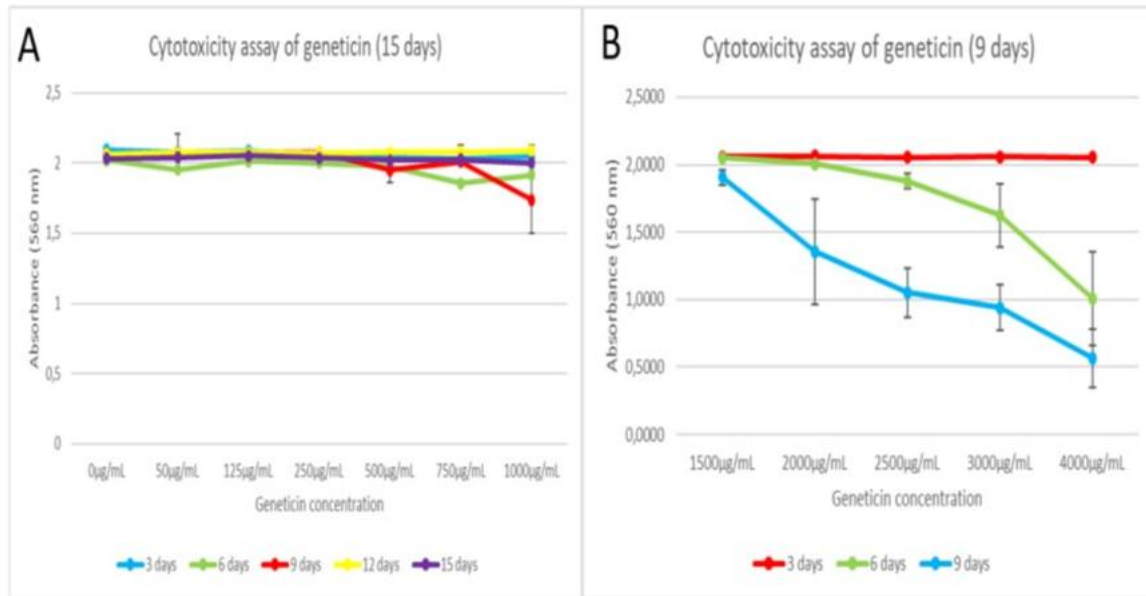
³Traumatology and Orthopedic Surgery Department, Hospital Alto Deba, Gipuzkoa, Spain

Corresponding author:

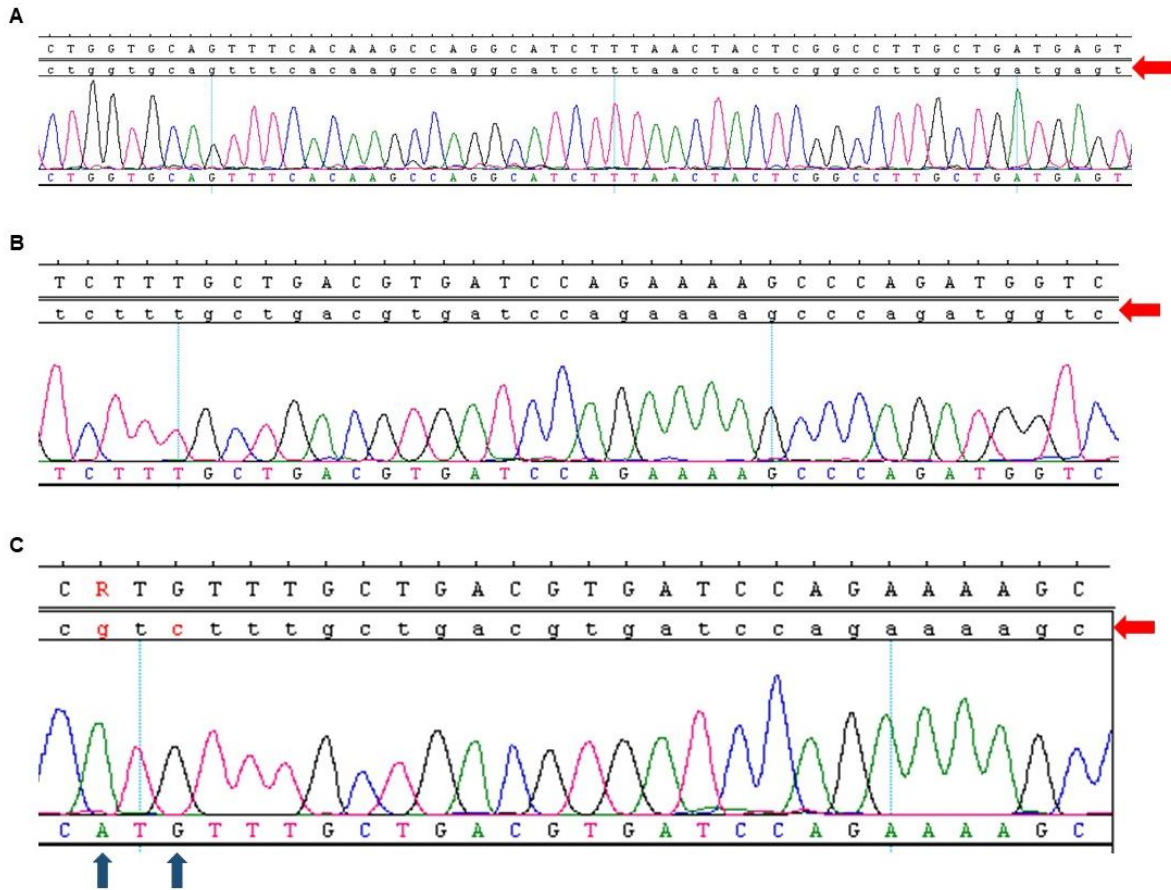
Raquel Rabionet: kelly.rabionet@ub.edu



Supplementary Figure S1. Sanger sequencing of site-directed mutagenesis of *TBX18* assays. A. Sanger sequencing of site-directed mutagenesis for c.1046G>A-p.Arg349Gln in *TBX18*. The change is indicated by the red arrow. B. Sanger sequencing of site-directed mutagenesis for c.487A>G-p.Lys163Glu in *TBX18*. The change is indicated by the red arrow. C. Sanger sequencing of site-directed mutagenesis for insertion of the *TBX18* DNA-binding region in pGL3-Promoter vector. The insertion is indicated by the red arrows. D. Sanger sequencing of site-directed mutagenesis for c.634G>A and 636C>G-p.Val212Met in *Sema4d* from mouse. The changes are indicated by the red arrows.



Supplementary Figure S2. Metabolic activity of HEK 293 cells treated with different geneticin concentrations. A. Cytotoxicity assay with lower geneticin concentrations for 15 days. B. Cytotoxicity assay with higher geneticin concentrations for 9 days.



Supplementary Figure S3. Sanger sequencing of stable cell line generation assays. A. Sanger sequencing of subcloning of the semaphorin protein fragment of the plasmid Sema4d-Fc-His into the vector pcDNA™3.1 (+). The *Sema4d* wt sequence is indicated by red arrow. B. Sanger sequencing of genomic DNA from stable HEK line expressing the semaphorin wt. The *Sema4d* wt sequence is indicated by red arrow. C. Sanger sequencing of genomic DNA from stable HEK line expressing the semaphorin mutated. The *Sema4d* wt sequence is indicated by red arrow. The changes are indicated by the blue arrows.

Supplementary Table S1. Primers to site-directed mutagenesis

NAME	SEQUENCE
Primers to site-directed mutagenesis for insertion of the <i>TBX18</i> DNA-binding region in pGL3-Promoter vector	Fw 5'-ctatcgataggtaccgaggtgtgaaatcgacctaagctcttacgcgtgct-3' Rv 5'-agcacgcgtaagagctaggtgcgatttcacacctcggtacctatcgatag-3'
Primers to site-directed mutagenesis for c.1046G>A-p.Arg349Gln in <i>TBX18</i>	Fw 5'-atcatatgcattctggcaaccatcactacggactc-3' Rv 5'-gagtcgtagtgatggttgccagaatgcatatgat-3'
Primers to site-directed mutagenesis for c.487A>G-p.Lys163Glu in <i>TBX18</i>	Fw 5'-gatgatcatcaccgaggccggcaggcg-3' Rv 5'-cgctgcccggcctcggtgatgatcatc-3'
Primers to check site-directed mutagenesis of two <i>TBX18</i> variants	Fw 5'-cttcccctctggcgtcac-3' Rv 5'-gtcgaagctgataacttgttca-3'
Primers to site-directed mutagenesis for c.634G>A and 636C>G-p.Val212Met in <i>Sema4d</i> from mouse	Fw 5'-ctgaacgagcctagctcatgtttgctgacgtgatccag-3' Rv 5'-ctggatcacgtcagcaaacatgaagctaggctcggtcag-3'
Primers to check site-directed mutagenesis of <i>Sema4d</i> variant	Fw 5'-tgcgctgaacatctctgaga-3' Rv 5'-ctcgcgggatcatcaacttg-3'

Supplementary Table S2. Primers used for RT-PCR analyses. Primers were designed from available mouse sequences using the primer analysis software Primer3

NAME	ORGANISM	SEQUENCE
<i>Gapdh</i>	Mouse	Fw 5'-accatcatccctgcctctac-3' Rv 5'-cctgttgctgtagccaaat-3'
<i>Runx2</i>	Mouse	Fw 5'-cctgaactctgcaccaagtcct-3' Rv 5'-tcatctggctcagataggaggg-3'
<i>Sp7</i>	Mouse	Fw 5'-catccctatggctcgtggta-3' Rv 5'-tgggtaaggggagcaaagt-3'
<i>Bglap</i>	Mouse	Fw 5'-gcaataaggtagtgaacagactcc-3' Rv 5'-ccatagatgcgtttgtaggcgg-3'
<i>Alpl</i>	Mouse	Fw 5'-ccagaaagacacctgactgtgg-3' Rv 5'-tctgtccgtgtcgtcaccat -3'

CAPÍTULO 3: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DEL FENOTIPO ÓSEO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER TIPO 1 (EG1).

Artículo 4

Generation and characterization of bone cell lines with *Gba1* mutations as cell-intrinsic models of Gaucher's bone disease

Resumen:

La enfermedad de Gaucher (EG) está causada por mutaciones en el gen *GBA1*, que generan acumulación lisosomal de glucosilceramidas. Los fenotipos óseos relacionados con la EG incluyen deformidad en matraz Erlenmeyer, osteosclerosis, osteonecrosis, osteopenia y dolor óseo. Nuestro objetivo fue generar y caracterizar *in vitro* modelos celulares óseos de EG. Se eliminó el gen *Gba1* mediante CRISPR/Cas9 en dos tipos de células de roedores: ROS17/2.8 y RAW264.7. Se seleccionaron dos clones ROS17/2.8 KO y uno RAW264.7 KO, que no mostraron actividad enzimática de *GBA1*. Se determinó la expresión de biomarcadores óseos. No se observaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de *Runx2*, *Bglap* y *Opg* en las células ROS entre las células *Gba1*KO y el control, antes y después de la diferenciación. Tras el estímulo mecánico, la expresión de *Opg* se redujo significativamente en las células KO en comparación con el control, y se observó un aumento significativo en la capacidad de mineralización de las células ROS-*Gba1*KO. En cuanto a las células RAW-*Gba1*KO, se observó un aumento significativo del ARNm de *Acp5* y de la enzima catepsina K antes de la diferenciación, y un aumento de la actividad de TRAcP tras 4 días de diferenciación en comparación con los osteoclastos wt. En conclusión, la falta de actividad de *Gba1* indujo cambios tanto en los modelos de osteoblastos como de osteoclastos, incluyendo un importante defecto intrínseco osteoclástico.

Referencia:

Generation and characterization of bone cell lines with *Gba1* mutations as cell-intrinsic models of Gaucher's bone disease Juan-David Patiño-Salazar, Sara

Heredero-Jimenez, Eduardo Martín-Guerrero, Núria Martínez-Gil, Mónica Cozar, Diana Ovejero, Xavier Nogués, Laura Cinque, Juan A Ardura, Arancha R Gortazar, Daniel Grinberg, Susanna Balcells, Natalia Garcia-Giralt, and Raquel Rabionet. *Sometido a Biochemistry and Biophysics Reports.*

Revised manuscript clean version

Generation and characterization of bone cell lines with *Gba1* mutations as cell-intrinsic models of Gaucher's bone disease

Juan-David Patiño-Salazar ¹, Sara Heredero-Jimenez ², Eduardo Martín-Guerrero ², Núria Martínez-Gil ^{1#}, Mónica Cozar ¹, Diana Ovejero ³, Xavier Nogués ³, Laura Cinque⁴, Juan A Ardura ², Arancha R Gortazar ², Daniel Grinberg ¹, Susanna Balcells ¹, Natalia Garcia-Giralt ^{3*}, and Raquel Rabionet ^{1*}

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain.

² Bone physiopathology laboratory, Institute of Applied Molecular Medicine (IMMA), San Pablo-CEU University, CEU Universities, Campus Montepíncipe, Madrid, Spain.

³ Musculoskeletal Research Group, Hospital del Mar Research Institute, CIBERFES, ISCIII, Barcelona, Spain.

⁴ Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples, Italy

Present address: Department of Clinical and Molecular Genetics, Vall d'Hebron University Hospital, Medical Genetics Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain.

* Corresponding author:

Natalia Garcia-Giralt: ngarcia@researchmar.net

Highlights

HIGHLIGHTS

- A major intrinsic osteoclastic defect was detected in Gaucher bone cells (*Gba1*KO)
- Results suggest an impaired osteoblast-osteoclast cross-talk
- Osteoclasts would be the main drivers of bone pathology in the Gaucher disease

ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is caused by mutations in the *GBA1* gene generating lysosomal accumulation of glucosylceramides. Bone phenotypes related to GD include Erlenmeyer flask deformity, osteosclerosis, osteonecrosis, osteopenia, and bone pain. We aimed to *in vitro* generate and characterize bone cellular models of GD. *Gba1* was knocked-out with CRISPR/Cas9 in two rodent cell types: ROS17/2.8 and RAW264.7. Two ROS17/2.8 KO and one RAW264.7 clones were selected, displaying no GBA1 enzymatic activity. Expression of bone biomarkers was determined. No significant differences were observed in mRNA expression of *Runx2*, *Bglap*, and *Opg* in the ROS cells between *Gba1*KO cells and control, before and after differentiation. After mechanical stimulus, expression of *Opg* was significantly reduced in KO cells compared to control, and we observed a significant increase in mineralization capacity of ROS-*Gba1*KO cells. As for the RAW-*Gba1*KO cells, we observed a significant increase of *Acp5* mRNA and cathepsin K enzyme before differentiation, and increased TRAcP activity after 4 days of differentiation compared to wt osteoclasts. In conclusion, lack of *Gba1* activity induced changes in both osteoblast and osteoclast models, including a major intrinsic osteoclastic defect.

Keywords: Gaucher disease; *Gba1* mutations; bone cell lines; osteoblasts; osteoclasts.

1. Introduction

Gaucher disease (GD, OMIM #230800, ORPHA355) is a rare autosomal recessive disorder caused by biallelic pathogenic variants in the *GBA1* gene (GRCh37/hg19 Chromosome 1: 155,204,239 to 155,214,653), leading to deficient activity of glucocerebrosidase (GCase; EC 3.2.1.45; *GBA1*) which generates accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine in lysosomes of the monocyte/macrophage system [1].

The accumulation mainly affects the mononuclear phagocyte system, spleen, liver, bone marrow, osteoclasts, and CNS, producing clinical manifestations such as splenomegaly, hepatomegaly, cytopenia, and bone lesions [2]. Gaucher disease phenotype is variable, but three clinical forms have been identified according to the severity of neuronopathic involvement, named non-neuronopathic (GD1, OMIM 230800); acute neuronopathic (GD2, OMIM 230900); and chronic or subacute neuronopathic (GD3, OMIM 231000) [3,4].

GD1 is the most common form, presenting with hepatosplenomegaly, pancytopenia, and extensive bone involvement (e.g., osteonecrosis, fractures, osteolytic lesions, Erlenmeyer flask deformity), often leading to disability and reduced quality of life. GD2 is a severe, early-onset form characterized by rapid neurologic decline, hepatosplenomegaly, and death usually by age 2. GD3 is the subacute form of neuronopathic Gaucher disease. It has later onset and slower progression compared to the acute form of GD2 [5,6].

There are some interesting genotype-phenotype correlations that should be mentioned. The N370S mutation (p.N409S), one of the most prevalent GD mutations, causes GD1, while L444P (p.L483P), another prevalent mutation, is present in patients with GD2 or GD3. Bearing one allele with the N370S mutation is sufficient to present with a non-neuronopathic disease, independently of the mutation in the other allele. The N370S mutation (and a few other variants) present in GD1 patients, give rise to a *GBA* enzyme with a relatively high residual activity [7].

GD1 is the most frequent type of the disease and presents skeletal symptoms in up to 80% of patients, which significantly reduces their quality of life. Bone remodeling involves the crosstalk between bone-forming cells (osteoblasts) and bone-resorbing cells (osteoclasts) and is essential for bone homeostasis. Mechanical stimulus plays an important role through the activation of osteoblasts to produce osteoprotegerin (Opg), which protects against osteoclast-mediated bone resorption [8,9]. Bone involvement in GD may also include medullary and corticocancellous infarcts, pathological fractures, osteonecrosis of humeral or femoral heads, and collapse of vertebrae [10–12]. Nowadays, the precise mechanisms underlying the bone physiopathology in GD are still unclear.

Lysosomes, as part of the autophagy pathway, play important roles in regulating osteoblast differentiation and osteoclast maturation [13]. On the one hand, autophagy protects osteoblasts from apoptosis and may be critical for osteogenic differentiation and for bone formation. Additionally, lysosomes modulate osteoclast differentiation, playing a fundamental role in osteoclastogenesis and bone resorption [14].

In this study, we aim to produce rodent bone cells with loss-of-function mutations in the *Gba1* gene using CRISPR/Cas9 and to evaluate their intrinsic performances in order to broaden our understanding of the bone phenotype in GD.

2. Materials and Methods

2.1. Cell lines

The rat osteosarcoma cell line ROS 17/2.8; RRID:CVCL_0508 was used as a model of osteoblast-like cells in its wild-type and *Gba1* knockout (ROS-*Gba1*KO) versions (generated by CRISPR/Cas9, see below). The mouse macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA, USA) was used as a model of osteoclast-like cells in their wild-type and *Gba1* knockout (RAW-*Gba1*KO) version (generated by CRISPR/Cas9, see below).

2.2. Cell cultures

ROS wt and ROS-*Gba1*KO cells were cultured and maintained in DMEM F-12 medium (Gibco, Origin: Brazil) with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) (complete media), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. RAW wt and RAW-*Gba1*KO cells were cultured and maintained in DMEM medium (Gibco) with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (complete media), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Osteoblast viability was assessed using the MTT assay (Sigma). Briefly, 80.000 cells were cultured in 24-well for 3 days and the MTT reagent 0,45 mg/mL was added. Absorbance was read at 560 nm after incubation at 37°C for 4 hours. Three independent replicates were performed.

2.3. Generation of cell models with CRISPR/Cas9

Gba1 editing was performed at Organelle Homeostasis Laboratory of TIGEM (Naples, Italy) using the pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid and Sigma-Aldrich Synthetic guide RNA (RN00064-0684536) (sgRNA) (Table S1) which targets exon 3 (rat) or exon 4 (mouse) of the *Gba1* gene. For guide selection, off-target site prediction was carried out using Benchling (<https://www.benchling.com/>) (Table S2). The sgRNA was cloned into the pSpCas9(BB)-2A-GFP vector following the protocol of Ran et al. 2013 [15]. After the sgRNA was cloned and tested, the cells were seeded one day before transfection in a 6-well plate (ROS: 3,5 x 10⁵ cell/well; RAW: 3 x 10⁵ cell/well). Reverse transfection was performed using 2500 ng of pSpCas9 plasmid containing sgRNA, 7.5 µL of Lipofectamine™ 3000 and 5 µL of Lipofectamine™ P3000 reagent (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocols. After 48–72h the edited pool was sorted by single-cell sorting in flow cytometry (BD Biosciences LSR II flow cytometer, San Jose, CA, USA). From a single clone, cells were cultured to sufficient numbers to perform DNA extraction to identify edited clones

by Sanger sequencing. Edited clones predicted to lead to KO proteins were analysed by western blot (WB) in order to confirm lack of GCase expression and GCase activity was measured for selected clones.

2.4. Glucocerebrosidase enzymatic activity

Glucocerebrosidase (GCase) activity was measured using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl--d-glucopyranoside (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The total amount of protein in cell lysates was measured using the Bradford assay (BioRad, Hercules, CA, USA), following manufacturer's instructions. In each well of a 96 well plate, 24µL containing 24µg of protein was incubated at 37°C for 30 minutes. After that, 100µL of McIlvaine's buffer (Citrate-Na₂HPO₄ solution 150mM; Taurocholate 0,2%; Triton X-100 0,1%; BSA 0,1%; substrate 1,25mg/mL; pH 5,2) were added and the plate was incubated again at 37°C for 30 minutes. The reaction was stopped with NaOH-glycine buffer 0.3 M pH 10.4 and the fluorescent product was quantified using a fluorimeter (Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorimeter and Luminometer) at an excitation wavelength of 365 nm and emission of 495 nm. Quantification was performed in comparison to a reading without adding substrate to the cells (blank). Readings lower than the blank are shown as 0. This assay was performed once for each selected clone.

2.5. Osteoblast and Osteoclast differentiation assays

To induce osteoblastic differentiation, the ROS wt and ROS-*Gba1*KO cells were seeded at 5x10⁵ cells/well in 6-well plates. After 24 h, osteoblast differentiation was induced by adding 150µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and 15mM β-glycerophosphate (Thermo Fisher Scientific) to the complete medium for 7 or 21 days depending of the assay, replacing the medium every 72 h. To induce osteoclastogenesis, RAW wt and RAW-*Gba1*KO cells were seeded at a density of 25000 cells/cm² in 6-well plates. After 48 h, the DMEM complete medium was replaced by MEM-alpha medium (Gibco) containing 1% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 50ng/mL of recombinant murine sRANK ligand (RANKL) (PeproTech) for 4 days replacing the media every 48h. Osteoclast maturation was checked by Giemsa staining (Supplementary figure S2). Three independent replicates were carried out for each differentiation assay.

2.6. Basal characterization of lysosomes

The basal state of lysosomes of ROS (wt and KOs) and RAW (wt and KO) cells was determined by flow cytometry using LysoTracker™ Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific) in live cells cultured for 7 days. 7x10⁵ cells were resuspended in 15mL tubes containing 6mL of complete medium (according to type of cells) supplemented with LysoTracker Green 50nM. Cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 5 minutes in the dark and then washed with phosphate-buffered saline 1X (PBS, PanReac AppliChem). Immediately thereafter, the intensity of fluorescence of lysosomes was measured with a Gallios (Beckman Coulter) flow cytometer of the Scientific and Technological Centers of the Universitat de Barcelona. Four to six independent replicates were performed.

2.7. RT-PCR

ROS (wt and KOs) and RAW (wt and KOs) cells were seeded at a density of 7×10^5 in 6-well plates. After 48 h for basal state determinations and 7 days (for ROS) or 4 days (for RAW) for differentiation analysis, the RNA was extracted with High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland). Briefly, 2 μ g of RNA were used for retro-transcription using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), followed by RT-qPCR with LightCycler® 480 Probes Master (Roche) in a LightCycler480 following the commercial protocol. Primers were designed from available mouse and rat sequences using the primer analysis software Primer3 (Table S1). A mouse and rat-*Gapdh* gene was used as internal control. The comparative threshold (Ct) method was used for data analysis expressed as $2^{-\Delta Ct}$. Three independent experiments were carried out for each biomarker.

2.8. Fluid-flow assay

ROS wt and ROS-*Gba1*KO cells were plated at 2×10^4 cells/cm² on glass slides pre-treated with collagen (FlexCell, Hillsborough, NC) and cultured with DMEM-F12 complete medium. After 24 h of incubation, half of the cells were subjected to mechanical stress using laminar fluid flow (FF) with a shear stress of 10 dynes/cm², 8 Hz, for 10 minutes in a Flexcell® Streamer® shear stress device. The other half were maintained under static conditions (SC). Finally, the cells were cultured with fresh medium for an additional period of 18 h to perform RNA extraction and qPCR (Supplementary TableS1). During the process, cell viability and proliferation were observed (by trypan blue exclusion assay) without significant changes between the different experimental conditions. Three independent replicates were carried out.

2.9. Alizarin red staining

Staining of the mineralization of ROS cells after 21 days of differentiation was performed as follows: The culture medium was removed and cells were washed twice with PBS. Cells were fixed with cold paraformaldehyde 4% (Thermo Fisher Scientific) for 15 minutes. After washing the cells twice with distilled water, cells were stained by adding alizarin red S staining solution 40nM, pH: 4.1 - 4.3 (Sigma Aldrich). After an incubation time of 30 min at room temperature, the alizarin red S staining solution was removed and cells were washed three times with distilled water. The quantitative analysis of alizarin red S staining was performed by absorbance adding 10% acetic acid and 10% ammonium hydroxide to the stained cells. After heating the samples at 85°C for 10 min and cooling them on ice for 5 additional min, the absorbance was measured at 450 nm using a Glomax Multi+ luminometer (Promega, Madison, WI, USA). Three independent replicates were performed.

2.10. TRAcP colorimetric assay

To evaluate osteoclast differentiation, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAcP) activity was examined. RAW wt and RAW-*Gba1*KO cells were seeded at a density of 25000 cells/cm² in 96-well plates with MEM-alpha medium without phenol red (Gibco) containing 1% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 50 ng/mL of recombinant murine RANKL (PeproTech).

Conditioned media were collected at different times (0, 2, 4 days post differentiation), and TRAcP activity was colorimetrically measured by adding 18 mg/mL p-nitrophenyl phosphate (Sigma Aldrich) in the presence of 46 mg/mL sodium tartrate, ascorbic acid 8.8 mg/mL and a reaction buffer containing 1 M acetate, 0.5% triton X-100, 1 M NaCl and 10 mM EDTA (pH 5.5). After 15 minutes of incubation at 37°C, the reaction was stopped with 0.3 N NaOH buffer and immediately measured at 450 nm using a Glomax Multi+ luminometer (Promega, Madison, WI, USA). Six independent replicates were carried out.

2.11. Western blot

In order to evaluate expression levels of glucocerebrosidase (GCase) and cathepsin K, cells were washed once with PBS and lysed in RIPA buffer using cell scrapers. The protein extracts were quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Proteins (20 µg/lane) were separated by electrophoresis in an SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membrane (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA). We used the appropriate primary antibody against GCase/GBA 2 µg/mL (GBA 2E2 WH0002629M1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cathepsin K 1:1000 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), and antibody against actin 1:200 (A2066, Sigma-Aldrich) or α -tubulin T5168 1:4000 (Sigma-Aldrich) was used as loading controls. The membranes were developed using a peroxidase-conjugated secondary antibody anti-rabbit IgG (A0545) 1:10000 for GCase/GBA, cathepsin K and actin antibodies and anti-mouse IgG (A5906) 1:10000 for α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich). A total of 3 experiments was performed for each biological replica.

2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), applying unpaired, paired t-tests, Mann-Whitney-U test or ANOVA as appropriate. Data are expressed as mean±SD and are representative of three or more independent experiments.

3. Results

3.1. Generation of *Gba1* gene knockout in osteoblast-like and osteoclast-like cell lines

We generated and characterized *Gba1* knockout rat osteosarcoma and murine macrophage cell lines (ROS-*Gba1*KO and RAW-*Gba1*KO) as putative bone cell models of GD. We obtained two KO clones from ROS cells. The first one (ROS-*Gba1*KO1) carried an homozygous frameshift deletion of two nucleotides (NM_001127639.1: c.256_257del; p.Leu86AsnfsTer44) and the second one (ROS-*Gba1*KO2) carried an homozygous frameshift deletion of one nucleotide (NM_001127639.1: c.258del; p.Leu87ProfsTer11) (Figure 1A). As for RAW cells we obtained a single KO clone (RAW-*Gba1*KO), compound heterozygous for two frameshift deletions of 50 nucleotides in allele 1 (NM_008094.7: c.443_492del; p.Ser148Ter) and 1 nucleotide in allele 2 (NM_008094.7: c.477del; p.Asn159TrefsTer21) (Figure 1B). These deletions were validated by Sanger sequencing (Figure S1).

The ROS-*Gba1*KO and RAW-*Gba1*KO cells showed no GCase protein expression, as determined by western blot (Figures 1C and 1D), and displayed less than 1% residual GCase activity (Figures 1E and 1F).

3.2. Functional characterization of the generated KO osteoblasts

To characterize the edited osteoblastic cell models, we first performed a determination of the basal state of lysosomes by flow cytometry using LysoTracker Green in live cells cultured for 7 days, in order to verify that there was a lysosomal accumulation characteristic of Gaucher cells. No statistically significant differences were observed in either of the two KO clones compared to wt cells (Figure 2A). Then, we checked cell viability and proliferation and again we found no differences between the KO clones and the wild type (Figure 2B).

For the analysis of the osteoblast biomarker profile, we determined the mRNA expression of *Runx2*, *Bglap*, and *Opg* by qPCR of both wt and KO cells in their basal state and after inducing osteoblastic differentiation for 7 days (Figure 2C). No differences were found between KO and wt cells either at baseline and after differentiation in *Runx2*, *Bglap*, and *Opg* expression. Afterwards, given the known bone anabolic effect of mechanical stimuli, we analysed the response to the mechanical stimulus of the KO cells compared to wt cells (Figure 2D). *Runx2* and *Bglap* expression was significantly increased after stimulation in all cell types, consistent with the results obtained in the determination of osteoblastic biomarkers by qPCR. Also, in the case of *Runx2*, statistically significant differences were observed between wt and ROS-*Gba1*KO2 cells in the static control (SC) and a trend after the mechanical stimulation. In contrast, while we observed an increase of about 3 times in *Opg* expression after mechanical stimulation in wt cells, this stimulating effect was not observed in KO cells, mainly in ROS-*Gba1*KO1 cell line.

Finally, we analysed the osteoblast performance by staining with alizarin red after inducing differentiation for 21 days (Figure 2E). Both KO cells showed a significantly higher concentration of alizarin red than wt cells suggesting an increased mineralization capacity of GD cells.

3.3. Functional characterization of the generated osteoclastic cells

As in the case of ROS cells, we first performed an analysis of the basal state of lysosomes in osteoclast-like cells. No statistically significant differences were observed between wt and RAW-*Gba1*KO cells even though an increased trend was observed in the fluorescence intensity of KO cells compared to wt cells (Figure 3A).

Next, we determined the mRNA expression of two osteoclast biomarkers, *Rank* and *Trap*, in the basal state and after inducing osteoclast differentiation for 4 days (Figure 3B). As expected, we observed a statistically significant increase in the expression level of *Rank* and *Trap* after osteoclastic differentiation in wt cells. However, in the RAW-*Gba1*KO cells, no increased expression of *Rank* was observed during differentiation, and in accordance, there were statistically significant differences between wt and KO cells after differentiation. Regarding *Trap* expression, we observed elevated levels in KO cells compared to wt in the

basal state although the increase of *Trap* after differentiation was significantly lower than that in wt cells.

We performed a colorimetric assay to check the activity of TRAcP protein secreted to the culture media, using p-nitrophenyl phosphate as a substrate at different time points during osteoclast differentiation. We could observe an increase of TRAcP activity during the process in both cell types although this increase was significantly higher in the KO than in wt. Hence, while the expression of the *Trap* transcript is not increased as much as in wt cells, more TRAcP activity was detected in RAW-*Gba1*KO in comparison to wt cells (Figure 3C).

Afterward, we wanted to assess whether cathepsin K, which is the main activator of TRAcP by proteolytic cleavage, was increased in KO cells compared to wt cells. Western blot analyses before inducing osteoclast differentiation showed strongly increased expression of both cathepsin K and pro-cathepsin K in the KO compared to wt cells (Figure 3D). After inducing osteoclast differentiation, we did not observe significant differences between wt and KO cells in the expression of cathepsin K and pro-cathepsin K levels (Figure 3E).

4. Discussion

Here we aimed to generate and characterise bone cellular models of GD to understand the mechanisms underlying the skeletal symptomatology associated with this pathology. Thus, we used CRISPR/Cas9 gene editing to generate *Gba1* knockouts in rodent bone cell lines. The use of rodent cell lines was preferred to human cells as they do not harbor the *GBA* pseudogene. After validating the cell models, we characterised them by determining the expression of osteoblastic and osteoclastic biomarkers and analysing lysosomal state, response to mechanical stimulus, calcium deposition, TRAcP activity and the level of pro-cathepsin K and cathepsin K expression.

Regarding the osteoblastic function of ROS-*Gba1*KO cells, we analyzed the expression of *Runx2*, *Bglap*, and *Opg*, which are involved specifically in the differentiation and function of osteoblasts. These bone markers encompass three crucial pathways of osteoblasts: *Runx2* is a transcription factor that plays an essential role in both osteoblast differentiation and expression of osteoblast-specific genes. *Runx2* determines the commitment of mesenchymal stem cells to the osteoblast lineage and positively influences early stages of osteoblast differentiation. Hence, it is an early marker of osteoblast differentiation. Osteocalcin (*Bglap*) is a hormone secreted solely by osteoblasts likely involved in the body's metabolic regulation. It is expressed by the mature osteoblast and therefore, it is a marker of a later differentiation stage. Finally, Osteoprotegerin (*Opg*) is also secreted uniquely by osteoblasts and binds specifically to *Rankl* as a decoy receptor. The binding of *Rankl* with its receptor *Rank*, in the membrane of osteoclast precursors, is essential for osteoclast formation and activation. Thus, osteoprotegerin regulates bone remodeling by decreasing osteoclast formation and it is used as a marker of osteoblast function [8,16–18]. In our osteoblast model, no differences were observed in the expression of *Runx2*, *Bglap*, and *Opg* compared to the wt cells, both before and after inducing osteoblast differentiation. However, increased mineralization was observed in KO cells after 21 days of differentiation. When a mechanical stimulus was applied, the induction of *Opg* failed or was greatly diminished in the KO lines, as opposed to the wild-type. Analyzing the osteoclastic function of RAW-*Gba1*KO cells, we observed an altered

differentiation in terms of *Rank* and *Trap* expression as well as an increased TRAcP activity compared to wt cells. Of note, undifferentiated RAW-*Gba1*KO cells showed an increased osteoclast performance compared to wt cells with higher levels of *Trap* expression and TRAcP activity as well as cathepsin K and pro-cathepsin K expression.

The *in vitro* studies performed to analyse the status of osteoblasts in GD have reported controversial results. Some of them, including studies with iPSC-derived osteoblasts, osteoblast-like cell lines treated with an inhibitor of glucocerebrosidase (conduritol-B-epoxide, CBE) or cells obtained directly from patients with GD, have observed altered osteoblast function, with significantly decreased biomarkers like *Runx2*, *Alp*, *Col1*, *Bglap* [19–21]. Lecourt et al. [22] in an *in vitro* model with CBE-treated and untreated mesenchymal stem cells (MSCs), observed impaired proliferation in treated compared to untreated MSCs, but when they analyzed osteoblast differentiation by the level of *Runx2* and Osterix mRNA expression, they found no significant differences between treated and untreated cells after 7 days of culture in osteoblastic medium. In the same way, studies of a cohort of untreated type 1 GD patient samples showed no statistically significant differences in bone biomarkers such as osteocalcin and bone ALP isoenzyme [23,24], or osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase (BSAP), N-telopeptide cross-links and deoxypyridinoline (D-PYD) [25], which were within the normal range compared with the respective controls. Our results of osteoblast RNA biomarkers, with no differences between disease and control, align with them. The fact that we found no statistically significant differences between KO and wt cells in the lysosomal status, probably because osteoblast-like cells in culture do not display lysosomal accumulation, would explain the normal functioning of *Gba1*-KO osteoblasts.

Regarding proliferation defects in osteoblasts, several studies have repeatedly observed less proliferation both in animal and cell models of Gaucher [20–22,26]. Given the essential role of the Wnt pathway in osteoblastogenesis [27] it is not surprising that defects in this pathway have been described in some of the models [20,22,28] which could explain the proliferation defects. In the present work, we have not observed evident proliferation alterations in our ROS KO lines, probably due to their osteosarcoma origin, their immortalized nature and the culture conditions *in vitro*.

We have consistently observed an increased deposition of calcium in the ROS KO lines compared to wild type, upon 21 days of osteoblastic differentiation. This is a novel result that needs replication in other models and whose significance remains to be established. Iwayama et al. [29] have described how the calcium and phosphate minerals exit the osteoblast through a lysosomal pathway and have shown that *ALPL* is necessary for the process. In agreement with this, in our previous work with Gaucher-iPSC-derived osteoblasts, we could observe increased levels of *ALPL* [30] at different time points along osteoblastic differentiation when compared to wild-type-iPSC-derived osteoblasts. These elevated *ALPL* levels could explain the increased mineralization observed in our alizarin red results. However, it is difficult to reconcile these results to the Gaucher phenotype since bone mass is commonly reduced. A plausible reason might be the *in vitro* monoculture conditions of osteoblasts and the lack of interaction with osteoclasts and of other physiological factors present in the tissue *in vivo*. Because our study aimed to assess the role of GD osteoblasts and osteoclasts in a separate manner, our cell models mainly display the effect of GBA depletion in them and may not fully model Gaucher disease of bone. In this line, Mucci et al. [31], have observed a reduction of

expression of alkaline phosphatase and mineralization when treating an osteoblast culture with conditioned media derived from monocytes or macrophages exposed to the GCase inhibitor CBE.

In our mechanical loading tests, Gaucher model osteoblasts failed to upregulate osteoprotegerin compared to wild-type osteoblasts, which significantly overexpressed this marker in response to the stimulus. To our knowledge, this is a novel result and we hypothesize that this lack of *Opg* activation may in part explain the defective cross-talk described between Gaucher bone cells, which consists of a superior osteoclast differentiation capacity driven by Gaucher osteoblasts [30,32]. The lack of *Opg* stimulation in the former would not result in competitive inhibition of the *Rank-Rankl* interaction necessary for osteoclast differentiation.

In contrast with the osteoblast controversies, much evidence exists supporting osteoclasts being involved in bone pathophysiology in Gaucher Disease. Early work by Moran et al. [33] described elevated plasma cathepsin K activity in Gaucher patients. Cathepsin K is a lysosomal cysteine protease expressed primarily in osteoclasts [34] that breaks down bone matrix proteins and plays a central role in the degradation of the organic phase of bone during bone resorption. The elevated expression of cathepsin K correlates with the osteopenia of Gaucher patients [35]. Cathepsin K is constitutively expressed by osteoclasts as a proenzyme and is processed intracellularly in the lysosomal compartment prior to its release [36,37]. In agreement with this previous evidence, in our Gaucher osteoclast cell model (RAW-*Gba1KO*), in spite of just a trend of lysosomal accumulation, we observed a strong overexpression of mature cathepsin K, in the absence of any external induction. This is an intrinsic characteristic of the Gaucher osteoclast that may play a direct role in bone disease. Likewise, in our osteoclast-like *Gba1KO* cell model we observed an enhanced of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAcP) activity in the culture supernatant when compared to wt cells, at all time points along differentiation, also able to play a role in Gaucher bone disease. TRAcP is an enzyme that is highly expressed by osteoclasts and is involved in osteopontin/bone sialoprotein dephosphorylation. Its detection currently serves as a marker of osteoclast number and bone resorption and indeed, cytochemically detected TRAcP expression has been used in Gaucher's disease as a disease-associated marker since the early days [38]. We observed a significant increase in *Trap* mRNA expression in RAW-*Gba1KO* cells; however, its activation was reduced during osteoclast differentiation. This seems to disagree with *Trap* enzyme activity being enhanced. Reithmeier et al. [39] have recently demonstrated the direct action of cathepsin K in the cleavage of the low activity TRAP5a to produce the TRAP5b isoform, with high phosphatase activity, which has been proposed as a potential bone biomarker for GD with the capacity to predict the progression of bone density abnormalities [40]. In our model (Figure 4), the high levels of active cathepsin K may explain the enhanced TRAcP activity.

Our Gaucher bone cell models present several limitations, mainly their origin as transformed cell lines and their growth as isolated monocultures, which prevent testing cell-cell interactions or the physiological phenomena occurring in animal models. This may limit their appropriateness as a Gaucher model. On the other hand, these models are easily maintained and, importantly, allow for the discovery of intrinsic aspects of each cell type contributing to the bone phenotype. Future work with these cell lines, cultured together to analyze their

interaction, similarly to what happens in the bone tissue, may provide a better characterization at the cell biology level and allow drug testing.

5. Conclusion

In conclusion, in the context of our cell models, our findings point out an intrinsic osteoclastic defect in Gaucher disease. This could suggest that osteoclasts would be the main drivers of bone pathology, along with impaired osteoblast-osteoclast cross-talk, reinforcing the multiple evidences produced in various in vitro and in vivo models by other authors.

Acknowledgments

We are thankful to Professor Kent S e and to Jacob Bastholm Olesen for hosting JDP in his lab and training him in applying techniques of osteoclast characterization. We also want to thank Carmine Settembre for hosting NMG in his lab and helping her in the KO line's generation.

CRediT authorship contribution statement

JDP, SB, NMG, NGG, DG, and RR were involved in the study conceptualization and design. JDP, LC, MC, and EMG performed the main assays. JAA, ARG, SHJ and EMG did the fluid-flow assays. XN and DO contributed to project administration and funding acquisition. SB, DG, RR, and NGG were involved in validation and supervision. The draft of the manuscript was written by JDP, SB, NGG, , and all authors read and approved the final version.

Funding

This research was supported by grants FEIOMM 2019, Grants PID2019-107188RB-C21, PID2022-141461OB-I00 funded by MICIU/AEI/ 10.13039/501100011033 and "ERDF/EU". This project was supported by CIBERER (U720) and CIBERFES [CB16/10/00245] from Instituto de Salud Carlos III, and by SGR2021/1093 and SGR2021/00043 from Ag ncia de Gest o d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). NMG was recipient of FI (2017FI_B 01107) and JDP was recipient of FI-SDU (2020FISDU 00517) predoctoral fellowships from AGAUR. JDP obtained travel grants from the Montcelimar Foundation and the GEMSTONE-COST Action (CA18139).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Supplementary data

Supplementary data is available online at <https://doi.org/xxxxx>

Data availability

Data is contained within the article or supplementary material. Other raw data are available upon request to the corresponding author.

References

- [1] K.S. Hruska, M.E. LaMarca, C.R. Scott, E. Sidransky, Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA), *Hum Mutat* 29 (2008) 567–583. <https://doi.org/10.1002/humu.20676>.
- [2] P.K. Mistry, N.J. Weinreb, P. Kaplan, J.A. Cole, A.R. Gwosdow, T. Hangartner, Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults, *Blood Cells Mol Dis* 46 (2011) 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.10.011>.
- [3] J. Stirnemann, N. Belmatoug, F. Camou, C. Serratrice, R. Froissart, C. Caillaud, T. Levade, L. Astudillo, J. Serratrice, A. Brassier, C. Rose, T. Billette de Villemeur, M.G. Berger, A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments, *Int J Mol Sci* 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18020441>.
- [4] E.C. Daykin, E. Ryan, E. Sidransky, Diagnosing neuronopathic Gaucher disease: New considerations and challenges in assigning Gaucher phenotypes, *Mol. Genet. Metab.* 132 (2021) 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.01.002>.
- [5] N.B. Arévalo, C.M. Lamaizon, V.A. Cavieres, P.V. Burgos, A.R. Álvarez, M.J. Yañez, S. Zanlungo, Neuronopathic Gaucher disease: Beyond lysosomal dysfunction, *Front. Mol. Neurosci.* 15 (2022) 934820. <https://doi.org/10.3389/fnmoi.2022.934820>.
- [6] D.A. Méndez-Cobián, S. Guzmán-Silahuá, D. García-Hernández, J. Conde-Sánchez, Y. Castañeda-Borrayo, K.L. Duey, M.G. Zavala-Cerna, B. Rubio-Jurado, A.H. Nava-Zavala, An Overview of Gaucher Disease, *Diagnostics (Basel)* 14 (2024). <https://doi.org/10.3390/diagnostics14242840>.
- [7] J. Roh, S. Subramanian, N.J. Weinreb, R.V. Kartha, Gaucher disease - more than just a rare lipid storage disease, *J Mol Med (Berl)* 100 (2022) 499–518. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02174-z>.
- [8] S. Khosla, Minireview: the OPG/RANKL/RANK system, *Endocrinology* 142 (2001) 5050–5055. <https://doi.org/10.1210/endo.142.12.8536>.
- [9] C.H. Turner, A.G. Robling, Exercise as an anabolic stimulus for bone, *Curr Pharm Des* 10 (2004) 2629–2641. <https://doi.org/10.2174/1381612043383755>.
- [10] I. Magal, E. Lebel, G. Altarescu, M. Itzhaki, B. Rudensky, A.J. Foldes, A. Zimran, D. Elstein, Serum levels of osteoprotegerin and osteoprotegerin polymorphisms in Gaucher disease, *Br. J. Haematol.* 133 (2006) 93–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.05978.x>.
- [11] D. Hughes, P. Mikosch, N. Belmatoug, F. Carubbi, T. Cox, O. Goker-Alpan, A. Kindmark, P. Mistry, L. Poll, N. Weinreb, P. Deegan, Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice, *J Bone Miner Res* 34 (2019) 996–1013. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3734>.
- [12] P. Mikosch, Miscellaneous non-inflammatory musculoskeletal conditions. Gaucher disease and bone, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25 (2011) 665–681. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.10.015>.
- [13] J. Behera, J. Ison, A. Tyagi, G. Mbalaviele, N. Tyagi, Mechanisms of autophagy and mitophagy in skeletal development, diseases and therapeutics, *Life Sci* 301 (2022) 120595. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120595>.
- [14] J. Jiang, R. Ren, W. Fang, J. Miao, Z. Wen, X. Wang, J. Xu, H. Jin, Lysosomal biogenesis and function in osteoclasts: a comprehensive review, *Front Cell Dev Biol* 12 (2024) 1431566. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1431566>.
- [15] F.A. Ran, P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, F. Zhang, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat Protoc* 8 (2013) 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- [16] T. Komori, Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development, *Int J Mol Sci* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23105776>.
- [17] Y. Han, X. You, W. Xing, Z. Zhang, W. Zou, Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts, *Bone*

- Res. 6 (2018) 16. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6>.
- [18] B.F. Boyce, L. Xing, Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling, *Arch Biochem Biophys* 473 (2008) 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018>.
- [19] C. Drugan, G. Jebeleanu, P. Grigorescu-Sido, C. Caillaud, A.M. Craciun, Biochemical markers of bone turnover as tools in the evaluation of skeletal involvement in patients with type 1 Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis* 28 (2002) 13–20. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0479>.
- [20] L.M. Panicker, M.P. Srikanth, T. Castro-Gomes, D. Miller, N.W. Andrews, R.A. Feldman, Gaucher disease iPSC-derived osteoblasts have developmental and lysosomal defects that impair bone matrix deposition, *Hum Mol Genet* 27 (2018) 811–822. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx442>.
- [21] A.N. Crivaro, J.M. Mucci, C.M. Bondar, M.E. Ormazabal, R. Ceci, C. Simonaro, P.A. Rozenfeld, Efficacy of pentosan polysulfate in in vitro models of lysosomal storage disorders: Fabry and Gaucher Disease, *PLoS One* 14 (2019) e0217780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217780>.
- [22] S. Lecourt, V. Vanneaux, A. Cras, D. Freida, D. Heraoui, L. Herbi, C. Caillaud, C. Chomienne, J.-P. Marolleau, N. Belmatoug, J. Larghero, Bone marrow microenvironment in an in vitro model of Gaucher disease: consequences of glucocerebrosidase deficiency, *Stem Cells Dev* 21 (2012) 239–248. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0365>.
- [23] C.E. Fiore, R. Barone, P. Pennisi, V. Pavone, S. Riccobene, Bone ultrasonometry, bone density, and turnover markers in type 1 Gaucher disease, *J Bone Miner Metab* 20 (2002) 34–38. <https://doi.org/10.1007/s774-002-8444-1>.
- [24] G. Ciana, C. Martini, A. Leopaldi, G. Tamaro, F. Katouzian, L. Ronfani, B. Bembi, Bone marker alterations in patients with type 1 Gaucher disease, *Calcif. Tissue Int.* 72 (2003) 185–189. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-2072-0>.
- [25] K.B. Sims, G.M. Pastores, N.J. Weinreb, J. Barranger, B.E. Rosenbloom, S. Packman, P. Kaplan, H. Mankin, R. Xavier, J. Angell, M.A. Fitzpatrick, D. Rosenthal, Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: results of a 48-month longitudinal cohort study, *Clin. Genet.* 73 (2008) 430–440. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.00978.x>.
- [26] P.K. Mistry, J. Liu, M. Yang, T. Nottoli, J. McGrath, D. Jain, K. Zhang, J. Keutzer, W.-L. Chuang, W.Z. Mehal, H. Zhao, A. Lin, S. Mane, X. Liu, Y.Z. Peng, J.H. Li, M. Agrawal, L.-L. Zhu, H.C. Blair, L.J. Robinson, J. Iqbal, L. Sun, M. Zaidi, Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 19473–19478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003308107>.
- [27] N. Martínez-Gil, N. Ugartondo, D. Grinberg, S. Balcells, Wnt Pathway Extracellular Components and Their Essential Roles in Bone Homeostasis, *Genes* 13 (2022). <https://doi.org/10.3390/genes13010138>.
- [28] I. Zancan, S. Bellesso, R. Costa, M. Salvalaio, M. Stroppiano, C. Hammond, F. Argenton, M. Filocamo, E. Moro, Glucocerebrosidase deficiency in zebrafish affects primary bone ossification through increased oxidative stress and reduced Wnt/ β -catenin signaling, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 1280–1294. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu538>.
- [29] T. Iwayama, T. Okada, T. Ueda, K. Tomita, S. Matsumoto, M. Takedachi, S. Wakisaka, T. Noda, T. Ogura, T. Okano, P. Fratzl, T. Ogura, S. Murakami, Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization, *Sci Adv* 5 (2019) eaax0672. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0672>.
- [30] J. Serra-Vinardell, N. Roca-Ayats, L. De-Ugarte, L. Vilageliu, S. Balcells, D. Grinberg, Bone development and remodeling in metabolic disorders, *J. Inherit. Metab. Dis.* 43 (2020) 133–144. <https://doi.org/10.1002/jimd.12097>.
- [31] J.M. Mucci, F. Suqueli García, P.N. de Francesco, R. Ceci, S. Di Genaro, C.A. Fossati, M.V. Delpino, P.A. Rozenfeld, Uncoupling of osteoblast-osteoclast regulation in a

- chemical murine model of Gaucher disease, *Gene* 532 (2013) 186–191.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.072>.
- [32] C. Bondar, M. Ormazabal, A. Crivaro, M. Ferreyra-Compagnucci, M.V. Delpino, P.A. Rozenfeld, J.M. Mucci, Osteocyte Alterations Induce Osteoclastogenesis in an In Vitro Model of Gaucher Disease, *Int J Mol Sci* 18 (2017).
<https://doi.org/10.3390/ijms18010112>.
- [33] M.T. Moran, J.P. Schofield, A.R. Hayman, G.P. Shi, E. Young, T.M. Cox, Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K, *Blood* 96 (2000) 1969–1978.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961902>.
- [34] Y.P. Li, W. Chen, Characterization of mouse cathepsin K gene, the gene promoter, and the gene expression, *J. Bone Miner. Res.* 14 (1999) 487–499.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.4.487>.
- [35] J. Bobillo Lobato, P. Durán Parejo, R.J. Núñez Vázquez, L.M. Jiménez Jiménez, [Cathepsin K as a biomarker of bone involvement in type 1 Gaucher disease], *Med Clin (Barc)* 145 (2015) 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.11.018>.
- [36] D.J. Rieman, H.A. McClung, R.A. Dodds, S.M. Hwang, M.W. Holmes, I.E. James, F.H. Drake, M. Gowen, Biosynthesis and processing of cathepsin K in cultured human osteoclasts, *Bone* 28 (2001) 282–289. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00445-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00445-2).
- [37] M. Pereira, E. Petretto, S. Gordon, J.H.D. Bassett, G.R. Williams, J. Behmoaras, Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation, *J. Cell Sci.* 131 (2018) jcs216267. <https://doi.org/10.1242/jcs.216267>.
- [38] E. Fleckenstein, W. Dirks, U. Dehmel, H.G. Drexler, Cloning and characterization of the human tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) gene, *Leukemia* 10 (1996) 637–643.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8618440/> (accessed June 5, 2025).
- [39] A. Reithmeier, M. Norgård, B. Ek-Rylander, T. Näreoja, G. Andersson, Cathepsin K regulates localization and secretion of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) in TRAP-overexpressing MDA-MB-231 breast cancer cells, *BMC Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 15. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00253-6>.
- [40] M. Ivanova, J. Dao, L. Noll, J. Fikry, O. Goker-Alpan, TRAP5b and RANKL/OPG Predict Bone Pathology in Patients with Gaucher Disease, *J Clin Med* 10 (2021).
<https://doi.org/10.3390/jcm10102217>.

Legends

Figure 1. Generation and characterization of Gaucher cell models. (A). Schematic representation of *Gba1* gene from *Rattus norvegicus* with the localised mutations. Two nucleotide deletions (256-257) in the ROS-*Gba1*KO1 clone and one nucleotide deletion (258) in the ROS-*Gba1*KO2 clone. (B). Schematic representation of *Gba1* gene from *Mus musculus* with the localised mutations. In this case we obtained a compound heterozygote with a 50 nucleotide deletion (443-492) on allele 1 and an one nucleotide deletion (477) on allele 2. (C) and (D). WB analysis of GCase expression in ROS cells (wt and KO) and RAW cells (wt and KO), respectively. The KO clones showed lower levels of GCase expression in comparison to wt. (E) and (F). GCase enzymatic activity of ROS cells (wt and KO) and of RAW cells (wt and KO), respectively. In both cases, the GCase enzymatic activity of selected KO clones was greatly decreased compared to wt cells. The results correspond to one biological replicate for each cell type.

Figure 2. Characterization of ROS-*Gba1*KO cell model. (A). Determination of lysosome status by flow cytometry using LysoTracker Green. The graph (right) corresponds to the mean fluorescence intensity values of 10 thousand events. Representative fluorescence intensity histograms for each cell type are shown inside the box (left panel). The results are expressed as mean $\pm$ SD of four independent experiments. (B). Cell viability. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments.

(C). Expression of osteoblastic marker mRNA in the edited cells before (green bars) and after (purple bars) inducing differentiation to osteoblasts with 15mM β -glycerophosphate and 150 μ g/mL ascorbic acid, for 7 days. (D). Expression of osteoblastic marker mRNA after mechanical stimulus assay (fluid-flow). (E). Alizarin red staining after inducing differentiation to osteoblasts with 15mM β -glycerophosphate and 150 μ g/mL ascorbic acid, for 21 days. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. t-test, Mann-Whitney-U test, Anova: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; **** $p < 0.00001$. Abbreviations: SC = static control; FF = fluid-flow (mechanically stimulated sample).

Figure 3. Characterization of RAW-*Gba1*KO cell model. (A). Determination of lysosome status by flow cytometry using LysoTracker Green. The graph (right) corresponds to the mean fluorescence intensity values of 10 thousand events. Representative fluorescence intensity histograms for each cell type are shown inside the box (left panel). The results are expressed as mean $\pm$ SD of six independent experiments. (B). Expression of osteoclastic marker mRNA in the edited cells before (green bars) and after (purple bars) inducing differentiation to osteoclasts with 50ng/mL Rankl, for 4 days. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. (C). TRAcP colorimetric assay after inducing differentiation to osteoclasts with 50ng/mL Rankl at different time points. The results are expressed as mean $\pm$ SD of six independent experiments. WB to analyse the expression level of pro-cathepsin K and cathepsin K before (D) and after (E) inducing differentiation to osteoclasts with 50ng/mL Rankl for 4 days. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three or two independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Figure 4. Schematic representation of the generated and characterised cell models. Our results suggest a major intrinsic osteoclastic defect in Gaucher disease along with impaired osteoblast-osteoclast cross-talk. The red arrows indicate the biomarkers that favour bone resorption, either by increasing or decreasing their expression, as in the case of *Opg*.

Figure 1.

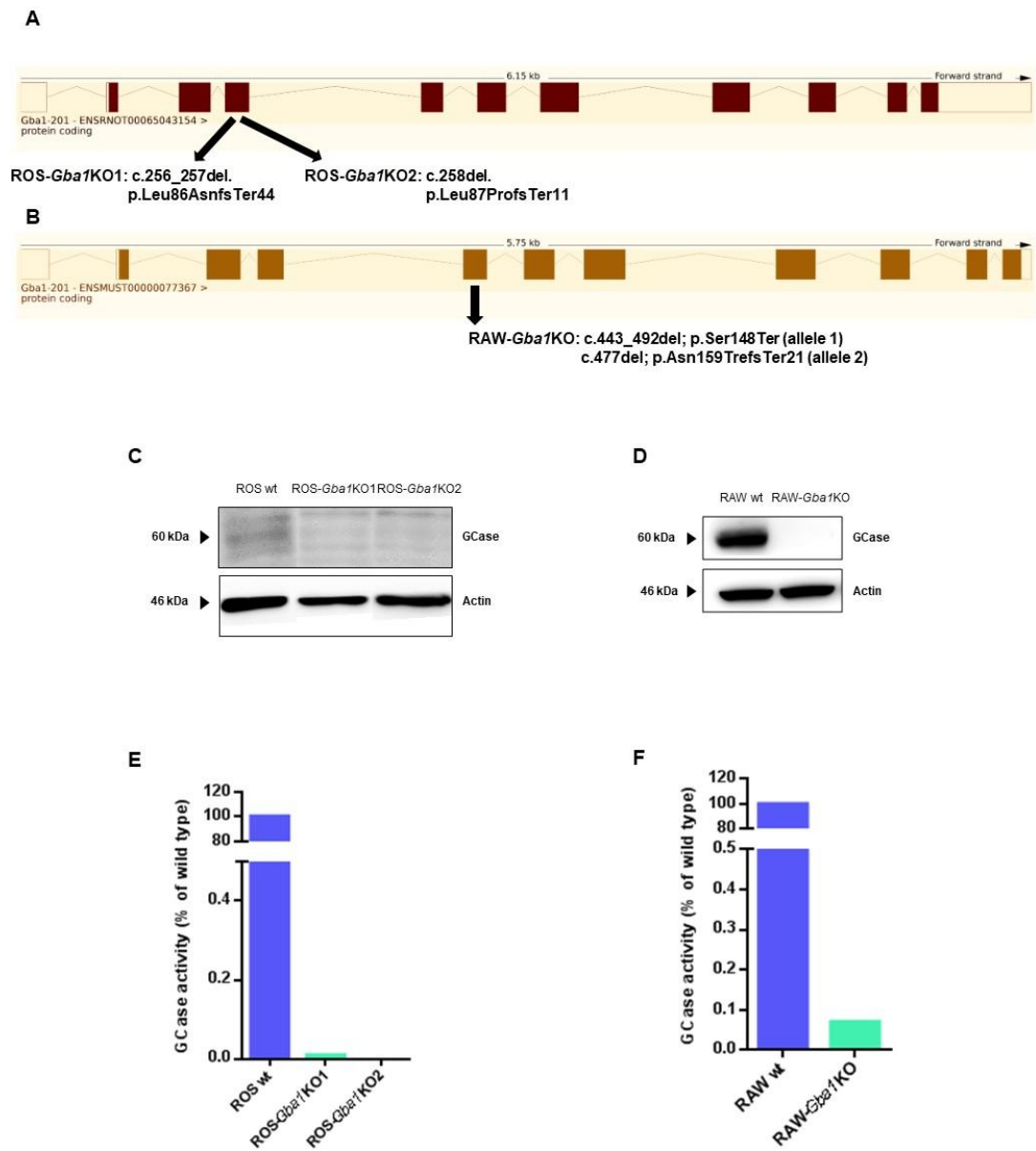


Figure 2.

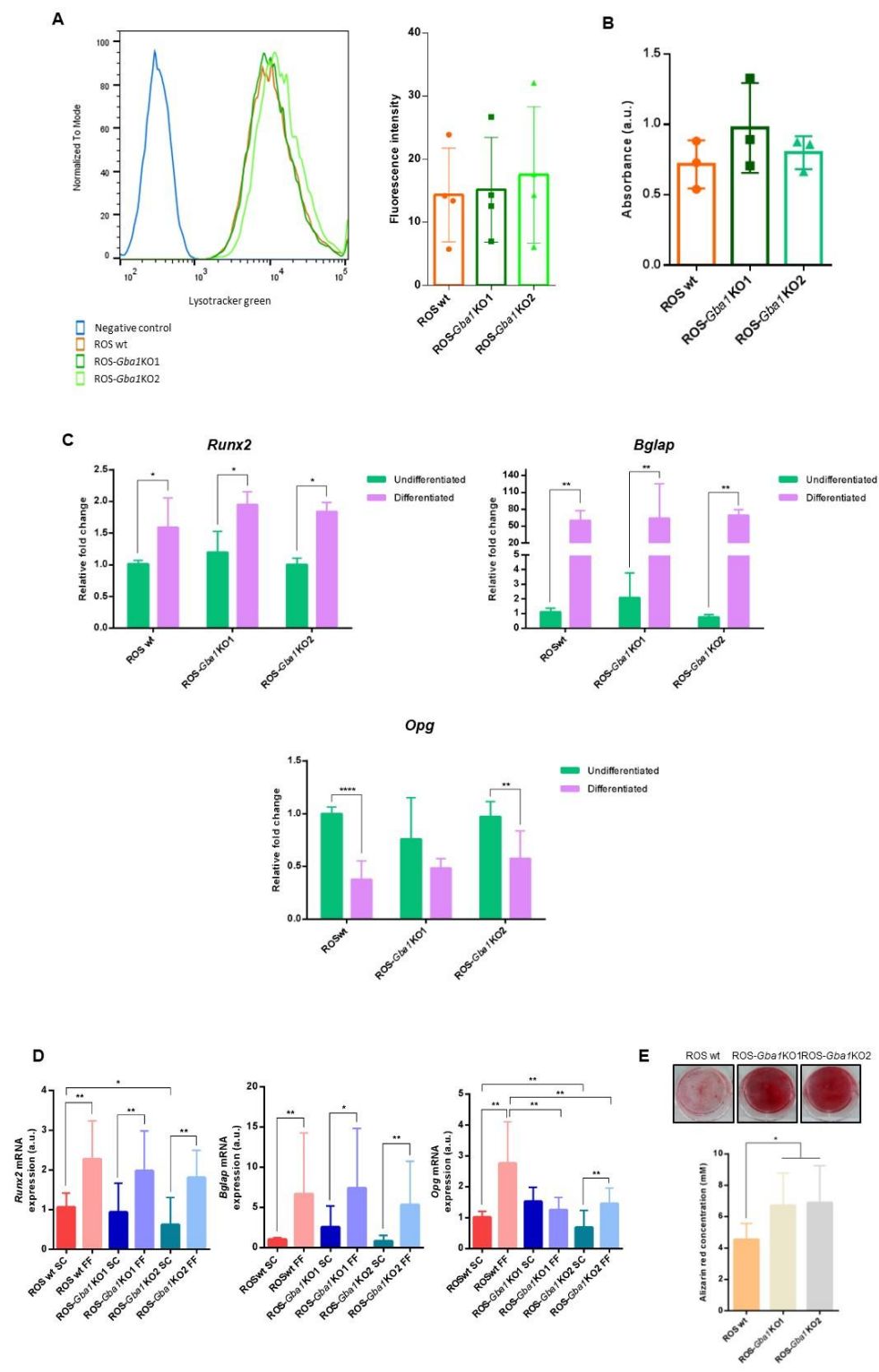


Figure 3.

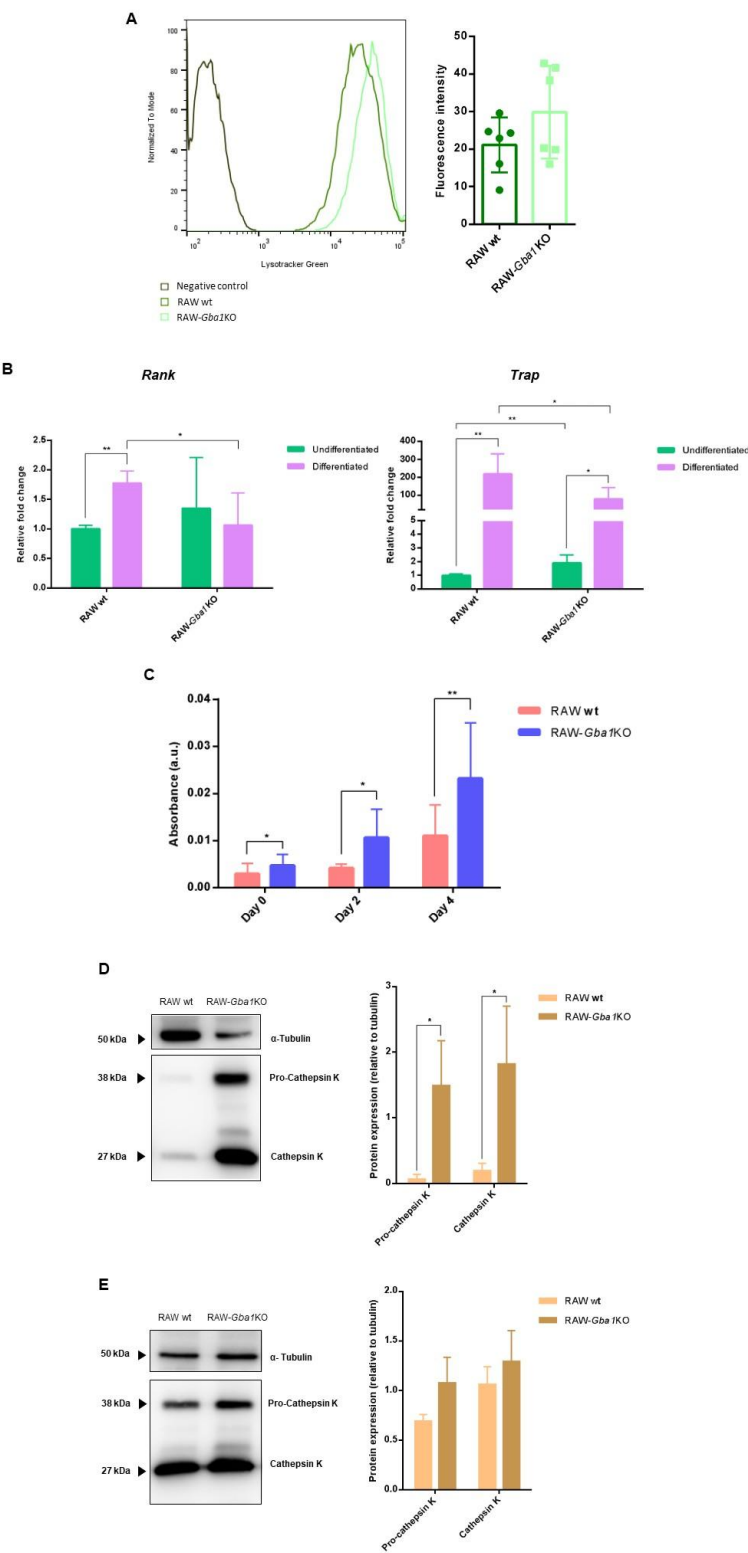
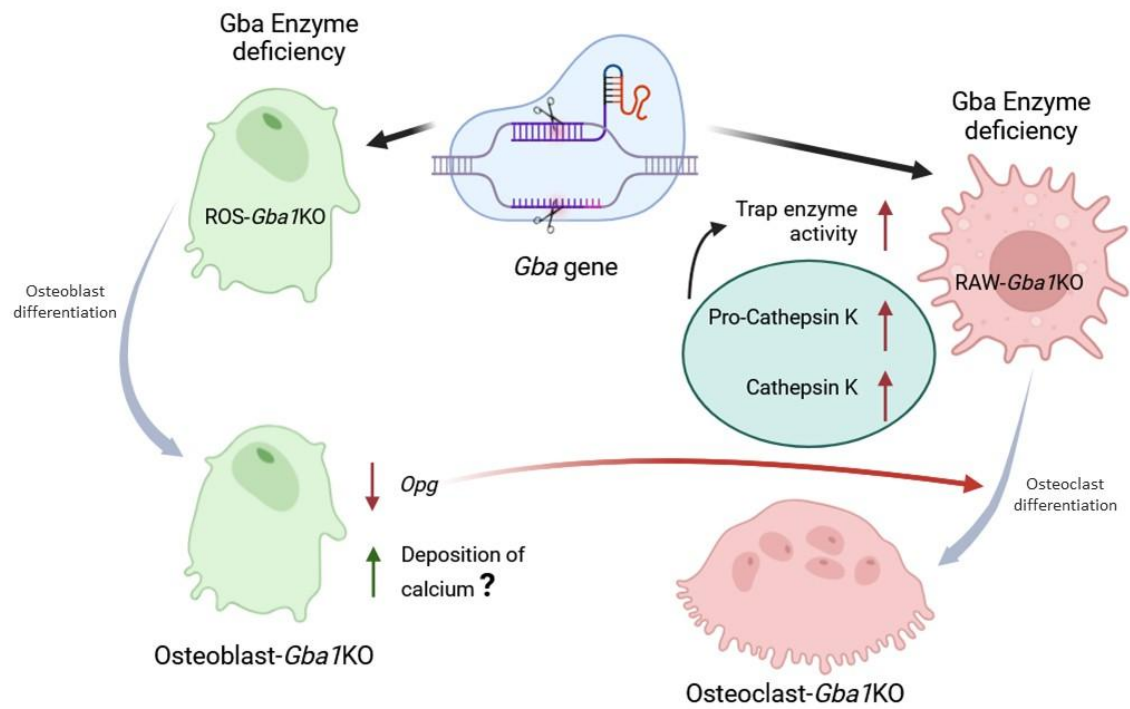


Figure 4.



Declaration of Interest Statement

Declaration of interests

X The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☒The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Natalia Garcia Giralt and Susanna Balcells reports financial support was provided by Network of Biomedical Research Centers Consortium. Susanna Balcells and Raquel Rabionet reports financial support was provided by Spain Ministry of Science and Innovation. Xavier Nogues and Susanna Balcells reports financial support was provided by Government of Catalonia Agency for Administration of University and Research Grants. All authors reports was provided by European Development Fund. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary Material

Generation and characterization of bone cell lines with Gba1 mutations as cell-intrinsic models of Gaucher's bone disease

Juan-David Patiño-Salazar ¹, Sara Heredero-Jimenez ², Eduardo Martín-Guerrero ², Núria Martínez-Gil ^{1#}, Mónica Cozar ¹, Diana Ovejero ³, Xavier Nogués ³, Laura Cinque ⁴, Juan A Ardura ², Arancha R Gortazar ², Daniel Grinberg ¹, Susanna Balcells ¹, Natalia Garcia-Giralt ^{3*}, and Raquel Rabionet ^{1*}

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain.

² Bone physiopathology laboratory, Institute of Applied Molecular Medicine (IMMA), San Pablo-CEU University, CEU Universities, Campus Montepíncipe, Madrid, Spain.

³ Musculoskeletal Research Group, Hospital del Mar Research Institute, CIBERFES, ISCIII, Barcelona, Spain.

⁴ Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples, Italy

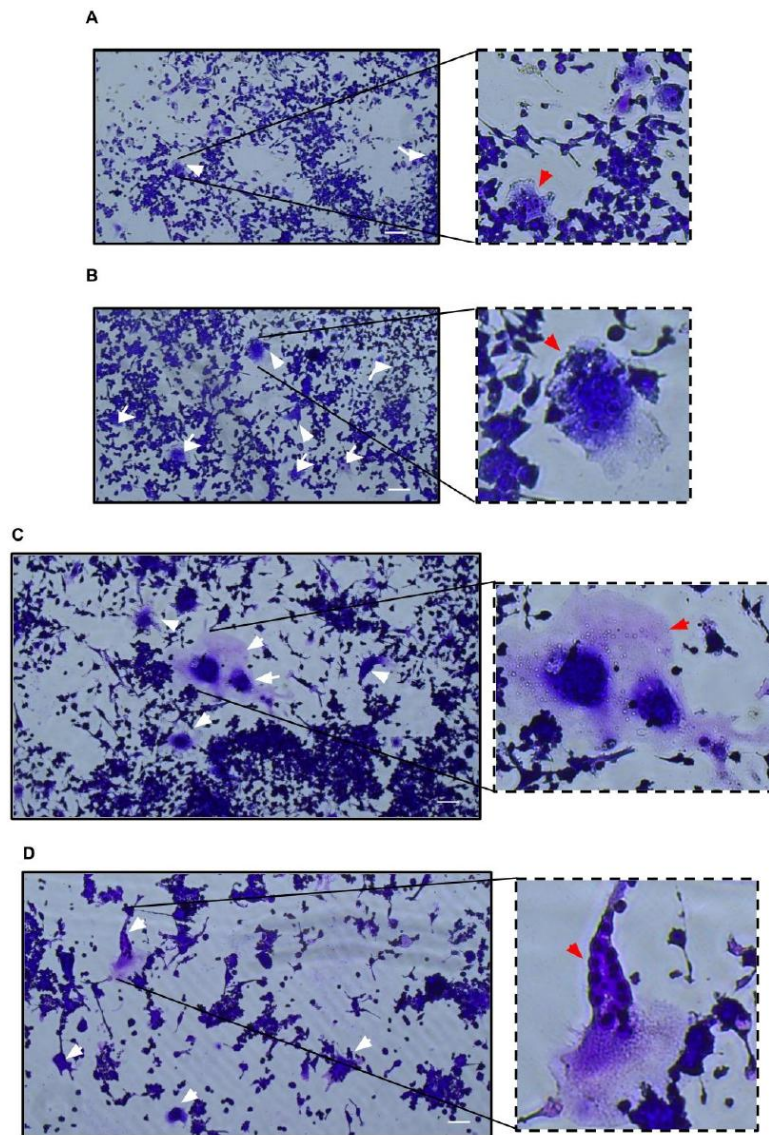
[#] Present address: Department of Clinical and Molecular Genetics, Vall d'Hebron University Hospital, Medical Genetics Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain.

* Corresponding author:

Natalia Garcia-Giralt: ngarcia@researchmar.net



Supplementary Figure S1: Sanger sequencing of the edited and selected clones. The sequences correspond to the *Gba1* fragments edited in A.) ROS-*Gba1*KO1 cells. Deletion of 2 nucleotides. B.) ROS-*Gba1*KO2 cells. Deletion of 1 nucleotide. C.) RAW-*Gba1*KO cells. Deletion of 50 nucleotides on allele 1 (upper panel) and 1 nucleotide on allele 2 (lower panel).



Supplementary Figure S2: Giemsa staining in RAW wt (A) and RAW-Gba1KO (B) cells undifferentiated, and differentiated cells with Rankl 50ng/mL for four days (C) and (D) respectively. White arrows indicate osteoclasts (cells with 3 or more nuclei). The right panels show in detail an osteoclast for each cell type indicated by the red arrow. Scale bar: 100 μ m

Supplementary Table S1: Primers used for RT-PCR analyses. Primers were designed from available mouse and rat sequences using the primer analysis software Primer3. Sigma-Aldrich Synthetic guide RNA (RN00064-0684536) is shown in the last file.

NAME	ORGANISM	SEQUENCE
<i>Gapdh</i> (Fw)	Rat	5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'
<i>Gapdh</i> (Rv)	Rat	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
<i>Runx2</i> (Fw)	Rat	5'-ATGGCCGGGAATGATGAGAA-3'
<i>Runx2</i> (Rv)	Rat	5'-AGCTTCTGTCTGTGCCTTCT-3'
<i>Bglap</i> (Fw)	Rat	5'-AAAGCCCAGCGACTCT-3'
<i>Bglap</i> (Rv)	Rat	5'-CTAAACGGTGGTGCCATAGAT-3'
<i>Opg</i> (Fw)	Rat	5'-ACAGTTTGCCTGGGACCAAA-3'
<i>Opg</i> (Rv)	Rat	5'-TCACAGAGGTCAATGTCTTGGA-3'
<i>Rank</i> (Fw)	Mouse	5'-TGGGTCAATGATGCTTGCA-3'
<i>Rank</i> (Rv)	Mouse	5'-ATCTCTGACTTCTGCCAGG-3'
<i>Trap</i> (Fw)	Mouse	5'-CACGAGAGTCCTGCTTGTC-3'
<i>Trap</i> (Rv)	Mouse	5'-AGTTGGTGTGGGCATACTTC-3'
sgRNA (RN00064-0684536)	Rat/Mouse	5'-CTTCTGGCTGCAAGGTTAGT-3'

Supplementary Table S2: Number of off-targets according to results from Benchling

<i>In silico</i> Off-target Prediction				
Sequence	PAM	Score	Gene	Cut locus
CTTCTGGCTGCAAGGTTAGT	AGG	100	<i>Gba1</i> (<i>ENSRNOT00065043154.1</i>)	chr2:-188517808
ATGCTGGCAGCAAGGTTAGT	AAG	1,7		chr13:-28677348
CTACAGACTGCAAGGTTAGT	AAG	1,7		chr4:-97570655
GTGCTGGCTGCAAGGTGAGT	CAG	1,5		chr1:+210265431
GTACAGGCTTCAAGGTTAGT	GAG	1,4		chr18:-24099113
CTTCTGTTTGAAGGTTAGT	GAG	0,9		chr17:+26056386
CAACTAGATGCAAGGTTAGT	CAG	0,9		chr2:+116093750
GTTACAGGCTCCAAGGTTAGG	AAG	0,8		chr2:-140859102
CGTCTGCTCCAAGGTTAGT	GGG	0,8		chr3:-165367006
ATTAAGGCTGCAAGGTCAGT	TGG	0,7		chr12:-9999542
CCTCTGGTTCCTAGGTTAGT	TGG	0,7		chr14:+87717959
CCTCTGGTTCCTAGGTTAGT	TGG	0,7		chr14:+87705942
CCCCTGGGTGCAAGGTTAGT	AAG	0,7		chr13:+35309737
CTGCTGGTTTCAAGGTCAGT	CAG	0,6		chr14:-45416799
CAGCTTCTGCAAGGTTAGT	CAG	0,6		chr8:-110550471
AATCTGCCTGCCAGGTTAGT	AGG	0,6		chr5:+127430438
TTTCTGGATGCAAAGTTAGT	CAG	0,5		chr9:+2028467
TTTCTAGCTACAAGGTTAGG	CAG	0,5		chr19:-14105711
CTTCTGCTGGGAGGTTAGT	GAG	0,5		chr10:+108991200
CAGCTAGCTGCTAGGTTAGT	TGG	0,5		chr4:-67188444
GTTGTGGCTGATAGGTTAGT	CGG	0,5		chr3:+38534096
TATCTGCCTGCATGGTTAGT	GAG	0,5		chr2:-158151678
ATTATGGCTGGAAGGTGAGT	TAG	0,4		chr1:+209272758
TTTCTGGGTGAAAGGTGAGT	TGG	0,4		chr2:+234433883
TTTCTGGGTGAAAGGTGAGT	TGG	0,4		chr2:-234237600
CTGCCTGCTGCAAGGTCAGT	AGG	0,4		chr3:-176480538
CTCCTTGCTTCAAGGTCAGT	GGG	0,4		chr3:+163624146
CTTCTGCTTCAAGGTGAGT	GGG	0,4		chr7:-119346141
GATCTGGCTGCATGGTTAGA	TGG	0,4		chr1:-17564832
ATTATGGCTGTAAAGTTAAT	AAG	0,4		chrX:+129546514
CATTTGGCTGCAAGGTAAGA	GAG	0,4		chr10:+82972034
TTTCTAGCTCCATGGTTAGT	CAG	0,4		chr1:-159528888
CTTCCCGCTTCAAGGTGAGT	GGG	0,4		chr3:+61666190
CTTGTAAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-4273214
CTTGTAAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2934936
CTTGTAAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2912491
CTTGTAAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2880845
CTTGTAAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2850035
CTTGTAAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2816344

CTTGTAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2793993
CTTGTAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2760022
CTTGTAGGTGCAGGGTTAGT	GGG	0,4		chr20:-2726244
CATCTGGCTGCAAGTTACT	GAG	0,4		chr8:+52224385
CTGATGGCTGAAGGGTTAGT	CAG	0,4		chr8:-47194267
CTTAAGGCTGCAAGGTAAGA	TGG	0,3		chr6:-130881941
ATTATGGCTGCCTGGTTAGT	CGG	0,3		chr20:+12275063
CATCTGTCTGCAAGTTAGT	GAG	0,3	Nhlh1 (ENSRNOG00000005166)	chr13:+90442953
CTTGGGCTGGAAGGTTACT	TGG	0,3		chr14:-13063002
CTTCAGACCGAAAGGTTAGT	AGG	0,3		chr18:-2045928
CGTCTGGCTCCAGGTGAGT	CAG	0,3		chr17:+54583323

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis, hemos abordado algunos trastornos esqueléticos relacionados con alta y baja masa ósea. Dentro del grupo de trastornos con baja masa ósea, hemos analizado enfermedades comunes como la OP y más específicamente, la OP postmenopáusica y la FDH. Dentro de los trastornos con alta masa ósea hemos abordado un caso familiar de displasia ósea esclerosante caracterizada por lesiones lucentes y HBM. Finalmente, hemos estudiado otras patologías que, sin ser clasificadas propiamente como un trastorno esquelético, sí presentan un fenotipo óseo dentro del cuadro clínico que se puede desarrollar. En concreto, hemos abordado el fenotipo óseo de la EG1 para dilucidar las posibles causas a nivel celular que pueden desencadenar dicho fenotipo. Este espectro de trastornos esqueléticos los hemos analizado a través de aproximaciones genómicas (los trastornos con baja masa ósea) y de estudios funcionales de variantes genéticas implicadas (el trastorno con alta masa ósea y la EG1) que nos han permitido poner a prueba algunas hipótesis que nos hemos planteado y que han dirigido los diseños experimentales que hemos llevado a cabo.

En esta sección discutiremos los principales hallazgos que hemos tenido en la realización de esta tesis, así como las limitaciones y futuros experimentos que pueden hacerse. Para ello, desarrollaremos cuatro apartados: 1. Entender la heterogeneidad de las enfermedades esqueléticas monogénicas y poligénicas: de la investigación básica a la práctica clínica; 2. Variantes genéticas estudiadas en el contexto de los trastornos esqueléticos; 3. Otros modelos celulares y animales para entender la EG y su fenotipo óseo; 4. Valoración global de los estudios realizados en esta tesis y perspectivas futuras.

1. Entender la heterogeneidad de las enfermedades esqueléticas monogénicas y poligénicas: de la investigación básica a la práctica clínica

Los trastornos óseos y minerales comúnmente tienen una base genética, que puede deberse a una variante patogénica de un solo gen de la línea germinal (es decir, un trastorno mendeliano o monogénico), una variante somática de un solo gen (es

decir, un trastorno postcigótico en mosaicismo) o involucrar múltiples variantes genéticas (es decir, trastornos oligogénicos o poligénicos) (234,283). Las variantes genéticas que causan enfermedades mendelianas suelen tener un gran efecto (es decir, penetrancia), mientras que los trastornos oligogénicos o poligénicos son causados por múltiples variantes genéticas, cada una de las cuales tiene efectos más pequeños, en combinación con factores ambientales (Figura 16) (284). Aunque la mayoría de los trastornos monogénicos surgen de variantes raras, patogénicas, en regiones codificantes, la mayoría de las variantes genéticas comunes asociadas con rasgos poligénicos se ubican en regiones no codificantes, generalmente cerca de genes candidatos implicados en el fenotipo respectivo (285).

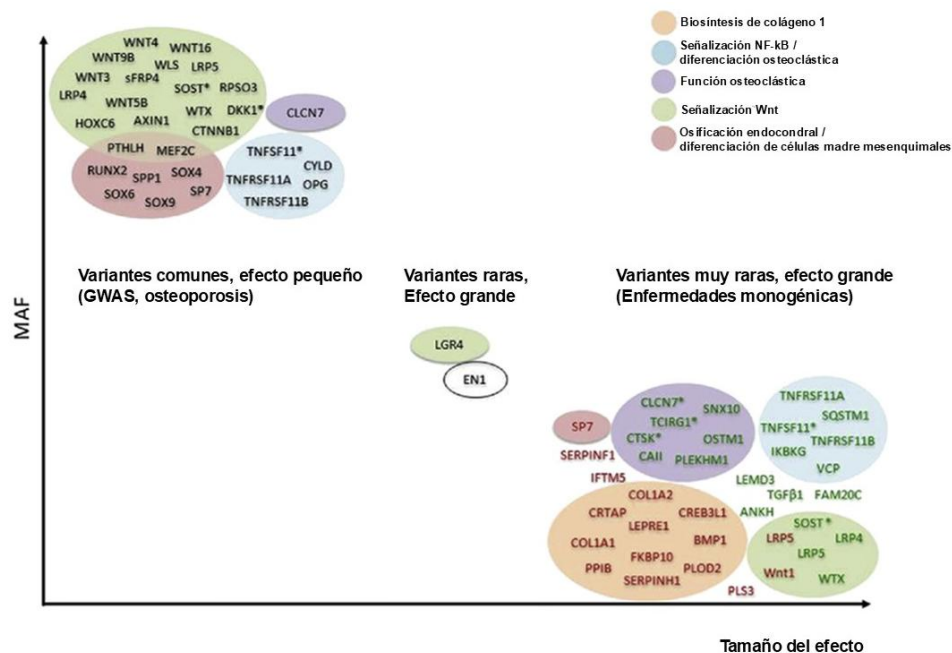


Figura 16. Resumen de la MAF y la magnitud del efecto de las variantes identificadas para trastornos monogénicos y osteoporosis, así como su función en diferentes procesos que regulan el metabolismo óseo. Los genes en rojo contienen variantes causantes de enfermedades que conducen a trastornos con LBM. Los genes en verde están relacionados con trastornos con HBM. *Aprobado o estudiado como diana terapéutica. Tomada y adaptada de (250)

Existe una superposición considerable entre los genes que causan trastornos óseos monogénicos y aquellos que contribuyen a los fenotipos esqueléticos poligénicos.

Un ejemplo claro de ello es lo que sucede con la OI y la OP, puesto que hay varios genes relacionados con la OI que también podrían estar implicados en el fenotipo de la OP, sobre todo si tenemos en cuenta que ambos trastornos presentan baja DMO. De hecho, la primera hipótesis de nuestro trabajo, que orientó el análisis que hicimos con las muestras de la cohorte BARCOS mediante el panel de genes, partía de este supuesto. Dentro de nuestros hallazgos recogidos en el primer artículo de esta tesis, tuvimos una variante patogénica en heterocigosis en el gen *COL1A2* que implica un cambio en un residuo de glicina (p.Gly751Ser) (las mutaciones más frecuentes que causan OI son sustituciones de un solo nucleótido que cambian residuos de glicina), en una muestra del grupo LZ con un Z-score de columna lumbar de -3.19. A pesar de que esta variante fue identificada en una mujer con osteoporosis densitométrica aunque sin historial de fracturas, no tenía una clínica que pudiese correlacionarse con OI. Esta misma variante, como lo comentamos ampliamente en la discusión del artículo, ya había sido descrita antes, y uno de los artículos que la describió (286) la encontró también en heterocigosis en una mujer con OP postmenopáusica, evidenciando la superposición fenotípica y genotípica entre la OP y la OI leve.

La herencia de los trastornos monogénicos puede darse de varias formas: autosómica dominante (por ejemplo, la OI clásica causada por mutaciones en los genes *COL1A1* y *COL1A2* (287)); autosómica recesiva (por ejemplo, el raquitismo dependiente de vitamina D tipos I y II debido a mutaciones de los genes de la 1 α -hidroxilasa renal (*CYP27B1*) y del receptor de vitamina D (*VDR*), respectivamente (288)); recesiva ligada a X (como por ejemplo la OP ligada al cromosoma X debido a mutaciones del gen de la plastina 3 (*PLS3*) (289)); dominante ligada a X (por ejemplo, la hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH) debido a mutaciones del gen de la fosfato endopeptidasa en el cromosoma X (*PHEX*) (288)); ligada a Y (la azoospermia y oligospermia debido a deleciones de regiones del cromosoma Y, por ejemplo (234)); y trastornos mitocondriales no mendelianos (tales como el hipoparatiroidismo asociado con el síndrome de Kearns-Sayre y el síndrome de encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a ictus (MELAS) (290)).

Por otro lado, el patrón de transmisión de los trastornos poligénicos puede ser especialmente complejo y variable, debido a las interacciones génicas así como a los factores ambientales. Ejemplos de estos trastornos incluyen la OP y la nefrolitiasis hipercalcémica (125,291,292). Además, rasgos poligénicos como la OP también pueden presentarse como trastornos monogénicos, aunque pasen desapercibidos, por ejemplo, la ya mencionada OP ligada al cromosoma X debido a mutaciones en *PLS3* o la OP de inicio temprano debido a mutaciones en heterocigosis de los genes de la familia de Wnt (*WNT1*) o de la esfingomielina sintasa (*SGMS2*) (293,294).

En este sentido, los estudios epigenéticos han ayudado a ampliar nuestra comprensión de trastornos poligénicos como la OP. Como sabemos, la epigenética es el estudio de los cambios en la expresión génica que no se deben a una modificación de la secuencia de nucleótidos del ADN. Estos cambios son hereditarios, reversibles, específicos del tipo celular y del tejido, y dependientes de la interacción con el entorno. Los mecanismos epigenéticos se asocian con el envejecimiento, lo que respalda su asociación con enfermedades relacionadas con la edad, como la OP. Se han descrito tres mecanismos epigenéticos: modificación de histonas, ARNs no codificantes y metilación del ADN (295).

La modificación de histonas consiste en modificaciones postraduccionales en los extremos N-terminales de las histonas, e incluye acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación o sumoilación. Estas modificaciones pueden impulsar cambios en la interacción del ADN con las histonas o con otros complejos de unión al ADN. Un ejemplo importante para la homeostasis ósea es la desacetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9) en los nucleosomas del promotor *SOST*, realizada por la sirtuina 1 (*SIRT1*). Esta desacetilación reduce la expresión génica, lo que provoca un aumento de la activación de la vía Wnt y, consecuentemente, un aumento de la formación ósea (296).

La metilación del ADN consiste en la unión de un grupo metilo (CH_3) al carbono 5 de la citosina dentro de los dinucleótidos CpG. La metilación del ADN generalmente se asocia con una inhibición de la expresión génica. Se ha demostrado que la

metilación del ADN alrededor de regiones promotoras de algunos genes se incrementa con la edad (297). En el campo del hueso, por ejemplo, estudios hechos con muestras de sangre de mujeres osteoporóticas han mostrado un aumento en la metilación de la región promotora de genes como *BMP2*, que participan en la formación ósea, disminuyendo su transcripción, lo cual, a su vez, afecta la actividad transcripcional cascada abajo de genes importantes en la osteoblastogénesis tales como *RUNX2* y *SP7* (298).

En cuanto a los ARNs no codificantes (ARNnc), estos están codificados en el ADN genómico que no se traduce a proteínas (el 98 % del ARN transcrito). Dentro de los ARNnc, los tipos más estudiados y asociados con patologías humanas son el ARN largo no codificante (ARNlnc) y el microARN (miARN). Los miARNs tienen una longitud aproximada de 20 a 25 nucleótidos y representan una clase de moléculas de ARN pequeño no codificante conservadas evolutivamente. Existen alrededor de 2600 miARNs maduros en el genoma humano, que controlan la actividad de más del 60% de los genes codificantes de proteínas. La expresión diferencial de miRNAs controla factores clave en la maduración y proliferación de células óseas, incluyendo BMP, la vía de Wnt/ β -catenina, *RUNX2*, *SP7*, entre otros. Se ha demostrado que los miRNAs desempeñan un papel crucial en la consolidación de fracturas y la función osteoblástica; específicamente, el miR-21 se ha asociado con una mejor mineralización durante la inducción osteogénica, mientras que el miR-16-5p, por el contrario, se ha relacionado con la inhibición de este proceso (299–302).

Si bien en el desarrollo de esta tesis no hemos analizado directamente mecanismos epigenéticos en los ensayos realizados, sí hemos evaluado biomarcadores óseos que están altamente regulados por estos mecanismos en el contexto de trastornos poligénicos como la osteoporosis.

Uno de los trastornos que también analizamos en esta tesis y que, podríamos decir, está en el otro extremo de la OP en términos de frecuencia, es la FDH, una patología muy poco frecuente que está ligada al cromosoma X y que está causada por mutaciones somáticas en el gen *PORCN*. Este, al contrario de lo que sucede con la OP, es por tanto un trastorno monogénico. En la descripción del caso clínico que

hemos reportado en nuestro segundo artículo, hemos tenido un hallazgo que llamó nuestra atención y que amplía el panorama sobre la investigación de los trastornos esqueléticos, puesto que el paciente del caso descrito, además de tener las manifestaciones óseas típicas de la FDH, también tenía LBM y un historial de fracturas por fragilidad en la infancia y la adolescencia. Después de buscar en la literatura, encontramos otros casos de FDH que presentaron fracturas por fragilidad durante la infancia, así como resultados de estudios preclínicos en los que probaron inhibidores de PORCN, los cuales afectaron significativamente la masa ósea. Estas observaciones nos llevaron a hipotetizar que probablemente la FDH sea una causa monogénica poco reconocida de LBM debido a una afectación en la señalización de la vía de Wnt/ β -catenina (Tabla 6). Si bien el diagnóstico de algunos trastornos esqueléticos puede ser evidente a partir de características clínicas o radiográficas, como en el caso de la FDH, no significa que el fenotipo sea exclusivo de esa patología en concreto, ya que muchos trastornos esqueléticos comparten fenotipos superpuestos, como disminución de la DMO, fragilidad esquelética y mineralización alterada (283,284). Por ello, cuando hablamos de trastornos con baja DMO debemos pensar en un conjunto amplio de patologías y de genes que, probablemente, compartan un espectro genético (como genes de la vía de Wnt/ β -catenina, por ejemplo) y fenotípico en muchos de los casos.

Tabla 6. Hipótesis planteadas para el desarrollo de esta tesis y resultados correspondientes obtenidos

Hipótesis planteadas en esta tesis	Principales hallazgos	Consideraciones adicionales	Artículo
Las variantes genéticas raras en genes asociados con varios fenotipos óseos monogénicos, en particular la osteogénesis imperfecta (OI), podrían contribuir al desarrollo de valores extremos de DMO en cohortes poblacionales de mujeres posmenopáusicas (como la cohorte BARCOS)	Variante patogénica en heterocigosis en el gen <i>COL1A2</i> p.(Gly751Ser) en una muestra del grupo LZ	La variante hallada en el gen <i>COL1A2</i> evidencia la superposición fenotípica y genotípica entre la OP y la OI leve. Se encontraron variantes adicionales en muestras del grupo LZ en los genes <i>TCIRG1</i> , <i>SEC24D</i> , <i>LRP4</i> y <i>ANO5</i> ; y en una muestra del grupo HZ en el gen <i>LMNA</i> . La variante del gen <i>SEC24D</i> fue clasificada como benigna/probablemente benigna y las demás como VUS (ClinVar). No observamos un enriquecimiento de variantes raras de OI en el grupo de baja DMO y, a excepción de la variante en <i>COL1A2</i> , las variantes no pudieron asociarse claramente con el fenotipo de densidad ósea de las muestras. Nuestro análisis sugiere que la contribución de las variantes raras a la osteoporosis posmenopáusica es escasa. El número de muestra de este ensayo no nos permitió obtener resultados estadísticamente significativos en el <i>burden test</i> que realizamos	Artículo 1
La hipoplasia dérmica focal (FDH), causada principalmente por variantes genéticas en el gen <i>PORCN</i> , es probablemente una causa monogénica poco reconocida de LBM	Paciente de 29 años, hombre, caucásico, con una displasia esquelética sin diagnosticar, asociada con LBM (LS Z-score = -4.3 y FN Z-score = -3.5) y fracturas por fragilidad en su infancia y adolescencia. Los análisis WES nos permitieron identificar una variante <i>missense</i>	Los análisis genéticos y clínicos realizados al paciente, indicaron que está afectado con una FDH. El gen <i>PORCN</i> codifica para una proteína involucrada en la palmitoilación de proteínas Wnt, proceso que es clave en la señalización de la vía de Wnt canónica y no canónica (303). Las variantes en el gen <i>PORCN</i> son las responsables del fenotipo de la FDH. La extrema rareza del trastorno, la falta de una evaluación metabólica mineral exhaustiva en los pacientes y su variabilidad clínica, probablemente han	Artículo 2

debida a una señalización defectuosa de la vía de Wnt	p.(Arg296Pro) en el gen <i>PORCN</i>. La FDH es probablemente una causa monogénica poco reconocida de LBM debida a una señalización defectuosa de la vía de Wnt	contribuido a que se pase por alto el estado de la masa ósea en este trastorno. Hallazgos esqueléticos en estudios preclínicos con inhibidores de <i>PORCN</i> ejemplifican cómo la baja DMO es mecanísticamente plausible en la FDH (156).	
Variantes en <i>SEM4AD</i> , <i>TBX18</i> , <i>PTCH1</i> , <i>PTK7</i> , o <i>ADGRE5</i> podrían ser las causantes del fenotipo de un caso familiar de displasia ósea esclerosante caracterizado por lesiones óseas lucentes y HBM	De acuerdo con nuestros análisis <i>in silico</i>, ninguna de las variantes de los genes <i>SEM4AD</i>, <i>TBX18</i>, <i>PTCH1</i>, <i>PTK7</i>, y <i>ADGRE5</i> afectó la estructura conformacional de la proteína ni comprometió la estabilidad proteica. La variante p.Arg349Gln en <i>TBX18</i> no afectó su actividad transcripcional. Nuestros ensayos de diferenciación de osteoblastos para validar funcionalmente la variante p.Val212Met en <i>SEMA4D</i> no permitieron obtener resultados concluyentes.	Para los ensayos funcionales priorizamos las variantes de los genes <i>TBX18</i> y <i>SEM4AD</i>. Contrariamente a lo que cabría esperar de un represor transcripcional, los resultados de nuestros ensayos con luciferasa mostraron un aumento de la actividad cuando las células se transfectaron con <i>TBX18</i> wt, en comparación con las células transfectadas con un vector vacío (304). La mutación interrogada se comportó como <i>TBX18</i> wt y no como la mutación control. Otros ensayos <i>in vitro</i> con CM de osteoclastos, han demostrado que la fracción soluble de la Semaforina 4D quizá no sea suficiente para generar un efecto inhibitorio sobre la osteoblastogénesis y que tal vez, la fracción unida a membrana también juegue un rol importante en esta función inhibitoria (44). No nos fue posible establecer la cantidad de proteína soluble <i>SEMA4D</i> en nuestro CM, a pesar de que pudimos observar su expresión en dicho medio a través de western blot.	Artículo 3

Los trastornos esqueléticos monogénicos o poligénicos no solamente se encuentran, en términos de DMO, dentro del grupo LBM, también hemos hablado ampliamente de los trastornos con alta masa ósea y del fenotipo HBM. Varios de los trastornos monogénicos que presentan dicho fenotipo, están relacionados con defectos en genes importantes de la vía de Wnt/ β -catenina (305,306). De hecho, una característica común de la HBM anabólica es la activación de la vía de Wnt/ β -catenina, cuyo aumento de la señalización en esta vía explica el fenotipo de la esclerosteosis, la enfermedad de Van Buchem y las HBM *LRP4*, *LRP5* y *LRP6* (180,307). Por ejemplo, se han identificado varias mutaciones de ganancia de función en el gen que codifica para *LRP5*, un correceptor de la vía de Wnt involucrado en la formación ósea. Estas mutaciones alteran los efectos de la esclerostina sobre la vía, produciendo así fenotipos similares a los observados en la esclerosteosis, con agrandamiento mandibular y del cráneo como rasgos comúnmente encontrados (308–310). Por otro lado, mutaciones de pérdida de función en *LRP5* causan un trastorno con baja masa ósea llamado osteoporosis pseudoglioma (OPPG) (183,311). De igual manera, mutaciones en el gen *LRP4* que afectaron su interacción con la esclerostina y, por tanto, el efecto inhibitorio concomitante de esta última sobre la vía de Wnt, fueron observadas en pacientes con sobrecrecimiento óseo, poniendo en evidencia la relación de mutaciones en este gen con el fenotipo HBM (312–314). De manera interesante, uno de los genes implicados en nuestro estudio del artículo 1 de esta tesis, fue *LRP4*, aunque la variante fue encontrada en una muestra del grupo con LBM (*Z-score* = -2.43), lo cual nos llevó a pensar que la probable contribución de esta variante al fenotipo LBM de nuestra muestra es poco clara.

Dentro de los trastornos esqueléticos que estudiamos en el desarrollo de esta investigación doctoral, está también el caso familiar de una displasia ósea esclerosante caracterizado por presentar lesiones lucentes y HBM (artículo 3). Las llamadas displasias óseas esclerosantes son un grupo heterogéneo de enfermedades monogénicas raras que se caracterizan por un aumento significativo de la masa ósea, lo que resulta en una amplia gama de complicaciones clínicas secundarias. La investigación genética sobre estas afecciones ha permitido

identificar diversos genes implicados y un amplio conjunto de mecanismos patogénicos (315). En la última edición de clasificación y nomenclatura de displasias esqueléticas, estos trastornos han sido agrupados en tres categorías que incluyen displasias osteoscleróticas neonatales, osteopetrosis y otros trastornos de HBM (54). Dentro de los genes implicados en la categoría 1 están *PTH1R*, *COL1A1* y *FAM20C* (*FAM20C golgi associated secretory pathway kinase*). En la categoría 2 encontramos genes como *TCIRG1*, *CLCN7*, *RANKL*, *CTSK*, entre otros. Finalmente, en la categoría 3 encontramos genes como *SOST*, *LRP4* y *SFRP4* (*secreted frizzled related protein 4*) (54). En nuestro análisis de la cohorte BARCOS del artículo 1, encontramos una variante en el gen *TCIRG1* en la muestra con el más bajo Z-score (-4.26), en heterocigosis, haciendo difícil explicar el hallazgo de esta variante dentro del grupo LBM y su asociación con dicho fenotipo, puesto que ya hemos visto que este gen se ha relacionado con el fenotipo opuesto (HBM). Con todo, se han reportado variantes en este gen, en pacientes con fenotipo LBM que experimentaron fracturas femorales atípicas (316).

En el caso familiar que estudiamos en nuestro tercer artículo, observamos un fenotipo esquelético único con una combinación de características escleróticas y lesiones óseas lucentes, así como valores elevados de IMI (*impact microindentation*), en tres miembros de una familia: el probando, su hijo y su hija. La DMO era muy elevada en el probando y su hija. La hija del probando también presentaba escoliosis idiopática (SI), además de trombocitopenia leve y anomalías tiroideas estructurales leves, que fueron las únicas anomalías extraesqueléticas identificadas (228). En este caso, nuestros esfuerzos se enfocaron en validar funcionalmente mediante estudios *in silico* e *in vitro* los resultados obtenidos a partir de la realización de un WES en las muestras de varios miembros de la familia para filtrar y priorizar aquellas variantes encontradas únicamente en los individuos afectados. Se priorizaron 5 variantes putativamente patogénicas encontradas en 5 genes asociados con metabolismo óseo: *SEMA4D*, *TBX18*, *PTCH1*, *PTK7* y *ADGRE5*, dentro de los cuales las variantes de *SEMA4D* y *TBX18* fueron seleccionadas para hacer las validaciones *in vitro* por considerarlos genes esenciales en el desarrollo y la función del hueso y porque tuvieron los puntajes más

altos en los análisis de patogenicidad. En este estudio, los hallazgos observados en el análisis del caso familiar, nos llevaron a sugerir que puede haber otras variantes en regiones no codificantes o alguna variante penetrante rara con un efecto mayor que podríamos haber pasado por alto en nuestro análisis y que podría ser responsable del fenotipo óseo analizado (Ver Tabla 6). El diseño experimental que nos planteamos solo nos permitió demostrar que la variante en *TBX18* no parecía ser responsable del fenotipo óseo encontrado en la familia, puesto que los estudios de la variante de *SEMA4D* no arrojaron resultados concluyentes. En la siguiente sección discutiremos otras posibles aproximaciones experimentales para evaluar esta variante.

Con lo discutido hasta aquí, vemos que el abordaje de los trastornos esqueléticos con baja y alta masa ósea es una tarea compleja, que implica grandes retos tanto para el diagnóstico clínico como para la investigación básica, por un lado, por la genética heterogénea y superpuesta, por decirlo de alguna manera, que existe entre los trastornos esqueléticos monogénicos y poligénicos (283) y, por otro lado, por lo laborioso que resultan los estudios funcionales. Además, como se ha dicho, variantes genéticas responsables de enfermedades monogénicas suelen tener un mayor efecto que las variantes asociadas con trastornos poligénicos lo que aumenta la complejidad del abordaje de trastornos poligénicos.

Sin embargo, en los últimos años se han dedicado muchos esfuerzos a la determinación de variantes y genes que pueden ser importantes para la DMO y, con ello, para diversas patologías óseas, tanto en la investigación clínica como en la investigación básica. El desarrollo de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido la identificación de variantes genéticas en muchas patologías humanas. Gracias al desarrollo de dispositivos de NGS escalables, de alto rendimiento y fáciles de usar, los experimentos de NGS a gran escala son ahora más asequibles que antes y con plazos de entrega razonables, lo cual ha impulsado la expansión de la implementación de la NGS, desde la investigación hasta el laboratorio clínico (233). Por otro lado, los estudios GWAS han permitido identificar muchos *loci* que se desconocían hasta hace unos años atrás y que, en el campo

del hueso, se han visto asociados con rasgos importantes como la DMO (ver artículo 5 en el anexo de esta tesis) (317–319). Estos estudios han tenido mucho éxito al confirmar genes previamente identificados, como *SOST* y *LRP5*, implicados en enfermedades esqueléticas monogénicas, y al identificar nuevos genes candidatos cuyo papel en la biología ósea se desconoce actualmente. Además, los GWAS han abierto la puerta al cálculo de riesgos poligénicos individuales (PRS) que pretenden informar a las personas de su riesgo genético para distintas enfermedades poligénicas, permitiendo así que se tomen medidas preventivas para evitarlas. Por ejemplo, en el campo del hueso, una combinación de efectos de tamaño de múltiples variantes en la forma de PRS, puede proporcionar un indicador útil del riesgo de fractura más allá del obtenido mediante los factores de riesgo clínicos convencionales (320).

Con todo, los análisis GWAS tienen varias limitaciones, dentro de las cuales una muy importante en el contexto de esta tesis doctoral, es que no tienen en cuenta variantes raras, puesto que los marcadores utilizados para evaluar la asociación con el fenotipo suelen ser tagSNPs distribuidos homogéneamente por todo el genoma y que aparecen en una fracción significativa de individuos ($MAF > 5\%$). Por lo tanto, las variantes raras con fuertes efectos fenotípicos se descartan intrínsecamente en estos estudios. Además, el número de la muestra tiene un gran peso en estas aproximaciones, haciendo que se deban tener muestras muy grandes para alcanzar una significatividad estadística, razón por la cual se han creado varios consorcios para realizar análisis y meta-análisis GWAS que puedan tener resultados de asociación significativos (243,321).

El presente trabajo no incluyó análisis de GWAS, pero estos sí nos sirvieron de base para la realización de nuestra primera aproximación mediante el panel de genes que hemos diseñado. Asimismo, dadas las limitaciones de los estudios GWAS ya comentadas, y ya que nuestros objetivos apuntaron más hacia aproximaciones genómicas y estudios funcionales de variantes genéticas raras, nos decantamos por el uso de técnicas como WES, panel de genes por captura dirigida (panel TS) y validaciones funcionales *in silico* e *in vitro* (como ensayos de gen reportero

luciferasa y ensayos con medio condicionado). A continuación, recogeremos de forma sumaria, las técnicas usadas en esta tesis, centrándonos en las ventajas y limitaciones que tienen para dilucidar el papel de una variante genética en el contexto de los trastornos esqueléticos.

a. *Aproximaciones genómicas:*

a.1 Panel TS y WES: tanto los paneles TS como los WES tienen una resolución de nucleótido único de genes candidatos, cubriendo regiones exónicas y sitios de *splicing*. Los paneles TS, además, también pueden cubrir regiones intrónicas. Ambas técnicas pueden detectar anormalidades como SNVs, indels y CNVs. Dentro de las ventajas de las dos aproximaciones tenemos: se pueden adaptar y diseñar según los requerimientos del investigador; la profundidad de los análisis es mayor al centrarse en grupos de genes específicos; son técnicas ideales para el descubrimiento de genes asociados con enfermedades mendelianas; son una alternativa más económica que la WGS; tienen una buena cobertura del genoma, si se tiene en cuenta que cerca del 85% de las variantes causantes de patologías están en el exoma; tiene un buen rendimiento; el volumen de datos para los análisis es manejable (222,223,233). Dentro de las limitaciones podemos considerar las siguientes: Requiere un trabajo previo para definir grupos de genes que se quieren incluir, así como la profundidad y cobertura de los análisis; la probabilidad de encontrar VUS puede incrementar si se incrementa el número de genes incluidos en el panel; no son técnicas pertinentes si se desconoce la etiología del trastorno; para el caso del WES, no hay captura de regiones intrónicas de interés (como regiones promotoras o reguladoras); dificultades para cubrir/capturar regiones ricas en GC y regiones homólogas/pseudogenes; alta probabilidad de encontrar VUS; la detección de CNVs requiere análisis de datos adicionales (por ejemplo, mapeo de pérdida de heterocigosidad a través de regiones exónicas) (283,284).

b. *Validaciones funcionales de variantes genéticas raras:*

b.1 Estudios *in silico*: dentro de las ventajas de esta aproximación, están: Facilita la priorización y caracterización de variantes genéticas; da la posibilidad de suponer, *a priori*, los mecanismos moleculares mediante los cuales la variante media su impacto en el fenotipo; permite predecir parámetros como patogenicidad de variantes con base en *scores*, cambio en la estabilidad proteica de las variantes, entre otros; proporcionan a investigadores y clínicos un método rápido y escalable para evaluar los posibles impactos de nuevas variantes (322–324). En cuanto a las limitaciones de esta aproximación, tenemos: Ordinariamente es necesario usar más de un programa o servidor para comparar resultados y hacerlos más robustos; las predicciones *in silico* siempre deben ser complementadas con estudios funcionales para validar las variantes (322).

b.2 Ensayos de gen reportero luciferasa: esta técnica presenta las siguientes ventajas: Es muy práctica para evaluar variantes que afectan a las regiones reguladoras de los genes, ya que pueden estudiarse de forma más directa; permite obtener resultados de forma relativamente rápida (aproximadamente en una semana); no requiere el uso de demasiados reactivos y actualmente disponemos de kit comerciales que facilitan los protocolos (272). Dentro de las limitaciones están: Los resultados son difíciles de interpretar como valores absolutos y requieren de buenos controles positivos; son muy dependientes del tipo celular utilizado, lo cual requiere trabajos previos de estandarización de métodos de transfección y cantidad molar de cada uno de los vectores transfectados; hay alta variabilidad entre ensayos independientes, por lo cual, es necesario realizar una cantidad considerable de réplicas (272).

b.3 Cultivos celulares con medio condicionado: como ventajas de esta aproximación, tenemos: Producción rápida a partir de un mismo cultivo celular; fácil almacenamiento; mayor vida útil, ya que, al no tener células, puede criopreservarse por más tiempo para varios usos *a posteriori* (275).

En cuanto a las limitaciones de estos ensayos, están: El conocimiento de la composición del CM requiere el uso de herramientas como la espectrometría de masas; es necesario optimizar la producción para estandarizar la composición del CM; hay una alta variabilidad según el cultivo celular, el tipo y el número de pases; diferente composición del secretoma según las condiciones de cultivo y los métodos de procesamiento del CM (275).

2. Variantes genéticas estudiadas en el contexto de los trastornos esqueléticos

En el desarrollo de esta tesis hemos encontrado un conjunto de variantes genéticas raras en el contexto de trastornos esqueléticos monogénicos y poligénicos. Aunque la mayoría de ellas son VUS, es posible hipotetizar su probable o improbable contribución a los fenotipos óseos correspondientes teniendo en cuenta el gen en el que se han encontrado. Aquí enumeraremos y discutiremos brevemente cada una de esas variantes encontradas, señalando las consideraciones más importantes que ya han sido presentadas en cada una de las discusiones de los artículos de esta tesis y sugiriendo, para algunas de ellas, posibles aproximaciones experimentales. El número rs y la significancia clínica la hemos obtenido de las páginas dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) y Varsome (<https://varsome.com/>).

rs150260808: *TCIRG1*, chr11:68050180T>A, p.(Ile721Asn). Significancia clínica: VUS. Esta primera variante la hemos encontrado en la muestra con el menor Z-score (-4.26) del grupo LZ, dentro del estudio que hemos realizado mediante panel de genes por captura dirigida recogido en el artículo 1. Al ser clasificada como VUS no se puede establecer una correlación genotipo-fenotipo, sin embargo, variantes en este gen se han asociado con osteopetrosis autosómica recesiva y, de manera más rara, con osteopetrosis autosómica dominante debido a una resorción ósea ineficiente por parte de osteoclastos no funcionales (325,326).

TCIRG1 es un gen que codifica para una subunidad proteica del complejo vacuolar protón-ATPasa (V-ATPasa) que participa en la acidificación de la lacuna de resorción y en el tráfico lisosomal (327). Estudios realizados en *zebrafish* KO para *TCIRG1* mostraron un daño en la autofagia de microglía y una reducción en los procesos de acidificación, corroborando la participación de esta V-ATPasa en funciones de acidificación y en procesos como la fagocitosis y endocitosis en distintos tipos de células, incluidos los osteoclastos (328).

Dado que la variante que hemos encontrado en este gen está ubicada en la región que constituye el canal de bombeo de protones, nosotros hipotetizamos que esta variante podría causar una apertura permanente del canal acidificando la lacuna de resorción y generando un aumento de la resorción ósea, lo cual explicaría nuestro hallazgo en una muestra con baja DMO. Esto podría demostrarse, por ejemplo, mediante una aproximación *in vitro*, en la cual se utilicen células tipo monocitos como la línea celular THP-1, editadas genéticamente para generar la variante en cuestión y, una vez diferenciadas a osteoclastos, hacer pruebas funcionales tales como tinción TRAP, determinación colorimétrica de actividad TRAcP, determinación de pH mediante sondas fluorescentes que permiten hacer inmunomarcaje (329), ensayos de resorción determinando número de pit y de trench que generan las células editadas cultivadas sobre una superficie ósea (330), niveles de expresión de genes como *CA2* (*Carbonic anhydrase 2*) mediante qPCR y de la enzima anhidrasa carbónica que interviene en la acidificación de la lacuna de resorción (331). Estos mismos ensayos podrían realizarse mediante una aproximación *in vivo*, utilizando, por ejemplo, *zebrafish* editado genéticamente para generar la variante en cuestión.

rs72658176: *COL1A2*, chr7:94420604G>A, p.(Gly751Ser). Significancia clínica: patogénica. Esta variante fue uno de los principales hallazgos de nuestro estudio del panel de genes (artículo 1) y nos permitió sumar evidencias a las ya reportadas sobre la superposición genotípica y fenotípica que existe entre la OI leve y la OP. A esta variante ya nos hemos referido en el apartado anterior.

rs141180741: *SEC24D*, chr4:118752734C>T, p.(Leu526Phe). Significancia clínica: benigna, probablemente benigna. Esta variante la hemos encontrado en

heterocigosis en una muestra del grupo LZ ($Z\text{-score} = -2.73$) de la cohorte BARCOS y se ha asociado con OI. Algunas mutaciones autosómicas recesivas en el gen *SEC24D*, que codifica para un componente del complejo proteico de membrana COPII, involucrado en la formación de vesículas de transporte desde el retículo endoplásmico (ER), se han asociado con OI (332,333). De igual forma, otras mutaciones en este gen se han relacionado con el síndrome de Cole-Carpenter, un trastorno recesivo que afecta a la formación ósea y da lugar a malformaciones craneofaciales y huesos que se rompen con facilidad. Por otro lado, estudios de mutaciones *bulldog* en *zebrafish* en el gen *Sec24D* mostraron pérdida de función transportadora en condrocitos. Los condrocitos mutantes no lograron secretar colágeno tipo II ni matrilín (proteínas asociadas a proteoglicanos que componen la MEC) a la MEC, demostrando con ello que *Sec24D* es esencial para la secreción de proteínas de la MEC en el cartílago y que su deficiencia provoca que la morfogénesis craneofacial no pueda avanzar más allá de las etapas iniciales del desarrollo de los condroblastos (334). A pesar de estos hallazgos, en el contexto particular de la variante que hemos identificado, dado que tiene una significancia clínica de benigna, no sería una candidata a priorizar para un estudio funcional.

rs149082597: *LRP4*, chr11:46859041C>G, p.(Ser1887Cys). Significancia clínica: VUS/probablemente benigna. Esta variante fue encontrada en una muestra del grupo LZ con un $Z\text{-score}$ de -2.43. Se sabe que este gen media la inhibición de la formación ósea dependiente de *SOST* (13) y se ha demostrado que mutaciones *missense* en *LRP4* contribuyen a un fenotipo HBM, como lo hemos comentado antes (312–314). También se ha observado que ratones con deficiencia de *Lrp4*, presentaban una longitud total del fémur acortada, un perímetro cortical femoral reducido y una reducción de la DMO del fémur, evidenciando con ello que, dependiendo del dominio proteico en el que se localicen las mutaciones, los efectos sobre la DMO serán diferentes (313,335,336). Esta última consideración nos permite especular que quizá esta variante también contribuya al fenotipo LBM de la muestra.

Para probar si hay o no relación de esta variante con el fenotipo LBM, se podría hacer una aproximación mediante ensayos de gen reportero luciferasa, aprovechando la participación de este gen en la señalización de la vía de Wnt que ya ha sido ampliamente reportada (13). Así, mediante la co-transfección de vectores de expresión de los genes *LRP4* wt y mutado, *WNT*, *SOST*, *DKK1*, *LRP5/6* y los vectores que contienen el gen de la luciferasa y de la molécula normalizadora (Nanoluc), en líneas celulares como HELA o HEK, que son ampliamente usadas y presentan una buena eficiencia de transfección (337,338), se podría determinar si para el caso de *LRP4* mutado hay un comportamiento distinto de la actividad luciferasa comparado con el wt, y determinar si podría o no correlacionarse con el fenotipo LBM (339).

rs1233836740: *ANO5*, chr11:22274744G>C, p.(Cys804Ser). Significancia clínica: VUS. Esta variante, de nuevo, fue encontrada en una muestra del grupo LZ (*Z-score* = -2.39). Variantes GoF autosómicas dominantes en el gen *ANO5* (que codifica para un canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺, el cual participa en el remodelado óseo mediante la regulación funcional de osteoclastos), se han asociado a displasia gnato-diafisaria (GDD), un síndrome esquelético poco frecuente caracterizado por presentar esclerosis similar a la osteopetrosis en los huesos largos; lesiones óseas similares a la displasia fibrosa en el hueso maxilar y una DMO reducida, lo que hace que los huesos sean inusualmente frágiles. La mayoría de variantes LoF en *ANO5*, conducen a varias formas de distrofia muscular *limb-girdle* (LGMDL2L) con fenotipos patológicos no relacionados con el hueso (340,341). La mujer de esta muestra no tenía sintomatología clínica de GDD, aunque sí presentaba una osteoporosis severa con un *T-score* de columna lumbar de -3.5 sumada a un par de fracturas por fragilidad. La variante que hemos encontrado ya fue previamente descrita en un caso de heterocigocidad compuesta en pacientes con fenotipo de LGMDL2L y no de GDD (342), lo que significa que la variante que hemos identificado probablemente es LoF y quizá esté mal categorizada como VUS.

rs13768: *LMNA*, chr1:156138660G>A, p.(Arg624His). Significancia clínica: VUS. Esta variante fue encontrada en la única muestra HBM de nuestra selección (Z-

score = 3.70), clasificada dentro del grupo HZ. Mutaciones en este gen suelen estar asociadas con la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (para la que no se han descrito defectos en la DMO) o con síndromes de envejecimiento prematuro (que suelen provocar deformidades esqueléticas y/u osteoporosis mediante la activación de vías no canónicas de osteoclastogénesis) (343–346). Lo más probable es que otras variantes genéticas estén implicadas en el fenotipo HBM de nuestro paciente y que esta variante sea un hallazgo secundario.

rs2519471462: *PORCN*, chrX:48514566G>C, p.(Arg296Pro). Significancia clínica: VUS. Esta mutación *missense de novo* se detectó en un varón, en el 50 % de las lecturas, lo que indica mosaicismo. Los análisis también se hicieron en la madre del paciente estudiado, que no era portadora de la variante. El aminoácido implicado en el cambio está muy conservado en todas las especies. Dicha variante es clasificada como patogénica para la FDH en HGMD (Human gene mutation database).

Un posible estudio funcional, en este caso, puede hacerse mediante una aproximación *in vivo*, utilizando zebrafish como modelo. De esta forma, se podría analizar, por ejemplo, el papel de nuestra variante durante el desarrollo, testándola en embriones de zebrafish y, posteriormente, evaluar, mediante técnicas de inmunotinción y de tinción del esqueleto, el grado de compromiso de esta variante con alteraciones o no en el tejido óseo de los organismos adultos (347). Además, se podrían utilizar aproximaciones mediante análisis imágenes tridimensionales para determinar si hay cambios en la morfología, la microestructura y el contenido mineral del hueso de los organismos mutados versus los wt (348).

rs187085991: *TBX18*, chr6: 84738550C>T, p.(Arg349Gln). Significancia clínica: Probablemente benigna. Esta variante fue encontrada tras los experimentos y análisis de WES en los miembros afectados de un caso familiar de displasia ósea esclerosante, y fue priorizada para el ensayo funcional de gen reportero luciferasa. *TBX18* codifica el factor de transcripción T-Box 18 (TBX18), que pertenece a la familia de factores de transcripción T-box. Se sabe que desempeña un papel fundamental en la formación de órganos durante la embriogénesis. Desde un punto de vista clínico, se han identificado mutaciones en este gen, en malformaciones

dominantes del tracto urinario y defectos cardíacos congénitos. En modelos murinos, tanto la subexpresión como la sobreexpresión de *Tbx18* dieron lugar a anomalías graves en la osificación esquelética. Estudios posteriores en animales demostraron que, a través de mecanismos epigenéticos, *Tbx18* se expresa espacial y temporalmente en células de linaje condrocítico implicadas en la formación ósea endocondral antes y después del nacimiento. De forma interesante, las lesiones lucentes observadas en los individuos afectados por el caso familiar de displasia ósea esclerosante (artículo 3 de esta tesis) se encontraron cerca de las metáfisis y aparecieron antes de la fusión de la placa de crecimiento, lo que nos condujo a hipotetizar que la alteración de la actividad de *TBX18* pudo desempeñar un papel en el desarrollo de estos individuos. Con todo, en nuestro ensayo funcional de gen reportero luciferasa pudimos demostrar que no había diferencias estadísticamente significativas en la actividad transcripcional del factor mutado en comparación con el wt (304,349–351), lo que nos lleva a descartar la hipótesis de la probable relación causal de esta variante con el fenotipo óseo estudiado, y considerarla como una variante probablemente benigna.

rs377565599: *SEMA4D*, chr9: 89391404C>T, p.(Val212Met). Significancia clínica: VUS. Al igual que para el caso anterior, esta variante fue encontrada tras los experimentos y análisis de WES, y fue priorizada para el ensayo funcional con medio condicionado. *SEMA4D* codifica la semaforina 4D (SEMA4D), miembro de la familia de proteínas semaforinas altamente conservadas. SEMA4D tiene funciones establecidas en la biología del cáncer (promueve el crecimiento neoplásico) y en la regulación del sistema inmunitario, pero pruebas recientes apuntan a funciones adicionales, entre ellas la remodelación ósea. Tanto su forma ligada a la membrana como su forma soluble se unen a receptores específicos, siendo la Plexina-B1 su principal receptor en las células no inmunitarias. En el campo del hueso, estudios *in vitro* y en animales han demostrado que Sema4d, que es producida y secretada por los osteoclastos, se une a Plexina-B1, que es ampliamente expresado por los osteoblastos. El complejo Sema4d-Plexina-B1 provoca una alteración en la diferenciación osteoblástica y la formación ósea al suprimir la señalización dependiente de IGF1. Negishi-Koga y colaboradores (44) generaron un modelo de

ratón KO Sema4d que presentaba una masa ósea elevada, una mayor resistencia a las fracturas, una mayor tasa de formación ósea y una actividad osteoclástica normal, lo que indicaba que el fenotipo osteoesclerótico se derivaba de una mayor formación ósea osteoblástica. Hallazgos similares tuvieron con un modelo de ratón KO Plexina-B1. En observaciones adicionales, encontraron que en células craneales cultivadas en condiciones osteogénicas, Sema4d suprimía la formación de nódulos óseos y los marcadores de formación ósea, incluyendo la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y el colágeno tipo I (44). Otro estudio en el que los autores realizaron un metaanálisis de todo el genoma de 15 casos de osteoporosis y 14 controles, en transcriptomas de células madre mesenquimales, evidenció una regulación positiva de ERBB2 (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), un efector cascada abajo de la señalización SEMA4D/Plexina-B1 (352). En el ámbito clínico, se ha investigado la SEMA4D como biomarcador de la osteoporosis, pero las pruebas existentes sobre su utilidad son contradictorias. También se ha identificado una pérdida segmentaria del número de copias del SEMA4D en una parte considerable de los pacientes con displasia acetabular, pero no se han realizado análisis funcionales para explorar la posible causalidad. Esas evidencias, en conjunto, nos llevaron a pensar que una copia defectuosa de SEMA4D, podría conducir a un efecto dominante de formación ósea. Desafortunadamente, en nuestros ensayos funcionales con medio condicionado, no pudimos obtener resultados concluyentes para demostrar tal causalidad (44,353–356), quizá porque el efecto de la semaforina sobre los osteoblastos requiera también la participación de la región transmembrana de la proteína, no solamente la parte soluble, tal y como lo sugieren Negishi-Koga y colaboradores (44).

Frente a esta última consideración y teniendo en cuenta el papel que cumple este gen en el hueso, valdría la pena realizar otro tipo de aproximaciones *in vitro* que impliquen, por ejemplo, co-cultivo de células tipo osteoblasto y tipo osteoclasto (estas últimas editadas genéticamente para generar la variante de *SEMA4D* implicada) y evaluar luego, mediante pruebas funcionales como tinción con rojo de alizarina y expresión de algunos biomarcadores tales como *RUNX2*, *SP7*, *BGLAP*, *OPG* si definitivamente la variante en cuestión afecta o no la osteoblastogénesis.

rs142274954: *PTCH1*, chr9:95478096C>T, p.(Asp436Asn). Significancia clínica: VUS/probablemente benigna. Esta variante solo la analizamos mediante aproximaciones *in silico*. PATCHED1, la proteína codificada por *PTCH1*, es un receptor transmembrana que actúa como principal represor de la señalización de *hedgehog* (Hh). La vía de señalización Hh, que también desempeña un papel clave en el desarrollo embrionario, el desarrollo de órganos y la proliferación celular, es un regulador positivo bien conocido de la formación ósea dependiente de Wnt. Estudios en animales han demostrado que las mutaciones LoF de *Ptch1* están asociadas con una formación ósea acelerada y un aumento de la masa ósea. Esto es evidente en pacientes con síndrome de Gorlin, una enfermedad rara caracterizada por la predisposición al desarrollo neoplásico a una edad temprana, en particular carcinomas basocelulares, queratocistos odontogénicos de las mandíbulas y fosas palmares, entre otras anomalías, causada por mutaciones heterocigotas germinales tipo LoF de *PTCH1*. Ninguna de estas manifestaciones se observó en nuestros pacientes del caso familiar de displasia ósea esclerosante. Además, aunque la DMO no se ha caracterizado bien en pacientes con síndrome de Gorlin, un estudio indicó que era superior a la normal en los dos sujetos evaluados, aunque estos dos pacientes tenían una DMO mucho menor que la de los miembros afectados de nuestro caso familiar. Además, la variante p.(Asp436Asn) *PTCH1* identificada, también se ha descrito en otros dos estudios, uno asociado a casos familiares de enfermedad de Hirschsprung (357) y otro a anomalías del desarrollo ocular (358), aunque no se demostró la causalidad de esta variante con estos trastornos, como tampoco se informaron hallazgos esqueléticos (359–361).

Un posible ensayo para probar el efecto de esta mutación sería utilizando células tipo osteoblastos editadas para generar la variante implicada. En estas células se podría analizar la expresión de algunos genes diana de la vía de señalización Hh que están regulados al alza, tales como *FOXA2* (*Forkhead box A2*), *FOXC2* (*Forkhead box C2*), *FOXE1* (*Forkhead box E1*), *CCND1* (*Cyclin D1*) mediante qPCR y compararlos con los niveles de expresión de los mismos genes en células wt, para

determinar si la variante ha tenido algún efecto en la función represora de *PTCH1* sobre la señalización Hh, infiriendo con ello si se ha afectado o no la osteoblastogénesis, puesto que se ha demostrado que la inhibición de la señalización Hh en osteoblastos maduros aumenta la osteoblastogénesis y, por tanto, la masa ósea (362–365). Además de estos ensayos, también se podrían realizar tinciones con rojo de alizarina y de Von Kossa con los osteoblastos mutados para analizar si la variante afecta o no la generación de osteoblastos maduros, así como se podría determinar la expresión de biomarcadores claves de la osteoblastogénesis tales como *RUNX2*, *SP7*, *BGLAP*, *ALP* en los osteoblastos mutados y compararlos con los wt.

rs143056436: *ADGRE5* chr9:14406924A>G, p.(Glu724Gly). Significancia clínica: VUS. Esta variante solo la analizamos mediante aproximaciones *in silico*. La proteína codificada por este gen es CD97, que pertenece a la familia *EGF-seven-span transmembrane* (EGF-TM7) de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). La mayoría de los datos disponibles sugieren que desempeña un papel en la adhesión celular, el reclutamiento y la migración de leucocitos, así como en las respuestas inmunitarias, dada su alta expresión en los sitios inflamatorios. Sin embargo, Won y colaboradores también exploraron su posible papel en la biología ósea mediante la investigación de un modelo de ratón CD97 KO, y descubrieron que la CD97 desempeñaba un papel importante en la osteoclastogénesis mediada por RANKL (366). Además, también observaron un aumento de la masa ósea en los ratones CD97 KO en comparación con los wt, que era secundario a la disminución de la actividad osteoclástica. A pesar de esta posible implicación en la alteración de la actividad osteoclástica, es poco probable que una sola copia defectuosa de CD97 sea la única responsable de los valores elevados de DMO observados en los afectados por la displasia ósea esclerosante. Sin embargo, es posible que haya contribuido a ello en cierta medida (367). Para probar esta contribución, podrían hacerse ensayos con células tipo osteoclastos editados para generar la variante de interés, y realizar pruebas funcionales tales como tinción TRAP, actividad colorimétrica TRAcP, así como determinación de biomarcadores osteoclásticos como *TRAP*, *RANK* y *CTSK*. Además, se podrían hacer también

pruebas de resorción para determinar número de pit y de trench con los osteoclastos mutados y compararlos con los wt para analizar si la variante estudiada afecta o no la osteoclastogénesis y la activación osteoclástica.

rs79644111: *PTK7* chr6:43142276C >T, p.(Thr675Met). Significancia clínica: VUS. Esta variante solo la analizamos mediante aproximaciones *in silico*. *PTK7* codifica la proteína tirosina quinasa 7, un receptor transmembrana bien conservado entre distintas especies. No está claro las vías de señalización en las que participa *PTK7*, pero hay estudios que han mostrado que regula las vías de señalización Wnt. *PTK7* parece especialmente relevante en una vía de señalización Wnt no canónica implicada en la orientación celular y el cierre del tubo neural. Su participación en la señalización Wnt canónica es menos clara, aunque los estudios en animales indican que atenúa la expresión de β -catenina. Desde un punto de vista clínico, también se ha observado una desregulación posnatal de la actividad de *PTK7* en el cáncer y el desarrollo metastásico, aunque se desconoce su implicación mecánica (368). Las mutaciones en *PTK7* también se han relacionado con defectos del tubo neural en humanos y, de forma interesante, con la escoliosis idiopática (IS), que suele aparecer durante la adolescencia y afecta con mucha más frecuencia a las niñas que a los niños (369). Los datos de la literatura sugieren que la mutación que se ha encontrado en *PTK7* podría tener un papel en el desarrollo de la IS en uno de los afectados por la displasia ósea esclerosante, mientras que parece menos probable que influyera en el aumento de la DMO (370,371). Con todo, para probar si la variante encontrada en este gen está relacionada con el aumento en la DMO, podrían hacerse aproximaciones *in vivo* utilizando zebrafish como modelo, dado que en este organismo se podría analizar si la variante tiene alguna implicación en la formación del tubo neural analizando embriones mutados y, además, podrían usarse técnicas de imágenes 3D para analizar la microarquitectura y composición mineral del hueso de los organismos mutantes comparándolos con organismos wt, con el fin de establecer la relación o no de la variante con el fenotipo óseo observado.

Como hemos discutido, la mayoría de variantes presentadas en esta sección, requieren de validaciones funcionales mediante aproximaciones experimentales *in vitro* y/o *in vivo* (algunas de las cuales ya han sido sugeridas), para comprender completamente su contribución al trastorno esquelético correspondiente. Vale la pena decir aquí que los estudios funcionales son fundamentales para determinar el papel de una variante en un trastorno esquelético determinado, sin embargo, estos estudios requieren un diseño experimental riguroso y una ejecución temporal extensa y cuidadosa, que debe tener en cuenta problemáticas inherentes a las aproximaciones usadas, como por ejemplo, en nuestro caso, la estrecha ventana de tiempo con que se cuenta para la realización de ensayos con osteoclastos maduros, lo cual implica que experimentos con este tipo de células deban planearse muy bien y realizarse con especial cuidado, manteniendo condiciones óptimas de cultivo y diferenciación.

3. Otros modelos celulares y animales para entender la EG y su fenotipo óseo

En el conjunto de trastornos esqueléticos que analizamos en esta tesis, la EG1 hace parte de un conjunto de patologías que, sin ser clasificadas como trastornos esqueléticos, presentan un fenotipo óseo dentro del cuadro clínico que desarrollan. Como ya hemos presentado ampliamente en la introducción, las manifestaciones óseas en la EG1 van desde deformaciones en matraz de Erlenmeyer en huesos largos, hasta infartos óseos, osteoporosis y osteopenia.

Para estudiar el fenotipo óseo de la EG1, generamos un modelo celular osteoblástico y osteoclástico, usando la herramienta de edición genética de CRISPR/Cas9 en líneas celulares de rata y de ratón (artículo 4 de este trabajo). Nuestros resultados apuntaron a que posiblemente hay un desbalance en el remodelado óseo que favorece la diferenciación y activación de osteoclastos, lo que lleva a un incremento en la resorción ósea (Tabla 7). Con todo, los modelos generados presentaron varias limitaciones, dentro de las cuales están, por ejemplo, el uso de líneas celulares transformadas que pueden tener una composición

genética alterada y la aproximación de monocultivo que impide replicar, en las condiciones de laboratorio, las interacciones célula-célula que se presentan en las condiciones fisiológicas *in vivo*. Además, en nuestros modelos no logramos observar acúmulo lisosomal con la aproximación que tuvimos mediante el uso de sondas como el Lysotracker green. Estos resultados deben ser complementados con ensayos adicionales de inmunomarcaje y western blot para analizar expresión de proteínas lisosomales tales como LAMP1, y con análisis de otros procesos celulares relacionados con el lisosoma, tales como la autofagia, evaluando la expresión de marcadores como LC3, para determinar si efectivamente en estas células editadas no hay acúmulo lisosomal o si, por el contrario, el proceso de generación de endosomas maduros y de lisosomas podría estar alterado debido a la patología misma, tal y como lo sugieren Panicker y colaboradores (372), quienes caracterizaron osteoblastos derivados de iPSC de pacientes Gaucher y observaron que los osteoblastos Gaucher tenían expresión disminuida de marcadores lisosomales como LAMP1, deterioro de la exocitosis lisosomal y, además, una alteración en la deposición de matriz ósea.

Por lo comentado hasta aquí, en esta sección presentaremos brevemente otros modelos que se han desarrollado para dilucidar los mecanismos patofisiológicos que subyacen a la EG1.

Los modelos que se han generado para estudiar las implicaciones esqueléticas en la EG1, pueden clasificarse según la aproximación utilizada, en dos grupos: *in vitro* e *in vivo*. Dentro de los modelos *in vitro*, están la utilización de líneas celulares inmortalizadas humanas o de ratón (como los modelos que presentamos en esta tesis) o la generación de células iPSC a partir de fibroblastos de pacientes.

Tabla 7. Hipótesis planteadas para el desarrollo de esta tesis y resultados correspondientes obtenidos

Hipótesis planteadas en esta tesis	Principales hallazgos	Consideraciones adicionales	Artículo
El fenotipo óseo de la enfermedad de Gaucher tipo 1 (EG1) puede estar causado por un desbalance en el remodelado óseo, favoreciendo la activación de osteoclastos y, por tanto, la resorción ósea.	En el contexto de nuestros modelos celulares, nuestros hallazgos apuntan a un defecto osteoclástico intrínseco en la EG1. Esto podría sugerir que los osteoclastos serían los principales impulsores de la patología ósea, junto con la alteración de la comunicación entre osteoblastos y osteoclastos.	Nuestro modelo osteoblástico no presentó acúmulo lisosomal respecto de las células wt. Además, en los ensayos de mineralización, observamos un incremento en la misma en los modelos KO comparados con las células wt, lo cual es contradictorio con otros estudios reportados. Nuestro modelo osteoclástico no presentó diferencias significativas en el acúmulo lisosomal entre las células KO y las wt, sin embargo, las primeras mostraron una tendencia hacia el incremento del mismo.	Artículo 4

Dentro de los modelos *in vivo* están los modelos murinos generados.

Los modelos de aproximaciones *in vitro* descritos hasta el momento, han utilizado herramientas como (a) la inhibición química de la enzima glucocerebrosidasa, (b) la edición genética con CRISPR/Cas9 para noquear el gen *GBA1* o (c) la generación de iPSCs a partir de células de pacientes.

- a. *Modelos celulares inducibles químicamente con CBE* (condritol β -epóxido): la manera más simple de generar modelos celulares de la EG1 es mediante el tratamiento de las células con CBE, el cual inhibe la función de la enzima *GBA1*. Hay autores que han utilizado este inhibidor para tratar macrófagos con el fin de imitar las células Gaucher (373–375), o precursores de células óseas para estudiar la patofisiología ósea en la EG1 (376–379).
- b. *Edición genética con CRISPR/Cas9*: Pavan y colaboradores en el año 2020 (380) generaron modelos celulares fiables, isogénicos y fáciles de manejar de la EG a partir de células comercialmente accesibles, para su uso en estudios de fisiopatología de la EG y cribados de fármacos de alto rendimiento. Aprovecharon la tecnología CRISPR/Cas9 para noquear el gen *GBA1* en la línea celular monocítica humana THP-1 y en la línea celular de glioblastoma U87. Ambas líneas celulares editadas presentaron bajos niveles de expresión de la β -glucocerebrosidasa, menos del 1 % de actividad enzimática residual y una acumulación masiva de sustrato. En la caracterización del modelo KO generado en células THP-1, observaron un aumento en la liberación de citocinas proinflamatorias (interleucina-1 β y factor de necrosis tumoral- α) y la activación de la osteoclastogénesis. Resultados adicionales mostraron que los monocitos editados tenían un mayor potencial osteoclastogénico, sugiriendo que existe una exacerbación de la osteoclastogénesis y, por tanto, de la resorción ósea, lo que podría explicar el fenotipo óseo en la EG1 (381). Otro modelo celular editado con CRISPR/Cas9 para noquear el gen *GBA1* fue generado por Drews y colaboradores en el año 2019 (382). usando células HEK293T y células humanas de adenocarcinoma alveolar basal epitelia A549, con el fin de

estudiar el papel de la glucocerebrosidasa en la entrada a la célula e infección de la misma por parte del virus de la influenza.

- c. *iPSCs*: las *iPSCs* fueron generadas por primera vez por el grupo de Yamanaka (383) a partir de células humanas de adulto. Las *iPSCs*, igual que las células madre embrionarias humanas (hESCs), pueden diferenciarse a cualquier tipo celular para poder ser estudiadas. La ventaja de las *iPSCs* respecto de estas últimas es que minimizan considerablemente los aspectos éticos vinculados al uso de las hESCs y, por tanto, se han vuelto una herramienta muy útil como modelos para el estudio de muchas patologías. Para el caso de la EG, más de 15 estudios han utilizado esta aproximación. Por ejemplo, Messelodi y colaboradores en el año 2021 (384) generaron *iPSCs* de un donante sano y de un paciente con EG, para investigar los mecanismos biológicos que subyacen a la activación de los macrófagos en esta patología. Si bien las *iPSCs* de EG son capaces de dar lugar de manera eficiente a progenitores mieloides CD33+/CD45+, la maduración hacia el destino de monocitos/macrófagos CD14+/CD163+ resultó mejorada en las líneas de EG, que además mostraron un potencial de crecimiento disminuido en comparación con las células de control, tanto en cultivo semisólido como en líquido. El deterioro del crecimiento de las líneas con EG se asoció con una regulación incrementada de RIPK3 (*receptor interacting serine/threonine kinase 3*) y MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), dos efectores claves de la necroptosis, la vía de muerte celular relacionada con la inflamación. En otro estudio (372), los investigadores examinaron la capacidad de *iPSCs* humanas derivadas de pacientes con EG de tipos 1, 2 y 3 para diferenciarse en osteoblastos y llevar a cabo la formación ósea. La diferenciación a osteoblastos de las *iPSCs* con EG reveló que estas células presentaban defectos de desarrollo y anomalías lisosomales que interferían en el depósito de la matriz ósea. En comparación con los controles, los osteoblastos derivados de *iPSCs* con EG mostraron una expresión reducida de los marcadores de diferenciación osteoblástica, y el depósito de proteínas y minerales de la matriz ósea era defectuoso. Al mismo tiempo, la

señalización canónica Wnt/ β catenina en los osteoblastos mutantes estaba regulada a la baja. Los osteoblastos con EG también presentaban defectos en su capacidad para llevar a cabo la exocitosis dependiente del Ca^{2+} , una función lisosomal necesaria para el depósito de la matriz ósea.

Los modelos de aproximaciones *in vivo* comprenden básicamente los modelos murinos generados, los cuales han utilizado estrategias como (a) inducción química o (b) modificaciones genéticas.

- a. *Modelos inducibles químicamente*: el primer intento de generar un modelo murino para el estudio de la EG1 fue mediante el uso del inhibidor CBE (385). En este estudio, se administraron diariamente inyecciones intraperitoneales de CBE durante tres semanas y se consiguieron ratones con más de un 90% de inhibición de la actividad Gba1 y con acumulación de glucocerebósidos en bazo, hígado y cerebro. Además, los efectos fueron revertidos cuando se interrumpía el tratamiento (386).
- b. *Modelos con modificaciones genéticas*: dentro de este grupo, encontramos (b.1) modelos que noquean el gen *Gba1*, (b.2) modelos que se basan en la generación de mutaciones puntuales o (b.3) modelos condicionales.
 - b.1 *Modelos que noquean el gen Gba1*: El primer modelo de la EG *Gba1*^{-/-} se generó en el año 1992 (387). Se obtuvieron ratones que presentaban menos del 4% de actividad Gba1, respecto de los ratones wt. Tenían un fenotipo similar a la EG tipo 2 humana (388) y presentaban letalidad neonatal, debido a un defecto en la permeabilidad de la piel, que más tarde también se observó en pacientes con EG tipo 2 humana (389). Estos ratones se utilizaron para analizar algunos aspectos del compromiso neuronal de la EG (390).
 - b.2 *Modelos que se basan en la generación de mutaciones puntuales*: la generación de modelos murinos con algunas de las mutaciones conocidas del gen *Gba1* (391–393) permitieron estudiar más a fondo la EG, ya que la afectación que presentaban estos ratones mayoritariamente era menor y no había tanta letalidad, con excepción de los ratones con la mutación puntual

N370S, los cuales morían a las 24 horas después del nacimiento, también por problemas cutáneos (393).

b.3 Modelos condicionales: los modelos condicionales representaron un gran avance en la generación de modelos murinos con la EG, ya que recapitulaban los síntomas clínicos de la enfermedad de una forma mucho más rigurosa que los modelos anteriores. Se generaron mediante el sistema Cre-loxP y de esta manera se pudieron mantener los niveles de actividad Gba1 normales durante el desarrollo, con el fin de evitar desórdenes en la formación de la barrera de la piel. Se generaron modelos EG1 que permitieron evidenciar el compromiso óseo de esta patología (210,394,395) y también modelos neuronopáticos (396,397).

Como se ha dicho, todos los modelos generados han servido para entender mejor algunos de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la EG y, de acuerdo con nuestro interés particular, para dilucidar el compromiso molecular y celular de la EG1. Nuestro modelo generado con CRISPR/Cas9 nos ha ayudado a comprender los mecanismos celulares intrínsecos que podrían estar implicados en el fenotipo óseo de esta patología. Con todo, aproximaciones que permitan pasar del monocultivo a co-cultivos de células tipo osteoblasto y osteoclasto pueden ayudar a complementar los hallazgos que hemos tenido con nuestros modelos.

4. Valoración global de los estudios realizados en esta tesis y perspectivas futuras

Las displasias esqueléticas (DiE), son un grupo heterogéneo de enfermedades con una incidencia poco frecuente y diversas manifestaciones clínicas, que están asociadas a múltiples genes. El diagnóstico preciso de las DiE es difícil desde el punto de vista clínico y genético. El diagnóstico clínico de las DiE puede resultar difícil debido a su incidencia relativamente baja, como es el caso de la OI, por ejemplo (398). Además, los síntomas clínicos variables y no específicos de las DiE, especialmente los hallazgos radiológicos que requieren la interpretación de

expertos, constituyen otro factor que dificulta el diagnóstico clínico. Por otro lado, el diagnóstico y la caracterización molecular también son complejos porque las variantes de un gen pueden causar diferentes fenotipos, mientras que manifestaciones clínicas similares pueden ser el resultado de variantes de diferentes genes (399).

Con todo, los avances de los últimos años en técnicas de secuenciación y procesamiento de datos han cambiado este panorama. Así, el uso cada vez más extendido de la NGS, tanto en el ámbito de la investigación como en el clínico, ha permitido desentrañar rápidamente la base genética de la gran mayoría de estos trastornos. En 2019 se había establecido la base genética de 425 de las 461 displasias esqueléticas distintas; en 2006, las cifras eran de 215 de 372 trastornos (54). Esto ha dado lugar a un uso más sistemático de las pruebas genéticas en la investigación básica y el diagnóstico clínico, que se realiza normalmente mediante la aplicación de un panel de genes o mediante WES, y que tiene lugar en una fase temprana del proceso de evaluación de los pacientes; complementando además el fenotipado radiológico que ya se hace de rutina en muchos centros de salud (400). Parte de la naturaleza de los resultados de las pruebas genéticas es un grado de incertidumbre, puesto que los enfoques de pruebas de amplio alcance generan variantes de significado incierto (VUS) en múltiples genes, ninguno de los cuales es claramente patógeno basándose únicamente en la información genética.

Por otro lado, los estudios GWAS nos han dado luces sobre las bases genéticas que pueden estar regulando la fisiología ósea en contextos patológicos como el de las DE. Sin embargo, la información sobre variantes genéticas que obtenemos mediante técnicas NGS o mediante GWAS, debe ser llevada al laboratorio de investigación y comprobada experimentalmente para validar si las variantes se relacionan o no con el fenotipo asociado.

Estas validaciones funcionales, como hemos dicho, requieren un esfuerzo grande en tiempo y en la planeación, diseño y ejecución de los experimentos, lo cual supone un reto para los investigadores y, por extensión, para los clínicos y los pacientes que sufren las patologías que se estudian. Estos retos, antes que ser un obstáculo,

motivan a la realización de investigaciones y trabajos en colaboración para continuar ampliando nuestra comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a trastornos como las DiE.

Esta motivación es la que nos ha impulsado también en el desarrollo de esta tesis doctoral, en la que hemos trabajado conjuntamente con investigadores del Hospital del Mar en la identificación de variantes en genes como *COL1A2*, *TCIRG1*, *SEC24D*, *ANO5*, *LRP4*, *LMNA*, *PORCN*, *SEMA4D*, *TBX18*, *PTK7*, *ADGRE5*, *PTCH1* y en la que también hemos podido aproximarnos al estudio de los mecanismos celulares que causan el fenotipo óseo en la EG1, mediante el uso de técnicas como WES, panel de genes por captura dirigida, aproximaciones *in silico* e *in vitro*.

Los estudios aquí realizados nos han permitido ampliar el conocimiento sobre las causas genéticas que regulan algunas DiE y sobre los procesos celulares que determinan el fenotipo óseo en la EG1, aunque algunos hallazgos que hemos tenido no han sido concluyentes y requieren de análisis posteriores que involucren, por ejemplo, aproximaciones ómicas como la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica de tal manera que se puedan tener visiones de conjunto sobre los procesos biológicos que están presentes en las condiciones patológicas estudiadas. De igual forma, el uso de modelos animales tales como zebrafish y de modelos *in vitro* como co-cultivos celulares o generación y cultivo de organoides puede ayudar a superar algunos obstáculos que encontramos en la realización de los ensayos desarrollados en esta tesis con el fin de obtener, así, resultados concluyentes que permitan completar los hallazgos que hemos tenido en este trabajo.

CONCLUSIONES

Conclusiones de los estudios recogidos en el capítulo 1:

- Identificamos variantes genéticas raras en genes previamente descritos como implicados en fenotipos óseos monogénicos, en mujeres posmenopáusicas de la cohorte BARCOS, divididas en dos grupos según valores extremos de DMO y LS-Z-score.
- La variante rs72658176: *COL1A2*, p.(Gly751Ser) identificada en una mujer del grupo LZ, pone de relieve el solapamiento entre enfermedades monogénicas como la OI y enfermedades complejas como la OP, que pueden compartir su etiología genética.
- No observamos un enriquecimiento de variantes raras de OI en el grupo con baja DMO y, salvo la variante patogénica en *COL1A2*, las variantes no pudieron asociarse claramente con el fenotipo de densidad ósea de estas mujeres, lo que sugiere que las variantes raras contribuyen en escasa medida a la OP posmenopáusica.
- Identificamos la variante rs2519471462: *PORCN*, p.(Arg296Pro) en un paciente español caucásico de 29 años, con una displasia esquelética no diagnosticada asociada con baja masa ósea y varias fracturas por fragilidad a lo largo de su infancia y adolescencia.
- A partir de los resultados WES y de la revisión de literatura concluimos que la FDH, generada principalmente por variantes genéticas en el gen *PORCN*, es probablemente una causa monogénica poco reconocida de LBM debida a una señalización defectuosa de la vía de Wnt.

Conclusiones de los estudios recogidos en el capítulo 2:

- De acuerdo con nuestro análisis *in silico*, ninguna de las variantes encontradas en un caso familiar de displasia ósea esclerosante (rs187085991: *TBX18*, p.(Arg349Gln); rs377565599: *SEMA4D*, p.(Val212Met); rs142274954: *PTCH1*, p.(Asp436Asn); rs143056436: *ADGRE5*, p.(Glu724Gly); rs79644111: *PTK7*, p.(Thr675Met)) genera una alteración en la estructura conformacional o la estabilidad de las proteínas implicadas.

- En nuestro sistema, la variante rs187085991: *TBX18*, p.(Arg349Gln) no afecta a la actividad de este factor de transcripción.
- Nuestros ensayos de diferenciación osteoblástica para validar funcionalmente la variante rs377565599: *SEMA4D*, p.(Val212Met) no nos permitieron obtener resultados concluyentes, por lo que se requieren más experimentos para dilucidar su contribución al fenotipo óseo implicado.

Conclusiones de los estudios recogidos en el capítulo 3:

- En el contexto de nuestros modelos celulares, los osteoblastos *Gba1*-KO presentaron expresión disminuida de *Opg* y un incremento en la deposición de calcio.
- Nuestros hallazgos apuntan a un defecto osteoclástico intrínseco en la EG evidenciado por el aumento de la expresión de *Trap* y *Ctsk*, así como de la actividad TRAcP en los osteoclastos *Gba1*-KO. Esto podría sugerir que los osteoclastos serían los principales responsables de la patología ósea, junto con una alteración en la comunicación entre osteoblastos y osteoclastos, lo que refuerza las múltiples evidencias obtenidas en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* por otros autores.

REFERENCIAS

1. Jadvar H, Gamie S, Ramanna L, Conti PS. Musculoskeletal system. *Semin Nucl Med.* 2004 Oct;34(4):254–61.
2. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2008 Nov;3(Supplement_3):S131–9.
3. Lieben L, Callewaert F, Bouillon R. Bone and Metabolism: A Complex Crosstalk. *Horm Res Paediatr.* 2009;71(Suppl. 1):134–8.
4. Tlili B, Guizani H, Aouadi K, Nasser M. Multi-Scale Modeling of Mechanobiological Behavior of Bone. In: *Biomechanics and Functional Tissue Engineering.* IntechOpen; 2021.
5. Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo KY. Age-Related Changes in Trabecular and Cortical Bone Microstructure. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:1–9.
6. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2631–9.
7. Compston J, Skingle L, Dempster DW. Bone Histomorphometry. In: *Vitamin D.* Elsevier; 2018. p. 959–73.
8. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–17.
9. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):577–87.
10. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P, et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell.* 2021 Mar;184(5):1330-1347.e13.
11. Vrahnas C, Sims NA. Basic Aspects of Osteoblast Function. In 2020. p. 1–16.
12. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Nov;561:3–12.
13. Martínez-Gil N, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. Wnt Pathway Extracellular Components and Their Essential Roles in Bone Homeostasis. *Genes (Basel).* 2022 Jan 13;13(1):138.
14. BONJOUR JP, THEINTZ G, BUCHS B, SLOSMAN D, RIZZOLI R. Critical Years and Stages of Puberty for Spinal and Femoral Bone Mass Accumulation during Adolescence*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Sep;73(3):555–63.
15. Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, van Rees M, Montecino M, Stein GS, et al. CCAAT/Enhancer-binding Proteins (C/EBP) β and δ Activate Osteocalcin Gene Transcription and Synergize with Runx2 at the C/EBP Element to

- Regulate Bone-specific Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Jan;277(2):1316–23.
16. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 Is a Substrate of RSK2 and an Essential Regulator of Osteoblast Biology. *Cell*. 2004 Apr;117(3):387–98.
17. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*. 2002 Jan;108(1):17–29.
18. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):1025–36.
19. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol*. 1998;76(6):899–910.
20. WHYTE MP. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization*. *Endocr Rev*. 1994 Aug;15(4):439–61.
21. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen WR, Qi J, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 21;21(14):5169.
22. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003 Aug;4(8):638–49.
23. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack D V., Partridge NC. Parathyroid Hormone Stimulates Osteoblastic Expression of MCP-1 to Recruit and Increase the Fusion of Pre/Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Nov;282(45):33098–106.
24. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 Chemokines Promote the Chemotactic Recruitment, RANKL Development, and Motility of Osteoclasts and Are Induced by Inflammatory Cytokines in Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004 Dec 1;19(12):2065–77.
25. Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras J. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J Cell Sci*. 2018 Jun 1;131(11).
26. Tinkler SM, Linder JE, Williams DM, Johnson NW. Formation of osteoclasts from blood monocytes during 1 alpha-OH Vit D-stimulated bone resorption in mice. *J Anat*. 1981 Oct;133(Pt 3):389–96.
27. Alesi N, Charles JF, Nakamura MC. Basic Aspects of Osteoclast Differentiation and Function. In 2020. p. 17–41.

28. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May;473(2):139–46.
29. Kim K, Lee SH, Ha Kim J, Choi Y, Kim N. NFATc1 Induces Osteoclast Fusion Via Up-Regulation of Atp6v0d2 and the Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP). *Molecular Endocrinology*. 2008 Jan 1;22(1):176–85.
30. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008;8(3):204–16.
31. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–17.
32. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E, Anderson K, Hanein D, Geiger B, et al. The Architecture of the Adhesive Apparatus of Cultured Osteoclasts: From Podosome Formation to Sealing Zone Assembly. *PLoS One*. 2007 Jan 31;2(1):e179.
33. Lakkakorpi PT, Horton MA, Helfrich MH, Karhukorpi EK, Väänänen HK. Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J Cell Biol*. 1991 Nov 15;115(4):1179–86.
34. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May;423(6937):337–42.
35. Jin SW, Sim KB, Kim SD. Development and Growth of the Normal Cranial Vault : An Embryologic Review. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016;59(3):192.
36. Runyan CM, Gabrick KS. Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2017 Jul;28(5):1380–9.
37. To K, Fei L, Pett JP, Roberts K, Blain R, Polański K, et al. A multi-omic atlas of human embryonic skeletal development. *Nature*. 2024 Nov 21;635(8039):657–67.
38. Wagner EF, Karsenty G. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Oct;11(5):527–32.
39. Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental Dynamics*. 2013 Aug 27;242(8):909–22.
40. Jin SW, Sim KB, Kim SD. Development and Growth of the Normal Cranial Vault : An Embryologic Review. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016;59(3):192.
41. Breeland G, Sinkler MA, Menezes RG. Embryology, Bone Ossification. 2025.

42. Bonjour JP, Kohrt W, Levasseur R, Warren M, Whiting S, Kraenzlin M. Biochemical markers for assessment of calcium economy and bone metabolism: application in clinical trials from pharmaceutical agents to nutritional products. *Nutr Res Rev.* 2014 Dec 14;27(2):252–67.
43. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *Am J Pathol.* 2009 Jan;174(1):239–47.
44. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med.* 2011 Nov 23;17(11):1473–80.
45. Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature.* 2012 May 18;485(7396):69–74.
46. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells.* 2020 Sep 10;9(9):2073.
47. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006 Aug;4(2):111–21.
48. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May;473(2):201–9.
49. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Feb;283(9):5866–75.
50. Yu K, Sellman DP, Bahraini A, Hagan ML, Elsherbini A, Vanpelt KT, et al. Mechanical loading disrupts osteocyte plasma membranes which initiates mechanosensation events in bone. *Journal of Orthopaedic Research.* 2018 Feb 11;36(2):653–62.
51. Murshid SA. Bone permeability and mechanotransduction: Some current insights into the function of the lacunar-canalicular network. *Tissue Cell.* 2022 Apr;75:101730.
52. Maycas M, Esbrit P, Gortázar AR. Molecular mechanisms in bone mechanotransduction. *Histol Histopathol.* 2017 Aug;32(8):751–60.
53. Chen C, Jiang Y, Xu C, Liu X, Hu L, Xiang Y, et al. Skeleton Genetics: a comprehensive database for genes and mutations related to genetic skeletal disorders. *Database (Oxford).* 2016;2016.
54. Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A.* 2019 Dec 21;179(12):2393–419.

55. Mazess R, Chesnut CH, McClung M, Genant H. Enhanced precision with dual-energy x-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int.* 1992 Jul;51(1):14–7.
56. Brown MA, Duncan EL. Genetic studies of osteoporosis. *Expert Rev Mol Med.* 1999 Oct 19;1(14):1–18.
57. Leslie WD, Tsang JF, Caetano PA, Lix LM. Effectiveness of Bone Density Measurement for Predicting Osteoporotic Fractures in Clinical Practice. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan 1;92(1):77–81.
58. Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, et al. BMD at Multiple Sites and Risk of Fracture of Multiple Types: Long-Term Results From the Study of Osteoporotic Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2003 Nov 1;18(11):1947–54.
59. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, et al. Predictive Value of BMD for Hip and Other Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2005 Jul 1;20(7):1185–94.
60. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996 May 18;312(7041):1254–9.
61. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1–129.
62. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International.* 2019 Jan 18;30(1):3–44.
63. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. *Osteoporosis International.* 1997 Jul;7(4):390–406.
64. Rizzoli R, Bonjour JP. Determinants of Peak Bone Mass Acquisition. In 2020. p. 115–37.
65. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, Slosman D, Clavien H, Sizonenko PC, et al. Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Oct;75(4):1060–5.
66. Miller PD. Bone mass measurements. *Clin Geriatr Med.* 2003 May;19(2):281–97.
67. Farr JN, Khosla S. Skeletal changes through the lifespan—from growth to senescence. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Sep 2;11(9):513–21.

68. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 2014 Mar 7;51(2):189–202.
69. Mayhew AJ, Meyre D. Assessing the Heritability of Complex Traits in Humans: Methodological Challenges and Opportunities. *Curr Genomics*. 2017 Jul 26;18(4).
70. Xu S. Genetic Variances of Quantitative Traits. In: *Quantitative Genetics*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 77–83.
71. Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era — concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet*. 2008 Apr 4;9(4):255–66.
72. Tenesa A, Haley CS. The heritability of human disease: estimation, uses and abuses. *Nat Rev Genet*. 2013 Feb 18;14(2):139–49.
73. Rijdsdijk F V. Analytic approaches to twin data using structural equation models. *Brief Bioinform*. 2002 Jan 1;3(2):119–33.
74. Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GHT, Wong AHC, et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet*. 2009 Feb 18;41(2):240–5.
75. Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L. Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2002 Nov;3(11):872–82.
76. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC. Genetic Factors in Determining Bone Mass. *Journal of Clinical Investigation*. 1973 Nov 1;52(11):2800–8.
77. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, Johnston CC. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet*. 1989 Mar;44(3):429–33.
78. Makovey J, Nguyen T V, Naganathan V, Wark JD, Sambrook PN. Genetic Effects on Bone Loss in Peri- and Postmenopausal Women: A Longitudinal Twin Study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007 Nov 1;22(11):1773–80.
79. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of Osteoporosis. *Endocr Rev*. 2010 Oct 1;31(5):629–62.
80. Tse KY, Macias BR, Meyer RS, Hargens AR. Heritability of bone density: Regional and gender differences in monozygotic twins. *Journal of Orthopaedic Research*. 2009 Feb 6;27(2):150–4.
81. Krall EA, Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1993 Jan 1;8(1):1–9.

82. Sun X, Lei SF, Deng FY, Wu S, Papacian C, Hamilton J, et al. Genetic and Environmental Correlations between Bone Geometric Parameters and Body Compositions. *Calcif Tissue Int.* 2006 Jul 28;79(1):43–9.
83. Bonnet N, Biver E, Durosier C, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S. Additive Genetic Effects on Circulating Periostin Contribute to the Heritability of Bone Microstructure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jul;100(7):E1014–21.
84. Hunter D, De Lange M, Snieder H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker R V., et al. Genetic Contribution to Bone Metabolism, Calcium Excretion, and Vitamin D and Parathyroid Hormone Regulation. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2001 Feb 1;16(2):371–8.
85. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *The Lancet.* 2011 Apr;377(9773):1276–87.
86. Sternberg SA, Levin R, Dkaidek S, Edelman S, Resnick T, Menczel J. Frailty and osteoporosis in older women—a prospective study. *Osteoporosis International.* 2014 Feb 4;25(2):763–8.
87. Yu EW. Osteoporosis Screening and Diagnosis. In 2020. p. 139–49.
88. Riancho J, Peris P, González-Macías J, Pérez-Castrillón J. Guías de práctica clínica en la osteoporosis postmenopáusica, glucocorticoidea y del varón (actualización 2022). *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral.* 2022 Mar;14(1):13–33.
89. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International.* 2006 Oct 19;17(12):1726–33.
90. Pisani P, Renna MD, Conversano F, Casciaro E, Di Paola M, Quarta E, et al. Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. *World J Orthop.* 2016;7(3):171.
91. Roux C, Wyman A, Hooven FH, Gehlbach SH, Adachi JD, Chapurlat RD, et al. Burden of non-hip, non-vertebral fractures on quality of life in postmenopausal women. *Osteoporosis International.* 2012 Dec 8;23(12):2863–71.
92. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen T V, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA.* 2009 Feb 4;301(5):513–21.
93. Dagan N, Cohen-Stavi C, Leventer-Roberts M, Balicer RD. External validation and comparison of three prediction tools for risk of osteoporotic fractures using data from population based electronic health records: retrospective cohort study. *BMJ.* 2017 Jan 19;i6755.

94. Hippisley-Cox J, Coupland C. Derivation and validation of updated QFracture algorithm to predict risk of osteoporotic fracture in primary care in the United Kingdom: prospective open cohort study. *BMJ*. 2012 May 22;344(may22 1):e3427–e3427.
95. Nguyen ND, Frost SA, Center JR, Eisman JA, Nguyen T V. Development of prognostic nomograms for individualizing 5-year and 10-year fracture risks. *Osteoporosis International*. 2008 Oct 7;19(10):1431–44.
96. Awasthi H, Mani D, Singh D, Gupta A. The underlying pathophysiology and therapeutic approaches for osteoporosis. *Med Res Rev*. 2018 Sep 7;38(6):2024–57.
97. Hermoso de Mendoza MT. [Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis]. *An Sist Sanit Navar*. 2003;26 Suppl 3:29–52.
98. Fu L, Zhang P, Wang Y, Liu X. Microbiota-bone axis in ageing-related bone diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 Jul 15;15.
99. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, et al. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Sep 29;2(1):16069.
100. Cauley JA, Chalhoub D, Kassem AM, Fuleihan GEH. Geographic and ethnic disparities in osteoporotic fractures. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Jun 22;10(6):338–51.
101. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*. 2006 Oct 19;17(12):1726–33.
102. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos*. 2021 Dec 2;16(1):82.
103. Wu AM, Bisignano C, James SL, Abady GG, Abedi A, Abu-Gharbieh E, et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Healthy Longev*. 2021 Sep;2(9):e580–92.
104. Lippuner K, Johansson H, Kanis JA, Rizzoli R. Remaining lifetime and absolute 10-year probabilities of osteoporotic fracture in Swiss men and women. *Osteoporosis International*. 2009 Jul 31;20(7):1131–40.
105. Michaëlsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlbom A, Pedersen NL. Genetic Liability to Fractures in the Elderly. *Arch Intern Med*. 2005 Sep 12;165(16):1825.
106. Recker RR, Deng HW. Role of Genetics in Osteoporosis. *Endocrine*. 2002;17(1):55–66.

107. Naranjo Hernández A, Díaz del Campo Fontecha P, Aguado Acín MP, Arboleya Rodríguez L, Casado Burgos E, Castañeda S, et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Reumatología sobre osteoporosis. *Reumatol Clin*. 2019 Jul;15(4):188–210.
108. Management of Postmenopausal Osteoporosis. *Obstetrics & Gynecology*. 2022 Apr;139(4):698–717.
109. Amin U, McPartland A, O'Sullivan M, Silke C. An overview of the management of osteoporosis in the aging female population. *Womens Health (Lond)*. 2023;19:17455057231176656.
110. Cortet B, Guañabens N, Brandi ML, Siggelkow H. Similarities and differences between European guidelines for the management of postmenopausal osteoporosis. *Arch Osteoporos*. 2024 Sep 5;19(1):84.
111. Awasthi H, Mani D, Singh D, Gupta A. The underlying pathophysiology and therapeutic approaches for osteoporosis. *Med Res Rev*. 2018 Sep 7;38(6):2024–57.
112. Bustamante M, Nogués X, Mellibovsky L, Agueda L, Jurado S, Cáceres E, et al. 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.
113. Bustamante M, Nogués X, Águeda L, Jurado S, Wesselius A, Cáceres E, et al. Promoter 2 -1025 T/C Polymorphism in the RUNX2 Gene Is Associated with Femoral Neck BMD in Spanish Postmenopausal Women. *Calcif Tissue Int*. 2007 Sep 28;81(4):327–32.
114. Garcia-Giralt N, Nogués X, Enjuanes A, Puig J, Mellibovsky L, Bay-Jensen A, et al. Two New Single-Nucleotide Polymorphisms in the *COL1A1* Upstream Regulatory Region and Their Relationship to Bone Mineral Density. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002 Mar 1;17(3):384–93.
115. Ioannidis JPA. Differential Genetic Effects of <EMPH TYPE="ITAL">ESR1</EMPH> Gene Polymorphisms on Osteoporosis Outcomes. *JAMA*. 2004 Nov 3;292(17):2105.
116. GARCIAGIRALT N, ENJUANES A, BUSTAMANTE M, MELLIBOVSKY L, NOGUES X, CARRERAS R, et al. In vitro functional assay of alleles and haplotypes of two -promoter SNPs. *Bone*. 2005 May;36(5):902–8.
117. Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervía A, Nogués X, Ruiz-Gaspà S, Bustamante M, et al. A new SNP in a negative regulatory region of the CYP19A1 gene is associated with lumbar spine BMD in postmenopausal women. *Bone*. 2006 May;38(5):738–43.

118. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, et al. The Association between Common Vitamin D Receptor Gene Variations and Osteoporosis: A Participant-Level Meta-Analysis. *Ann Intern Med.* 2006 Aug 15;145(4):255–64.
119. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, et al. Large-Scale Evidence for the Effect of the COL1A1 Sp1 Polymorphism on Osteoporosis Outcomes: The GENOMOS Study. *PLoS Med.* 2006 Feb 21;3(4):e90.
120. Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, García-Giralt N, Pérez-Edo L, et al. COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporosis International.* 2007 Jan 10;18(2):235–43.
121. Agueda L, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Ciria M, Saló G, et al. A Haplotype-Based Analysis of the *LRP5* Gene in Relation to Osteoporosis Phenotypes in Spanish Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2008 Dec 1;23(12):1954–63.
122. Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, Trikalinos TA, Balcells S, Brandi ML, et al. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: The GENOMOS study. *Bone.* 2008 May;42(5):969–81.
123. Agueda L, Urreizti R, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Díez-Pérez A, et al. Analysis of Three Functional Polymorphisms in Relation to Osteoporosis Phenotypes: Replication in a Spanish Cohort. *Calcif Tissue Int.* 2010 Jul 14;87(1):14–24.
124. Urreizti R, Garcia-Giralt N, Riancho JA, González-Macías J, Civit S, Güerri R, et al. *COL1A1* haplotypes and hip fracture. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2012 Apr 1;27(4):950–3.
125. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012 May 15;44(5):491–501.
126. Yoskovitz* G, Garcia-Giralt N, Prieto-Alhambra D, Urreizti R, Sarrion P, Sole E, et al. Genotyping putative functional polymorphisms of rank in BARCOS cohort of postmenopausal women. *Bone.* 2012 May;50:S107–8.
127. Yoskovitz G, Garcia-Giralt N, Rodriguez-Sanz M, Urreizti R, Guerri R, Ariño-Ballester S, et al. Analyses of *RANK* and *RANKL* in the Post-GWAS Context: Functional Evidence of Vitamin D Stimulation Through a *RANKL* Distal Region. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2013 Dec 1;28(12):2550–60.

128. García-Giralt N, Yoskovitz G, Rodríguez-Sanz M, Urreizti R, Guerri R, Prieto-Alhambra D, et al. SNPs en el 3'UTR de gen RANK determinan la fractura osteoporótica sitio-dependiente. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2013 Jun;5(2):85–92.
129. Sarrión P, Mellibovsky L, Urreizti 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 Apr 15;9(4):e94607.
130. De-Ugarte L, Serra-Vinardell J, Nonell L, Balcells S, Arnal M, Nogues X, et al. Expression profiling of microRNAs in human bone tissue from postmenopausal women. *Hum Cell*. 2018 Jan 20;31(1):33–41.
131. Roca-Ayats N, Cozar Morillo M, Gerousi M, Czwan E, Urreizti R, Martínez-Gil N, et al. Identificación de variantes genéticas asociadas con la densidad mineral ósea (DMO) en el gen FLJ42280. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2017 Mar;9(1):28–34.
132. Trajanoska K, Morris JA, Oei L, Zheng HF, Evans DM, Kiel DP, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ*. 2018 Aug 29;k3225.
133. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giralt N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep*. 2018 Jul 19;8(1):10951.
134. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Vilardell M, Civit S, Urreizti R, García-Giralt N, et al. Estudios funcionales de variantes de DKK1 presentes en la población general. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2018 Dec;10(4):119–24.
135. Roca-Ayats N, Martínez-Gil N, Cozar M, Gerousi M, Garcia-Giralt N, Ovejero D, et al. Functional characterization of the C7ORF76 genomic region, a prominent GWAS signal for osteoporosis in 7q21.3. *Bone*. 2019 Jun;123:39–47.
136. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Atalay N, Pineda-Moncusí M, Garcia-Giralt N, Van Hul W, et al. Functional Assessment of Coding and Regulatory Variants From the <sc> DKK1 </sc> Locus. *JBMR Plus*. 2020 Dec 2;4(12).
137. Goddard JF, Mehrotra S, Mehrotra M. Osteogenesis imperfecta: exploring an autoimmune and immunotherapy perspective. *JBMR Plus*. 2025 Apr 30;9(6).
138. Rossi V, Lee B, Marom R. Osteogenesis imperfecta: advancements in genetics and treatment. *Curr Opin Pediatr*. 2019 Dec;31(6):708–15.

139. Formosa MM, Christou MA, Mäkitie O. Bone fragility and osteoporosis in children and young adults. *J Endocrinol Invest*. 2023 Sep 5;47(2):285–98.
140. Bregou Bourgeois A, Aubry-Rozier B, Bonafé L, Laurent-Applegate L, Pioletti DP, Zambelli PY. Osteogenesis imperfecta: from diagnosis and multidisciplinary treatment to future perspectives. *Swiss Med Wkly*. 2016 Jun 19;146(2526):w14322.
141. Jovanovic M, Marini JC. Update on the Genetics of Osteogenesis Imperfecta. *Calcif Tissue Int*. 2024 Aug 11;115(6):891–914.
142. Jovanovic M, Guterman-Ram G, Marini JC. Osteogenesis Imperfecta: Mechanisms and Signaling Pathways Connecting Classical and Rare OI Types. *Endocr Rev*. 2022 Jan 12;43(1):61–90.
143. Garibaldi N, Besio R, Dalglish R, Villani S, Barnes AM, Marini JC, et al. Dissecting the phenotypic variability of osteogenesis imperfecta. *Dis Model Mech*. 2022 May 1;15(5).
144. Gajko-Galicka A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochim Pol*. 2002;49(2):433–41.
145. Botor M, Fus-Kujawa A, Uroczynska M, Stepień KL, Galicka A, Gawron K, et al. Osteogenesis Imperfecta: Current and Prospective Therapies. *Biomolecules*. 2021 Oct 10;11(10):1493.
146. Kang H, Aryal A.C. S, Marini JC. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Translational Research*. 2017 Mar;181:27–48.
147. Garibaldi N, Besio R, Dalglish R, Villani S, Barnes AM, Marini JC, et al. Dissecting the phenotypic variability of osteogenesis imperfecta. *Dis Model Mech*. 2022 May 1;15(5).
148. Deguchi M, Tsuji S, Katsura D, Kasahara K, Kimura F, Murakami T. Current Overview of Osteogenesis Imperfecta. *Medicina (B Aires)*. 2021 May 10;57(5):464.
149. Hasegawa K. Osteogenesis imperfecta: pathogenesis, classification, and treatment. *Clinical Pediatric Endocrinology*. 2025;34(3):2025–0009.
150. Sillence DO. A Dyadic Nosology for Osteogenesis Imperfecta and Bone Fragility Syndromes 2024. *Calcif Tissue Int*. 2024 Jun 28;115(6):873–90.
151. GOLTZ RW. Focal Dermal Hypoplasia. *Arch Dermatol*. 1962 Dec 1;86(6):708.
152. Sutton VR. PORCN-Related Developmental Disorders. 1993.
153. Caricasole A, Ferraro T, Rimland JM, Terstappen GC. Molecular cloning and initial characterization of the MG61/PORC gene, the human homologue of the

- Drosophila segment polarity gene Porcupine. *Gene*. 2002 Apr;288(1–2):147–57.
154. Wang L, Jin X, Zhao X, Liu D, Hu T, Li W, et al. Focal dermal hypoplasia: updates. *Oral Dis*. 2014 Jan 6;20(1):17–24.
155. Gunasekera NS, Divito JK, Kupper TS, Huang JT, Divito SJ. Cross-Sectional Study Evaluating Skin, Hair, Nail, and Bone Disease in Patients with Focal Dermal Hypoplasia. *Pediatr Dermatol*. 2017 Mar 26;34(2):197–8.
156. Funck-Brentano T, Nilsson KH, Brommage R, Henning P, Lerner UH, Koskela A, et al. Porcupine inhibitors impair trabecular and cortical bone mass and strength in mice. *Journal of Endocrinology*. 2018 Jul;238(1):13–23.
157. Wang X, Reid Sutton V, Omar Peraza-Llanes J, Yu Z, Rosetta R, Kou YC, et al. Mutations in X-linked *PORCN*, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia. *Nat Genet*. 2007 Jul 3;39(7):836–8.
158. Lee J, Cha MS, Kim SC, Bang D. Electronmicroscopic Observation of the Basement Membrane Zone in Focal Dermal Hypoplasia. *Pediatr Dermatol*. 1996 Jan 20;13(1):5–9.
159. Happle R. Goltz syndrome and *PORCN*: A view from Europe. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2016 Mar 22;172(1):21–3.
160. Mallory SB, Krafchik BR, Moore DJ, Mallory SB. Goltz Syndrome. *Pediatr Dermatol*. 1989 Sep 20;6(3):251–3.
161. Lombardi MP, Bulk S, Celli J, Lampe A, Gabbett MT, Ousager LB, et al. Mutation update for the *PORCN* gene. *Hum Mutat*. 2011 Jul;32(7):723–8.
162. Pinna R, Cocco F, Campus G, Conti G, Milia E, Sardella A, et al. Genetic and developmental disorders of the oral mucosa: Epidemiology; molecular mechanisms; diagnostic criteria; management. *Periodontol 2000*. 2019 Jun 15;80(1):12–27.
163. Daneswari M, Reddy MR. Genetic mutations in Gorlin-Goltz syndrome. *Indian J Hum Genet*. 2013;19(3):369.
164. Peters T, Perrier R, Haber RM. Focal Dermal Hypoplasia: Report of a Case with Myelomeningocele, Arnold–Chiari Malformation and Hydrocephalus with a Review of Neurologic Manifestations of Goltz Syndrome. *Pediatr Dermatol*. 2014 Mar 5;31(2):220–4.
165. Formosa MM, Bergen DJM, Gregson CL, Maurizi A, Kämpe A, Garcia-Giralt N, et al. A Roadmap to Gene Discoveries and Novel Therapies in Monogenic Low and High Bone Mass Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Aug 13;12.

166. Motyckova G, Fisher D. Pycnodysostosis: Role and Regulation of Cathepsin K in Osteoclast Function and Human Disease. *Curr Mol Med*. 2002 Aug 1;2(5):407–21.
167. Donnarumma M, Regis S, Tappino B, Rosano C, Assereto S, Corsolini F, et al. Molecular analysis and characterization of nine novel CTSK mutations in twelve patients affected by pycnodysostosis. *Hum Mutat*. 2007 May;28(5):524–524.
168. Bénichou OD, Laredo JD, de Vernejoul MC. Type II autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schönberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone*. 2000 Jan;26(1):87–93.
169. Balemans W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*. 2001 Mar 1;10(5):537–43.
170. Piters E, Culha C, Moester M, Van Bezooijen R, Adriaensen D, Mueller T, et al. First missense mutation in the SOST gene causing sclerosteosis by loss of sclerostin function. *Hum Mutat*. 2010 May 10;31(7):E1526–43.
171. Wergedal JE, Veskovik K, Hellan M, Nygth C, Balemans W, Libanati C, et al. Patients with Van Buchem Disease, an Osteosclerotic Genetic Disease, Have Elevated Bone Formation Markers, Higher Bone Density, and Greater Derived Polar Moment of Inertia than Normal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Dec;88(12):5778–83.
172. Balemans W. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet*. 2002 Feb 1;39(2):91–7.
173. Geneviève D, Proulle V, Isidor B, Bellais S, Serre V, Djouadi F, et al. Thromboxane synthase mutations in an increased bone density disorder (Ghosal syndrome). *Nat Genet*. 2008 Mar 10;40(3):284–6.
174. Isidor B, Dagoneau N, Huber C, Genevieve D, Bader-Meunier B, Blanche S, et al. A gene responsible for Ghosal hemato-diaphyseal dysplasia maps to chromosome 7q33–34. *Hum Genet*. 2007 Apr 3;121(2):269–73.
175. Morin S, Leslie WD. High bone mineral density is associated with high body mass index. *Osteoporosis International*. 2009 Jul 26;20(7):1267–71.
176. Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-Wide Association Study Using Extreme Truncate Selection Identifies Novel Genes Affecting Bone Mineral Density and Fracture Risk. *PLoS Genet*. 2011 Apr 21;7(4):e1001372.
177. Little RD, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, et al. A Mutation in the LDL Receptor–Related Protein 5 Gene Results in the

- Autosomal Dominant High–Bone-Mass Trait. *The American Journal of Human Genetics*. 2002 Jan;70(1):11–9.
178. Sarrión P, Mellibovsky L, Urreizti 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 Apr 15;9(4):e94607.
179. Gregson CL, Steel SA, O'Rourke KP, Allan K, Ayuk J, Bhalla A, et al. 'Sink or swim': an evaluation of the clinical characteristics of individuals with high bone mass. *Osteoporosis International*. 2012 Feb 1;23(2):643–54.
180. Gregson CL, Duncan EL. The Genetic Architecture of High Bone Mass. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Oct 29;11.
181. Bergen DJM, Maurizi A, Formosa MM, McDonald GLK, El-Gazzar A, Hassan N, et al. High Bone Mass Disorders: New Insights From Connecting the Clinic and the Bench. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2020 Dec 1;38(2):229–47.
182. Paccou J, Michou L, Kolta S, Debiais F, Cortet B, Guggenbuhl P. High bone mass in adults. *Joint Bone Spine*. 2018 Dec;85(6):693–9.
183. Levasseur R, Lacombe D, Christine de Vernejoul M. LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint Bone Spine*. 2005 May;72(3):207–14.
184. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJJ, Löwik CWGM, van Bezooijen RL. Osteocyte-Derived Sclerostin Inhibits Bone Formation: Its Role in Bone Morphogenetic Protein and Wnt Signaling. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2008 Feb;90(Supplement_1):31–5.
185. Maupin KA, Droscha CJ, Williams BO. A Comprehensive Overview of Skeletal Phenotypes Associated with Alterations in Wnt/ β -catenin Signaling in Humans and Mice. *Bone Res*. 2013 Mar 29;1(1):27–71.
186. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Jul;5(7):554–65.
187. Mikosch P. Gaucher disease and bone. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011 Oct;25(5):665–81.
188. Nalysnyk L, Rotella P, Simeone JC, Hamed A, Weinreb N. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology*. 2017 Feb 7;22(2):65–73.
189. Wang M, Li F, Zhang J, Lu C, Kong W. Global Epidemiology of Gaucher Disease: an Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2023 May;45(4):181–8.

190. Alfonso Palacín P, Pocoví M. Genética de la enfermedad de Gaucher. Correlación genotipo-fenotipo. *Med Clin (Barc)*. 2011 Sep;137:17–22.
191. Giraldo P, Alfonso P, Irún P, Gort L, Chabás A, Vilageliu L, et al. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):17.
192. Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabás A, Vilageliu L. Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: Putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat*. 1998;11(4):295–305.
193. Camou F, Berger MG. Gaucher disease, state of the art and perspectives. *J Intern Med*. 2025 Sep 3;298(3):155–72.
194. Mehta A. Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. *Eur J Intern Med*. 2006 Nov;17:S2–5.
195. Pastores GM. Neuropathic Gaucher disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2010 Dec;160(23–24):605–8.
196. Méndez-Cobián DA, Guzmán-Silahua S, García-Hernández D, Conde-Sánchez J, Castañeda-Borrayo Y, Duey KL, et al. An Overview of Gaucher Disease. *Diagnostics*. 2024 Dec 17;14(24):2840.
197. Barneveld RA, Keizer W, Tegelaers FPW, Ginns EI, van Kessel AG, Brady RO, et al. Assignment of the gene coding for human β -glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet*. 1983 Sep;64(3):227–31.
198. Cozar M, Bembi B, Dominissini S, Zampieri S, Vilageliu L, Grinberg D, et al. Molecular characterization of a new deletion of the GBA1 gene due to an inter Alu recombination event. *Mol Genet Metab*. 2011 Feb;102(2):226–8.
199. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics*. 1989 Jan;4(1):87–96.
200. Sorge JA, West C, Kuhl W, Treger L, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am J Hum Genet*. 1987 Dec;41(6):1016–24.
201. Rossi M, Schaaque S, Usnich T, Boehm J, Steffen N, Schell N, et al. Classification and Genotype–Phenotype Relationships of *GBA1* Variants: MDSGene Systematic Review. *Movement Disorders*. 2025 Apr 10;40(4):605–18.
202. Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, et al. X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep*. 2003 Jul 3;4(7):704–9.

203. Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14861–6.
204. Fabrega S, Durand P, Codogno P, Bauvy C, Delomenie C, Henrissat B, et al. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology*. 2000 Nov 1;10(11):1217–24.
205. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Mol Genet Metab*. 2004 Sep;83(1–2):6–15.
206. Basiri M, Ghaffari ME, Ruan J, Murugesan V, Kleytman N, Belinsky G, et al. Osteonecrosis in Gaucher disease in the era of multiple therapies: Biomarker set for risk stratification from a tertiary referral center. *Elife*. 2023 May 30;12.
207. Rozenfeld PA, Crivaro AN, Ormazabal M, Mucci JM, Bondar C, Delpino MV. Unraveling the mystery of Gaucher bone density pathophysiology. *Mol Genet Metab*. 2021 Feb;132(2):76–85.
208. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentré F. Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther*. 2010 Aug 9;12(4):R156.
209. Drugan C, Jebeleanu G, Grigorescu-Sido P, Caillaud C, Craciun AM. Biochemical Markers of Bone Turnover as Tools in the Evaluation of Skeletal Involvement in Patients with Type 1 Gaucher Disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2002 Jan;28(1):13–20.
210. Mistry PK, Liu J, Yang M, Nottoli T, McGrath J, Jain D, et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Nov 9;107(45):19473–8.
211. Hughes D, Mikosch P, Belmatoug N, Carubbi F, Cox T, Goker-Alpan O, et al. Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2019 Jun 1;34(6):996–1013.
212. Bobillo Lobato J, Durán Parejo P, Núñez Vázquez RJ, Jiménez Jiménez LM. Catepsina K como biomarcador de afectación ósea en la enfermedad de Gaucher tipo 1. *Med Clin (Barc)*. 2015 Oct;145(7):281–7.
213. Faden MA, Krakow D, Ezgu F, Rimoin DL, Lachman RS. The Erlenmeyer flask bone deformity in the skeletal dysplasias. *Am J Med Genet A*. 2009 Jun 14;149A(6):1334–45.
214. Wang CH, Huang Y, Liao WL, Hsieh AR, Lin WD, Liu KW, et al. GBA1 as a risk gene for osteoporosis in the specific populations and its role in the

- development of Gaucher disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2024 Apr 4;19(1):144.
215. Mistry PK, Weinreb NJ, Kaplan P, Cole JA, Gwosdow AR, Hangartner T. Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: Response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults. *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Jan;46(1):66–72.
216. Moran MT, Schofield JP, Hayman AR, Shi GP, Young E, Cox TM. Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K. *Blood.* 2000 Sep 1;96(5):1969–78.
217. Giraldo P, Solano V, Páez-Calvo JI, Giralt M, Rubio-Félix D. Quality of life related to type 1 Gaucher disease: Spanish experience. *Quality of Life Research.* 2005 Mar;14(2):453–61.
218. Khan A, Hangartner T, Weinreb NJ, Taylor JS, Mistry PK. Risk factors for fractures and avascular osteonecrosis in type 1 Gaucher disease: A study from the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2012 Aug 1;27(8):1839–48.
219. Marcucci G, Brandi ML. The Diagnosis and Therapy of Osteoporosis in Gaucher Disease. *Calcif Tissue Int.* 2025 Jan 22;116(1):31.
220. Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, et al. BMD at Multiple Sites and Risk of Fracture of Multiple Types: Long-Term Results From the Study of Osteoporotic Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2003 Nov 1;18(11):1947–54.
221. Masi L. Gaucher disease: the role of the specialist on metabolic bone diseases. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* 2015;
222. Aggarwal S. Role of whole exome sequencing for unidentified genetic syndromes. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2021 Apr;33(2):112–22.
223. Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics.* 2016 Sep;15(5):374–84.
224. Chiappetta C, Della Rocca C, Di Cristofano C. Whole-Exome Analysis and Osteosarcoma: A Game Still Open. *Int J Mol Sci.* 2024 Dec 20;25(24):13657.
225. Paria N, Copley LA, Herring JA, Kim HKW, Richards BS, Sucato DJ, et al. Whole-Exome Sequencing. *J Bone Joint Surg.* 2013 Dec;95(23):e185.
226. Lertwilaiwittaya P, Suktitipat B, Khongthong P, Pongsapich W, Limwongse C, Pithukpakorn M. Identification of novel mutation in *RANKL* by whole-exome sequencing in a Thai family with osteopetrosis; a case report and review of *RANKL* osteopetrosis. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Jul 30;9(7).

227. Shamriz O, Shaag A, Yaacov B, NaserEddin A, Weintraub M, Elpeleg O, et al. The use of whole exome sequencing for the diagnosis of autosomal recessive malignant infantile osteopetrosis. *Clin Genet*. 2017 Jul 2;92(1):80–5.
228. Ovejero D, Garcia-Giralt N, Martínez-Gil N, Rabionet R, Balcells S, Grinberg D, et al. Clinical description and genetic analysis of a novel familial skeletal dysplasia characterized by high bone mass and lucent bone lesions. *Bone*. 2022 Aug;161:116450.
229. Shamseldin HE, AlAbdi L, Maddirevula S, Alsaif HS, Alzahrani F, Ewida N, et al. Lethal variants in humans: lessons learned from a large molecular autopsy cohort. *Genome Med*. 2021 Oct 13;13(1):161.
230. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, Zoccolillo M, Ferradini V, Petricone D, et al. Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol*. 2019 Apr 11;10.
231. Grossi A, Miano M, Lanciotti M, Fioredda F, Guardo D, Palmisani E, et al. Targeted NGS Yields Plentiful Ultra-Rare Variants in Inborn Errors of Immunity Patients. *Genes (Basel)*. 2021 Aug 24;12(9):1299.
232. Kulkarni P, Frommolt P. Challenges in the Setup of Large-scale Next-Generation Sequencing Analysis Workflows. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:471–7.
233. Pei XM, Yeung MHY, Wong ANN, Tsang HF, Yu ACS, Yim AKY, et al. Targeted Sequencing Approach and Its Clinical Applications for the Molecular Diagnosis of Human Diseases. *Cells*. 2023 Feb 2;12(3):493.
234. Hannan FM, Newey PJ, Whyte MP, Thakker R V. Genetic approaches to metabolic bone diseases. *Br J Clin Pharmacol*. 2019 Jun 28;85(6):1147–60.
235. Harrington J, AlSubaihin A, Dupuis L, Kannu P, Mendoza-Londono R, Howard A. Diagnostic utility of next-generation sequence genetic panel testing in children presenting with a clinically significant fracture history. *Arch Osteoporos*. 2021 Dec 5;16(1):88.
236. Zhao D, Sun L, Zheng W, Hu J, Zhou B, Wang O, et al. Novel mutation in LRP5 gene cause rare osteosclerosis: cases studies and literature review. *Molecular Genetics and Genomics*. 2023 May 27;298(3):683–92.
237. Scocchia A, Kangas-Kontio T, Irving M, Hero M, Saarinen I, Pelttari L, et al. Diagnostic utility of next-generation sequencing-based panel testing in 543 patients with suspected skeletal dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2021 Dec 9;16(1):412.

238. Rauch F, Lalic L, Glorieux FH, Moffatt P, Roughley P. Targeted Sequencing of a Pediatric Metabolic Bone Gene Panel Using a Desktop Semiconductor Next-Generation Sequencer. *Calcif Tissue Int.* 2014 Oct 3;95(4):323–31.
239. Rouleau C, Malorie M, Collet C, Porquet-Bordes V, Gennero I, Eddiry S, et al. Diagnostic yield of bone fragility gene panel sequencing in children and young adults referred for idiopathic primary osteoporosis at a single regional reference centre. *Bone Rep.* 2022 Jun;16:101176.
240. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *The Lancet.* 2005 Sep;366(9491):1121–31.
241. Witte JS. Genome-Wide Association Studies and Beyond. *Annu Rev Public Health.* 2010 Mar 1;31(1):9–20.
242. Li Q, Wang J, Zhao C. From Genomics to Metabolomics: Molecular Insights into Osteoporosis for Enhanced Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Biomedicines.* 2024 Oct 18;12(10):2389.
243. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *The American Journal of Human Genetics.* 2017 Jul;101(1):5–22.
244. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8(Suppl 1):S14.
245. Richards J, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen T, Soranzo N, Wilson S, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *The Lancet.* 2008 May;371(9623):1505–12.
246. Styrkarsdottir U, Halldorsson B V., Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple Genetic Loci for Bone Mineral Density and Fractures. *New England Journal of Medicine.* 2008 May 29;358(22):2355–65.
247. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009 Nov 4;41(11):1199–206.
248. Yuan J, Tickner J, Mullin BH, Zhao J, Zeng Z, Morahan G, et al. Advanced Genetic Approaches in Discovery and Characterization of Genes Involved With Osteoporosis in Mouse and Human. *Front Genet.* 2019 Apr 2;10.
249. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Jonasdottir A, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature.* 2013 May 23;497(7450):517–20.
250. Boudin E, Fijalkowski I, Hendrickx G, Van Hul W. Genetic control of bone mass. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Sep;432:3–13.

251. Yuan J, Tickner J, Mullin BH, Zhao J, Zeng Z, Morahan G, et al. Advanced Genetic Approaches in Discovery and Characterization of Genes Involved With Osteoporosis in Mouse and Human. *Front Genet.* 2019 Apr 2;10.
252. Karsdal MA, Neutzsky-Wulff A V., Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K. Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb;366(2):483–8.
253. Veronesi F, Borsari V, Sartori M, Orciani M, Mattioli-Belmonte M, Fini M. The use of cell conditioned medium for musculoskeletal tissue regeneration. *J Cell Physiol.* 2018 Jun 29;233(6):4423–42.
254. Asimit J, Zeggini E. Rare Variant Association Analysis Methods for Complex Traits. *Annu Rev Genet.* 2010 Dec 1;44(1):293–308.
255. Boutry S, Helaers R, Lenaerts T, Vikkula M. Rare variant association on unrelated individuals in case–control studies using aggregation tests: existing methods and current limitations. *Brief Bioinform.* 2023 Sep 22;24(6).
256. Bose D, Fuchsberger C, Boehnke M. Rare-variant association studies: When are aggregation tests more powerful than single-variant tests? *The American Journal of Human Genetics.* 2025 Aug;112(8):1948–61.
257. Webster SJ, Aldossary MA, Hampshire DJ. A Bioinformatics Toolkit: In Silico Tools and Online Resources for Investigating Genetic Variation. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Oct 5;45(07):674–84.
258. Landrum MJ, Kattman BL. ClinVar at five years: Delivering on the promise. *Hum Mutat.* 2018 Nov 11;39(11):1623–30.
259. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D886–94.
260. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009 Jul 25;4(7):1073–81.
261. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):248–9.
262. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D439–44.
263. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605–12.

264. Kiel DP, Kemp JP, Rivadeneira F, Westendorf JJ, Karasik D, Duncan EL, et al. The Musculoskeletal Knowledge Portal: Making Omics Data Useful to the Broader Scientific Community. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2020 Dec 1;35(9):1626–33.
265. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010 Nov 4;468(7320):67–71.
266. Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* (1979). 2018 Sep 21;361(6408):1259–62.
267. Miller SM, Wang T, Randolph PB, Arbab M, Shen MW, Huang TP, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nat Biotechnol*. 2020 Apr 10;38(4):471–81.
268. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Sep 25;109(39).
269. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science* (1979). 2018 Aug 31;361(6405):866–9.
270. Rao S, Yao Y, Bauer DE. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation. *Genome Med*. 2021 Dec 10;13(1):41.
271. Bruntraeger M, Byrne M, Long K, Bassett AR. Editing the Genome of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. In 2019. p. 153–83.
272. Cevenini L, Calabretta MM, Calabria D, Roda A, Michelini E. Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology? In 2015. p. 3–17.
273. Baljinnyam B, Ronzetti M, Simeonov A. Advances in luminescence-based technologies for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2023 Jan 2;18(1):25–35.
274. Gould SJ, Subramani S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem*. 1988 Nov;175(1):5–13.
275. Rosochowicz MA, Lach MS, Richter M, Suchorska WM, Trzeciak T. Conditioned Medium – Is it an Undervalued Lab Waste with the Potential for Osteoarthritis Management? *Stem Cell Rev Rep*. 2023 Jul 15;19(5):1185–213.

276. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*. 2011 Feb 13;11(4):794–804.
277. Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–14.
278. Gomez-Camarillo MA, Almonte-Becerril M, Vasquez Tort M, Tapia-Ramirez J, Kouri Flores JB. Chondrocyte proliferation in a new culture system. *Cell Prolif*. 2009 Apr 13;42(2):207–18.
279. López-Ruiz E, Perán M, Cobo-Molinos J, Jiménez G, Picón M, Bustamante M, et al. Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Jan;21(1):246–58.
280. Matsuoka K, Park K ae, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-Derived Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014 Jul 1;29(7):1522–30.
281. Kreja L, Brenner RE, Tautzenberger A, Liedert A, Friemert B, Ehrnthaller C, et al. Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2010 Feb 30;109(2):347–55.
282. Kim BJ, Lee YS, Lee SY, Park SY, Dieplinger H, Ryu SH, et al. Afamin secreted from nonresorbing osteoclasts acts as a chemokine for preosteoblasts via the Akt-signaling pathway. *Bone*. 2012 Sep;51(3):431–40.
283. Hannan FM, Newey PJ, Whyte MP, Thakker R V. Genetics of Skeletal Disorders. In 2020. p. 325–51.
284. Newey PJ, Gorvin CM, Whyte MP, Thakker R V. Introduction to Genetics of Skeletal and Mineral Metabolic Diseases. In: *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*. Elsevier; 2018. p. 1–21.
285. Ward LD, Kellis M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat Biotechnol*. 2012 Nov 8;30(11):1095–106.
286. Spotila LD, Constantinou CD, Sereda L, Ganguly A, Riggs BL, Prockop DJ. Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal osteoporosis: evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991 Jun 15;88(12):5423–7.
287. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A De, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 18;3(1):17052.
288. Carpenter TO, Shaw NJ, Portale AA, Ward LM, Abrams SA, Pettifor JM. Rickets. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Dec 21;3(1):17101.

289. van Dijk FS, Zillikens MC, Micha D, Riessland M, Marcelis CLM, de Die-Smulders CE, et al. *PLS3* Mutations in X-Linked Osteoporosis with Fractures. *New England Journal of Medicine*. 2013 Oct 17;369(16):1529–36.
290. Tengan CH, Kiyomoto BH, Rocha MS, Tavares VLS, Gabbai AA, Moraes CT. Mitochondrial Encephalomyopathy and Hypoparathyroidism Associated with a Duplication and a Deletion of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid ¹. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jan;83(1):125–9.
291. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youlten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet*. 2017 Oct 1;49(10):1468–75.
292. Stechman MJ, Loh NY, Thakker R V. Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis. *Pediatric Nephrology*. 2009 Dec 30;24(12):2321–32.
293. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, Grover M, et al. *WNT1* Mutations in Early-Onset Osteoporosis and Osteogenesis Imperfecta. *New England Journal of Medicine*. 2013 May 9;368(19):1809–16.
294. Pekkinen M, Terhal PA, Botto LD, Henning P, Mäkitie RE, Roschger P, et al. Osteoporosis and skeletal dysplasia caused by pathogenic variants in *SGMS2*. *JCI Insight*. 2019 Apr 4;4(7).
295. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Jan 1;52(5).
296. Cohen-Kfir E, Artsi H, Levin A, Abramowitz E, Bajayo A, Gurt I, et al. *Sirt1* Is a Regulator of Bone Mass and a Repressor of *Sost* Encoding for Sclerostin, a Bone Formation Inhibitor. *Endocrinology*. 2011 Dec 1;152(12):4514–24.
297. Roforth MM, Farr JN, Fujita K, McCready LK, Atkinson EJ, Therneau TM, et al. Global transcriptional profiling using RNA sequencing and DNA methylation patterns in highly enriched mesenchymal cells from young versus elderly women. *Bone*. 2015 Jul;76:49–57.
298. Zhong Y, Zhou X, Pan Z, Zhang J, Pan J. Role of epigenetic regulatory mechanisms in age-related bone homeostasis imbalance. *The FASEB Journal*. 2024 May 15;38(9).
299. Yu L, Li W, Yang P, Zhang W, Tao H, Ge G, et al. Osteoblastic microRNAs in skeletal diseases: Biological functions and therapeutic implications. *Engineered Regeneration*. 2022 Sep;3(3):241–57.
300. Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S, Abroun S, et al. Different Methylation Patterns of *RUNX2*, *OSX*, *DLX5* and *BSP* in Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Cell J*. 2015;17(1):71–82.

301. Lombardi G, Delvin E. Micro-RNA: A Future Approach to Personalized Diagnosis of Bone Diseases. *Calcif Tissue Int.* 2022 Feb 19;112(2):271–87.
302. Yalaev BI, Kaletnik EI, Karpova YS, Belaya ZE, Minniakhmetov IR, Mokrysheva NG, et al. The Role of microRNA in the Regulation of Differentiation and the Functionality of Osteoblasts, Osteoclasts, and Their Precursors in Osteoporosis. *Noncoding RNA.* 2025 Feb 8;11(1):14.
303. Liu Y, Qi X, Donnelly L, Elghobashi-Meinhardt N, Long T, Zhou RW, et al. Mechanisms and inhibition of Porcupine-mediated Wnt acylation. *Nature.* 2022 Jul 28;607(7920):816–22.
304. Vivante A, Kleppa MJ, Schulz J, Kohl S, Sharma A, Chen J, et al. Mutations in TBX18 Cause Dominant Urinary Tract Malformations via Transcriptional Dysregulation of Ureter Development. *The American Journal of Human Genetics.* 2015 Aug;97(2):291–301.
305. Gregson CL, Hardcastle SA, Cooper C, Tobias JH. Friend or foe: high bone mineral density on routine bone density scanning, a review of causes and management. *Rheumatology.* 2013 Jun 1;52(6):968–85.
306. High-Bone-Mass Disease and *LRP5*. *New England Journal of Medicine.* 2004 May 13;350(20):2096–9.
307. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013 Feb 6;19(2):179–92.
308. High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor–Related Protein 5. *New England Journal of Medicine.* 2002 Sep 19;347(12):943–4.
309. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Bénichou O, Scopelliti D, et al. Six Novel Missense Mutations in the LDL Receptor-Related Protein 5 (*LRP5*) Gene in Different Conditions with an Increased Bone Density. *The American Journal of Human Genetics.* 2003 Mar;72(3):763–71.
310. Patel MS, Karsenty G. Regulation of Bone Formation and Vision by *LRP5*. *New England Journal of Medicine.* 2002 May 16;346(20):1572–4.
311. Littman J, Yang W, Olansen J, Phornphutkul C, Aaron RK. *LRP5*, Bone Mass Polymorphisms and Skeletal Disorders. *Genes (Basel).* 2023 Sep 23;14(10):1846.
312. 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. *Journal of Biological Chemistry.* 2011 Jun;286(22):19489–500.
313. 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. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016 Apr 1;31(4):874–81.
314. Shen C, Xiong WC, Mei L. LRP4 in neuromuscular junction and bone development and diseases. *Bone*. 2015 Nov;80:101–8.
315. Boudin E, Van Hul W. Sclerosing bone dysplasias. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018 Oct;32(5):707–23.
316. Zhou W, van Rooij JG, van de Laarschot DM, Zervou Z, Bruggenwirth H, Appelman-Dijkstra NM, et al. Prevalence of Monogenic Bone Disorders in a Dutch Cohort of Atypical Femur Fracture Patients. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2020 Dec 1;38(6):896–906.
317. Zhu X, Bai W, Zheng H. Twelve years of GWAS discoveries for osteoporosis and related traits: advances, challenges and applications. *Bone Res*. 2021 Apr 29;9(1):23.
318. Morris JA, Kemp JP, Youtten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet*. 2019 Feb 31;51(2):258–66.
319. Kim SK. Identification of 613 new loci associated with heel bone mineral density and a polygenic risk score for bone mineral density, osteoporosis and fracture. *PLoS One*. 2018 Jul 26;13(7):e0200785.
320. Nguyen T V, Eisman JA. Post-GWAS Polygenic Risk Score: Utility and Challenges. *JBMR Plus*. 2020 Nov 19;4(11).
321. Rivadeneira F, Mäkitie O. Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2016 May;27(5):262–81.
322. Zeng Z, Bromberg Y. Predicting Functional Effects of Synonymous Variants: A Systematic Review and Perspectives. *Front Genet*. 2019 Oct 7;10.
323. Ganakammal SR, Alexov E. Evaluation of performance of leading algorithms for variant pathogenicity predictions and designing a combinatory predictor method: application to Rett syndrome variants. *PeerJ*. 2019 Nov 27;7:e8106.
324. Livesey BJ, Marsh JA. Interpreting protein variant effects with computational predictors and deep mutational scanning. *Dis Model Mech*. 2022 Jun 1;15(6).
325. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):343–6.

326. Jodeh W, Katz AJ, Hart M, Warden SJ, Niziolek P, Alam I, et al. Autosomal Dominant Osteopetrosis (ADO) Caused by a Missense Variant in the *TCIRG1* Gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2024 Jun 17;109(7):1726–32.
327. Chu A, Zimngibl RA, Manolson MF. The V-ATPase a3 Subunit: Structure, Function and Therapeutic Potential of an Essential Biomolecule in Osteoclastic Bone Resorption. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 28;22(13):6934.
328. Chen Q, Kou H, Demy D Lou, Liu W, Li J, Wen Z, et al. The different roles of V-ATPase a subunits in phagocytosis/endocytosis and autophagy. *Autophagy*. 2024 Oct 2;20(10):2297–313.
329. Hashimoto R, Minoshima M, Kikuta J, Yari S, Bull SD, Ishii M, et al. An Acid-Activatable Fluorescence Probe for Imaging Osteocytic Bone Resorption Activity in Deep Bone Cavities. *Angewandte Chemie International Edition*. 2020 Nov 16;59(47):20996–1000.
330. Søre K, Delaissé JM. Time-lapse reveals that osteoclasts can move across the bone surface while resorbing. *J Cell Sci*. 2017 Jun 15;130(12):2026–35.
331. Gruber R. Molecular and cellular basis of bone resorption. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2015 Feb 16;165(3–4):48–53.
332. Moosa S, Chung BH -Y., Tung JY -L., Altmüller J, Thiele H, Nürnberg P, et al. Mutations in *SEC24D* cause autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Clin Genet*. 2016 Apr 14;89(4):517–9.
333. Zhang H, Yue H, Wang C, Gu J, He J, Fu W, et al. Novel mutations in the *SEC24D* gene in Chinese families with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Osteoporosis International*. 2017 Apr 10;28(4):1473–80.
334. Sarmah S, Barrallo-Gimeno A, Melville DB, Topczewski J, Solnica-Krezel L, Knapik EW. Sec24D-Dependent Transport of Extracellular Matrix Proteins Is Required for Zebrafish Skeletal Morphogenesis. *PLoS One*. 2010 Apr 28;5(4):e10367.
335. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a Novel Receptor for Dickkopf 1 and Sclerostin, Is Expressed by Osteoblasts and Regulates Bone Growth and Turnover In Vivo. *PLoS One*. 2009 Nov 20;4(11):e7930.
336. Styrkarsdottir U, Halldorsson B V, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet*. 2009 Jan 14;41(1):15–7.
337. Hornstein BD, Roman D, Arévalo-Soliz LM, Engevik MA, Zechiedrich L. Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. *PLoS One*. 2016 Dec 5;11(12):e0167537.

338. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005 May;51(3):187–200.
339. Khan H, Chong AEQ, Bilal M, Nawaz S, Abdullah, Abbasi S, et al. Novel variants in the LRP4 underlying Cenani-Lenz Syndactyly syndrome. *J Hum Genet*. 2022 May 3;67(5):253–9.
340. Marechal G, Schouman T, Mauprivez C, Benassarou M, Chaine A, Diner PA, et al. Gnathodiaphyseal dysplasia with a novel R597I mutation of ANO5: Mandibular reconstruction strategies. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2019 Nov;120(5):428–31.
341. Taheri F, Taghizadeh E, Pour MJR, Rostami D, Renani PG, Rastgar-Moghadam A, et al. Limb-girdle Muscular Dystrophy and Therapy: Insights into Cell and Gene-based Approaches. *Curr Gene Ther*. 2020 Apr 25;19(6):386–94.
342. Savarese M, Di Fruscio G, Tasca G, Ruggiero L, Janssens S, De Bleecker J, et al. Next generation sequencing on patients with LGMD and nonspecific myopathies: Findings associated with ANO5 mutations. *Neuromuscular Disorders*. 2015 Jul;25(7):533–41.
343. Cesar S, Coll M, Fiol V, Fernandez-Falgueras A, Cruzalegui J, Iglesias A, et al. LMNA-related muscular dystrophy: Identification of variants in alternative genes and personalized clinical translation. *Front Genet*. 2023 Mar 24;14.
344. Gonzalo S, Kreienkamp R, Askjaer P. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev*. 2017 Jan;33:18–29.
345. Muchir A, Worman HJ. Emery–Dreifuss muscular dystrophy: focal point nuclear envelope. *Curr Opin Neurol*. 2019 Oct;32(5):728–34.
346. Alcorta-Sevillano N, Macías I, Rodríguez CI, Infante A. Crucial Role of Lamin A/C in the Migration and Differentiation of MSCs in Bone. *Cells*. 2020 May 26;9(6):1330.
347. Chen Q, Takada R, Takada S. Loss of *Porcupine* impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish. *J Cell Sci*. 2015 Feb 15;128(4):828–828.
348. Kague E, Turci F, Newman E, Yang Y, Brown KR, Aglan MS, et al. 3D assessment of intervertebral disc degeneration in zebrafish identifies changes in bone density that prime disc disease. *Bone Res*. 2021 Aug 31;9(1):39.

349. Farin HF, Mansouri A, Petry M, Kispert A. T-box Protein Tbx18 Interacts with the Paired Box Protein Pax3 in the Development of the Paraxial Mesoderm. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Sep;283(37):25372–80.
350. Bussen M, Petry M, Schuster-Gossler K, Leitges M, Gossler A, Kispert A. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1209–21.
351. Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. Epigenetic regulation of Tbx18 gene expression during endochondral bone formation. *Cell Tissue Res*. 2015 Feb 8;359(2):503–12.
352. Hasan LK, Aljabban J, Rohr M, Mukhtar M, Adapa N, Salim R, et al. Metaanalysis Reveals Genetic Correlates of Osteoporosis Pathogenesis. *J Rheumatol*. 2021 Jun;48(6):940–5.
353. Lontos K, Adamik J, Tsagianni A, Galson DL, Chirgwin JM, Suvannasankha A. The Role of Semaphorin 4D in Bone Remodeling and Cancer Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Jun 19;9.
354. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Gkiomisi A, Sakellariou G, Savvidis M, et al. Circulating semaphorin-4D and plexin-B1 levels in postmenopausal women with low bone mass: the 3-month effect of zoledronic acid, denosumab or teriparatide treatment. *Expert Opin Ther Targets*. 2015 Mar 4;19(3):299–306.
355. Zhang Y, Feng E, Xu Y, Wang W, Zhang T, Xiao L, et al. Serum Sema4D levels are associated with lumbar spine bone mineral density and bone turnover markers in patients with postmenopausal osteoporosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):16352–7.
356. Sekimoto T, Ishii M, Emi M, Kurogi S, Funamoto T, Hamada H, et al. Segmental copy number loss in the region of *Semaphorin 4D* gene in patients with acetabular dysplasia. *Journal of Orthopaedic Research*. 2013 Jun 17;31(6):957–61.
357. Luzón-Toro B, Gui H, Ruiz-Ferrer M, Sze-Man Tang C, Fernández RM, Sham PC, et al. Exome sequencing reveals a high genetic heterogeneity on familial Hirschsprung disease. *Sci Rep*. 2015 Nov 12;5(1):16473.
358. Chassaing N, Davis EE, McKnight KL, Niederriter AR, Causse A, David V, et al. Targeted resequencing identifies *PTCH1* as a major contributor to ocular developmental anomalies and extends the SOX2 regulatory network. *Genome Res*. 2016 Apr;26(4):474–85.
359. GORLIN RJ. Nevroid Basal-Cell Carcinoma Syndrome. *Medicine*. 1987 Mar;66(2):98–113.

360. Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, et al. Patched1 Haploinsufficiency Increases Adult Bone Mass and Modulates Gli3 Repressor Activity. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):689–99.
361. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3059–87.
362. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M, et al. Hedgehog Signaling in Mature Osteoblasts Regulates Bone Formation and Resorption by Controlling PTHrP and RANKL Expression. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):674–88.
363. Jing J, Wu Z, Wang J, Luo G, Lin H, Fan Y, et al. Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Aug 18;8(1):315.
364. Onodera S, Nakamura Y, Azuma T. Gorlin Syndrome: Recent Advances in Genetic Testing and Molecular and Cellular Biological Research. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 13;21(20):7559.
365. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther*. 2005 Oct 27;4(10):1050–4.
366. Won HY, Mun SH, Shin B, Lee S. Contradictory Role of CD97 in Basal and Tumor Necrosis Factor–Induced Osteoclastogenesis In Vivo. *Arthritis & Rheumatology*. 2016 May 27;68(5):1301–13.
367. Gray JX, Haino M, Roth MJ, Maguire JE, Jensen PN, Yarme A, et al. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J Immunol*. 1996 Dec 15;157(12):5438–47.
368. Tammela T, Autio-Harmainen H, Hellström P, Kontturi M, Martikainen J. [Urethral carcinoma in men--a difficult diagnostic problem]. *Duodecim*. 1989;105(9):851–5.
369. Wang M, De Marco P, Merello E, Drapeau P, Capra V, Kibar Z. Role of the planar cell polarity gene *Protein tyrosine kinase 7* in neural tube defects in humans. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015 Dec 14;103(12):1021–7.
370. Hayes M, Naito M, Daulat A, Angers S, Ciruna B. Ptk7 promotes non-canonical Wnt/PCP-mediated morphogenesis and inhibits Wnt/ β -catenin-dependent cell fate decisions during vertebrate development. *Development*. 2013 Apr 15;140(8):1807–18.
371. Berger H, Wodarz A, Borchers A. PTK7 Faces the Wnt in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2017 Apr 5;5.
372. Panicker LM, Srikanth MP, Castro-Gomes T, Miller D, Andrews NW, Feldman RA. Gaucher disease iPSC-derived osteoblasts have developmental and

- lysosomal defects that impair bone matrix deposition. *Hum Mol Genet.* 2018 Mar 1;27(5):811–22.
373. Hein LK, Meikle PJ, Hopwood JJ, Fuller M. Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2007 Dec;92(4):336–45.
374. Kacher Y, Golan A, Pewzner-Jung Y, Futerman AH. Changes in macrophage morphology in a Gaucher disease model are dependent on CTP:phosphocholine cytidyltransferase α . *Blood Cells Mol Dis.* 2007 Jul;39(1):124–9.
375. Trajkovic-Bodennec S, Bodennec J, Futerman AH. Phosphatidylcholine metabolism is altered in a monocyte-derived macrophage model of Gaucher disease but not in lymphocytes. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Jul;33(1):77–82.
376. Lamghari M, Barrias CC, Sá Miranda C, Barbosa MA. Recombinant glucocerebrosidase uptake by Gaucher disease human osteoblast culture model. *Blood Cells Mol Dis.* 2005 Nov;35(3):348–54.
377. Lecourt S, Vanneaux V, Cras A, Freida D, Heraoui D, Herbi L, et al. Bone Marrow Microenvironment in an In Vitro Model of Gaucher Disease: Consequences of Glucocerebrosidase Deficiency. *Stem Cells Dev.* 2012 Jan 20;21(2):239–48.
378. Mucci JM, Scian R, De Francesco PN, García FS, Ceci R, Fossati CA, et al. Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF- α . *Gene.* 2012 Nov;509(1):51–9.
379. Mucci JM, Suqueli García F, de Francesco PN, Ceci R, Di Genaro S, Fossati CA, et al. Uncoupling of osteoblast–osteoclast regulation in a chemical murine model of Gaucher disease. *Gene.* 2013 Dec;532(2):186–91.
380. Pavan E, Ormazabal M, Peruzzo P, Vaena E, Rozenfeld P, Dardis A. CRISPR/Cas9 Editing for Gaucher Disease Modelling. *Int J Mol Sci.* 2020 May 5;21(9):3268.
381. Ormazabal ME, Pavan E, Vaena E, Ferino D, Biasizzo J, Mucci JM, et al. Exploring the Pathophysiologic Cascade Leading to Osteoclastogenic Activation in Gaucher Disease Monocytes Generated via CRISPR/Cas9 Technology. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 7;24(13):11204.
382. Drews K, Calgi MP, Harrison WC, Drews CM, Costa-Pinheiro P, Shaw JJP, et al. Glucosylceramidase Maintains Influenza Virus Infection by Regulating Endocytosis. *J Virol.* 2019 Jun 15;93(12).
383. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007 Nov;131(5):861–72.

384. Messelodi D, Bertuccio SN, Indio V, Strocchi S, Taddia A, Serravalle S, et al. iPSC-Derived Gaucher Macrophages Display Growth Impairment and Activation of Inflammation-Related Cell Death. *Cells*. 2021 Oct 21;10(11):2822.
385. Kanfer JN, Legler G, Sullivan J, Raghavan SS, Mumford RA. The Gaucher mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975 Nov;67(1):85–90.
386. Stephens MC, Bernatsky A, Burachinsky V, Legler G, Kanfer JN. THE GAUCHER MOUSE: DIFFERENTIAL ACTION OF CONDURITOL B EPOXIDE AND REVERSIBILITY OF ITS EFFECTS. *J Neurochem*. 1978 May 12;30(5):1023–7.
387. Tybulewicz VLJ, Tremblay ML, LaMarca, Willemsen R, Stubblefield BK, Winfield S, et al. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature*. 1992 Jun;357(6377):407–10.
388. Sidransky E, Sherer DM, Ginns EI. Gaucher Disease in the Neonate: A Distinct Gaucher Phenotype Is Analogous to a Mouse Model Created by Targeted Disruption of the Glucocerebrosidase Gene. *Pediatr Res*. 1992 Oct;32(4):494–8.
389. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, et al. Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation*. 1994 Apr 1;93(4):1756–64.
390. Willemsen R, Tybulewicz V, Sidransky E, Eliason WK, Martin BM, LaMarca ME, et al. A biochemical and ultrastructural evaluation of the type 2 Gaucher mouse. *Mol Chem Neuropathol*. 1995 Feb;24(2–3):179–92.
391. Liu Y, Suzuki K, Reed JD, Grinberg A, Westphal H, Hoffmann A, et al. Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure (SIMP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Mar 3;95(5):2503–8.
392. Mizukami H, Mi Y, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu Y, et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *Journal of Clinical Investigation*. 2002 May 1;109(9):1215–21.
393. Xu YH, Quinn B, Witte D, Grabowski GA. Viable Mouse Models of Acid β -Glucosidase Deficiency. *Am J Pathol*. 2003 Nov;163(5):2093–101.
394. Enquist IB, Nilsson E, Ooka A, Månsson JE, Olsson K, Ehinger M, et al. Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Sep 12;103(37):13819–24.

- 395. Sinclair GB, Jevon G, Colobong KE, Randall DR, Choy FYM, Clarke LA. Generation of a conditional knockout of murine glucocerebrosidase: Utility for the study of Gaucher disease. *Mol Genet Metab*. 2007 Feb;90(2):148–56.
- 396. Enquist IB, Bianco C Lo, Ooka A, Nilsson E, Månsson JE, Ehinger M, et al. Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Oct 30;104(44):17483–8.
- 397. Xu YH, Reboulet R, Quinn B, Huelsken J, Witte D, Grabowski GA. Dependence of reversibility and progression of mouse neuronopathic Gaucher disease on acid β -glucosidase residual activity levels. *Mol Genet Metab*. 2008 Jun;94(2):190–203.
- 398. Fratzl-Zelman N, Misof BM, Roschger P, Klaushofer K. Classification of osteogenesis imperfecta. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2015 Jul 25;165(13–14):264–70.
- 399. Kim SJ, Lee SM, Choi JM, Jang JH, Kim HG, Kim JT, et al. Genetic Analysis Using a Next Generation Sequencing-Based Gene Panel in Patients With Skeletal Dysplasia: A Single-Center Experience. *Front Genet*. 2021 May 26;12.
- 400. Calder AD. The changing world of skeletal dysplasia. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020 Apr;4(4):253–4.

ANEXOS

OTROS ARTÍCULOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS

Artículo 5

Martínez-Gil N, Patiño-Salazar JD, Rabionet R, Grinberg D, Balcells S. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):29-39, DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.000008

Artículo 6

Martínez-Gil N, Patiño J, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. La variante missense rs2908004 de WNT16 actúa como eQTL de FAM3C en osteoblastos primarios humanos. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral. 2021 Dec;13(4):117-21.

Artículo 7

Martínez-Gil N, Mellibovsky L, Manzano-López González D, Patiño JD, Cozar M, Rabionet R, Grinberg D, Balcells S. On the association between Chiari malformation type 1, bone mineral density and bone related genes. Bone Rep. 2022 Mar 15;16:101181. doi: 10.1016/j.bonr.2022.101181.



Revisión

Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS

Núria Martínez-Gil, Juan David Patiño-Salazar, Raquel Rabionet, Daniel Grinberg, Susanna Balcells

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. CIBERER, IBUB, IRSJD. Barcelona

Resumen

En los últimos años se han dedicado muchos esfuerzos a la determinación de variantes y genes que pueden ser importantes en la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) y, a su vez, en diversas patologías óseas. Para conseguir esto, la aproximación que ha presentado mayores éxitos ha sido la de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS). En particular, en la investigación sobre la biología ósea, se han publicado más de 50 grandes GWAS o metaanálisis de GWAS identificando más de 500 *loci* genéticos asociados con diferentes parámetros óseos como son la DMO, la resistencia ósea y el riesgo de fractura. Si bien el descubrimiento de las variantes asociadas es un aspecto esencial, es igualmente importante la validación funcional de dichas variantes para dilucidar su efecto y la relación causal que tienen con la enfermedad genética. Al tratarse de un aspecto mucho más lento y tedioso, se ha convertido en el nuevo reto de esta era post-GWAS. Entre los genes que ya se han abordado se incluyen varios de la vía de *WNT* y en especial el gen *SOST*, que juega un papel muy importante tanto en la determinación de la DMO poblacional como en enfermedades monogénicas con elevada masa ósea y que ha dado lugar a un nuevo tratamiento contra la osteoporosis. En esta revisión recogemos los principales estudios GWAS con relación a fenotipos del hueso, así como algunos ejemplos de validaciones funcionales para analizar las asociaciones encontradas en los mismos.

Palabras clave:
Estudio de asociación de genoma completo. Validación funcional. Densidad mineral ósea. Patologías óseas.

Recibido: 20/07/2022 • Aceptado: 22/12/2022

Este artículo se somete en cumplimiento del compromiso que se adquirió al obtener la BECA FEIOMM de Investigación 2019 para realizar el proyecto Estudios funcionales de variantes de cambio de sentido del gen *CYP11A1* hallados en pacientes con fractura femoral atípica.

Conflicto de Intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Martínez-Gil N, Patiño-Salazar JD, Rabionet R, Grinberg D, Balcells S. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):29-39

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.000008

Correspondencia:

Susanna Balcells Comas. Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona
sbalcells@ub.edu

©Copyright 2023 SEIOMM y ©Arán Ediciones S.L. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (GWAS)

En los últimos años los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han sido una herramienta esencial para la identificación de genes involucrados en enfermedades complejas (1). Estos estudios consisten en establecer una asociación entre la frecuencia génica o alélica de millones de marcadores tipo SNP (polimorfismos de un único nucleótido; del inglés *single nucleotide polymorphism*) distribuidos a lo largo del genoma y un fenotipo o enfermedad de estudio (2). Esta aproximación representa la herramienta más completa e imparcial para el estudio de enfermedades complejas. A diferencia de los estudios de asociación de genes candidatos, los estudios GWAS son una aproximación sin hipótesis previa, permitiendo el descubrimiento de nuevos genes o vías de señalización implicadas en el fenotipo de estudio que hasta el momento eran totalmente desconocidas (3). El establecimiento de los GWAS ha sido posible gracias a los nuevos avances en tecnología genómica de alto rendimiento, diseño de estudio, análisis estadísticos mejorados y la posibilidad de disponer de grandes biobancos (4,5). Debido al gran número de pruebas estadísticas simultáneas realizadas y, por lo tanto, a las correcciones estadísticas (que requieren un umbral del valor p de 5×10^{-8} para considerarse significativo a nivel de genoma completo y al pequeño efecto que presenta cada variante en las enfermedades complejas, son necesarias cohortes muy grandes. Esto se ha conseguido mediante los metaanálisis de GWAS, donde diferentes estudios se han unido con el objetivo de incrementar el tamaño muestral (6,7).

Aun con el evidente éxito, los estudios GWAS presentan 3 limitaciones cruciales. Primero, las variantes genéticas utilizadas para validar la asociación con el fenotipo concreto son SNP marcadores (en inglés, *tagSNPs*) que se distribuyen homogéneamente por todo el genoma con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) mayor o igual al 5 % en la población. Por lo tanto, las variantes raras con posibles efectos fuertes en el fenotipo no están incluidas en estos estudios. Esta limitación se ha intentado solucionar incluyendo variantes de menor frecuencia en los *chips* de genotipado, secuenciando el exoma o genoma completo (*whole exome/genome sequencing*, WES/WGS) y/o utilizando los extremos fenotípicos de las cohortes. Segundo, el éxito de los estudios GWAS depende en gran manera del tamaño de la muestra. Por esta razón, como se ha comentado, la estrategia más común en la actualidad es establecer grandes consorcios que incluyan diferentes cohortes de todo el mundo. Así, se obtienen supercohortes con mayor poder estadístico, pero genéticamente heterogéneas, de manera que es muy difícil el descubrimiento de variantes específicas de población. Tercero, los GWAS reportan el SNP más relevante estadísticamente, llamado SNP centinela. Aunque este SNP puede ser el SNP causal de la asociación, también lo pueden ser otras variantes que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con la variante centinela. Si el SNP aso-

ciado se encuentra en una región codificante e implica un cambio de aminoácido, hay una alta probabilidad de que el SNP sea causal, pero la realidad es que la mayoría de los SNP centinela se encuentran en regiones no codificantes (96 %), tanto intrónicas (41 %), como intergénicas (54 %), dificultando por tanto la demostración de su papel causal. Debido a su naturaleza no-codificante, realizar estudios funcionales de estos SNP centinelas es un verdadero reto (8-10). Es por esta razón que estos estudios funcionales siguen siendo pocos hasta el momento, y establecer las bases funcionales de las asociaciones encontradas en dichos análisis es la asignatura pendiente de esta era post-GWAS.

Para realizar los estudios de funcionalidad, es necesaria una aproximación interdisciplinar, que va desde los análisis *in silico* (consistentes en aproximaciones computacionales) (11,12), como pueden ser las herramientas predictoras de patogenicidad; pasando por los estudios *in vitro*, que incluyen entre otros, los ensayos de gen reportero (p. ej. luciferasa) (13); hasta los estudios *in vivo* usando modelos animales como el pez cebra o el ratón (14,15).

En esta revisión se presenta de forma sumaria los principales trabajos GWAS que se han reportado utilizando fenotipos óseos y a continuación algunos ejemplos de estudios *in vitro* e *in vivo* que se han generado a raíz del primer gran metaanálisis de GWAS (16) que se realizó sobre densidad mineral ósea (DMO) y riesgo de fractura.

GWAS Y HUESO

Para realizar GWAS de enfermedades óseas y principalmente de la osteoporosis, se pueden tener en cuenta parámetros como la DMO, la geometría y la microarquitectura del hueso. De estas propiedades, la más utilizada y la que mejor predice la fractura osteoporótica es la DMO, que es un rasgo cuantitativo que se mide en una escala continua por métodos como la absorciometría dual de rayos X (DXA por sus siglas en inglés). Se estima que la DMO es un rasgo con una heredabilidad aproximada de 50-80 %. Asimismo, la geometría del hueso muestra una heredabilidad de entre 30-70 %, y la microarquitectura ósea determinada por tomografía computarizada de alta resolución (HR-pQCT) una heredabilidad entre 20-80 % (17).

Hasta el momento, se han realizado más de 50 grandes estudios GWAS utilizando parámetros óseos, junto con una plétora de estudios de asociación en cohortes más pequeñas y homogéneas. Con esto, se han identificado más de 500 *loci* asociados. Aunque el porcentaje de varianza explicado a través de los GWAS ha incrementado sustancialmente en los últimos años al usar cohortes de mayor tamaño, todos estos *loci* solamente explican una pequeña proporción (20 %) de la contribución genética a la DMO (18,19). Esto ha llevado a que exista una diferencia entre la variabilidad explicada por factores

genéticos y la heredabilidad de la DMO, debido, posiblemente, a una sobreestimación de la heredabilidad o a que no se están considerando otros factores genéticos como son las variantes de número de copias (en inglés *copy number variants*, CNV) o la epigenética (20).

Con todo, estos estudios GWAS han dado lugar a hallazgos importantes, como la confirmación de las asociaciones de genes como *SOST* y *LRP5* (que ya habían estado implicados en enfermedades monogénicas esqueléticas) con algunos fenotipos óseos, o la identificación de nuevos genes de los que no se conocía su implicación en hueso (21). En la tabla I se presentan algunos de los estudios GWAS más relevantes relacionados con la DMO, la mayoría de los cuales están reportados en el *GWAS catalog* (<http://ebi.ac.uk/gwas>). Para acotar, solo se han considerado estudios de cohortes de más de 10 000 individuos.

Muchos de los estudios GWAS presentados en la tabla I corresponden a trabajos en los que se han realizado metaanálisis grandes que han dejado como resultado cientos de variantes en diferentes loci asociadas con fenotipos óseos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios carecen de aproximaciones funcionales.

ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA ERA POST-GWAS

A pesar de la gran cantidad de estudios de asociación realizados hasta ahora, los estudios funcionales no han tenido el mismo desarrollo. De los 1051 artículos que han citado al primer gran metaanálisis de GWAS sobre hueso (16), solo una pequeña fracción incluye estudios funcionales (164, es decir, 15 %), ya sean *in vitro* o *in vivo*.

Un ejemplo de éxito en los estudios funcionales es la caracterización de la regulación de *SOST*. Este gen codifica la proteína esclerostina, un inhibidor de la vía canónica de *WNT* (49-51), que se ha encontrado asociado a multitud de parámetros óseos en diferentes estudios de asociación en distintas poblaciones (17,28,33,38,40,43,52,53) (Fig. 1A). Su función inhibidora sobre la formación ósea ha sido ampliamente estudiada mediante modelos *in vivo* e *in vitro*, y en la actualidad se utilizan anticuerpos antiesclerostina como terapia en enfermedades óseas, como son la osteoporosis o la osteogénesis imperfecta (54-59). Es por esto, que los factores reguladores de la expresión del gen se incluyen entre los nuevos candidatos como diana para el desarrollo de nuevas terapias. En humanos, variantes en el gen *SOST* han sido asociadas a condiciones caracterizadas por un exceso de formación ósea: esclerosteosis, displasia craneodifisaria, y el fenotipo de alta masa ósea (60) (Fig. 1B). Junto con estas, también se encuentra la enfermedad de van Buchem causada por la delección de la región reguladora denominada ECR5 situada a 52 kb cascada abajo del gen, que es necesaria

para la correcta expresión de *SOST* (61) (Fig. 1A). En realidad, la transcripción de *SOST* está finamente regulada por un gran número de señales, tanto a través de la regulación directa sobre el promotor de *SOST* como a través de la región reguladora distal ECR5 (62,63), cuya interacción física se ha demostrado en un estudio reciente de nuestro grupo realizado en células óseas (64) (Fig. 1A). El factor de transcripción *MEF2C* es el regulador de *SOST* mejor descrito en relación con su expresión en osteocitos (63,65). La importancia de *MEF2C* en el efecto potenciador de ECR5 ha sido confirmada con el modelo de ratón KO (*knockout*) de *MeF2c* en osteoblastos/osteocitos, que presenta alta masa ósea y bajos niveles de esclerostina (66). Precisamente, *MEF2C* es otra de las señales más repetidas en los estudios GWAS con parámetros óseos (16,23,36,37,67-70). Junto con *MEF2C*, también se ha descrito *HDAC5*, un regulador negativo de la expresión de *SOST* que ejerce su función bloqueando la unión de *MEF2C* a ECR5 durante la diferenciación de los osteocitos inmaduros (Fig. 1C). En consonancia con esto, el modelo de ratón KO de *HDAC4/5* muestra una baja DMO y una alta expresión de *SOST* (71-73). De nuevo *HDAC4/5* se encuentra dentro de los loci más repetidos en los estudios de asociación con parámetros óseos (18,23,34,39,74) (Fig. 1B).

Otro ejemplo de la importancia de realizar estudios funcionales de las regiones asociadas es el locus de *DKK1*. *DKK1* es otro inhibidor de la vía canónica de *WNT*, con un papel muy importante en la morfogénesis de la cabeza (75,76), y en el desarrollo del hueso (77,78). En la actualidad no hay ninguna variante en *DKK1* descrita causante de ninguna patología ósea en la base de datos HGMD. A pesar de esto, nuestro grupo ha identificado dos variantes de cambio de aminoácido (*missense*) en pacientes con el fenotipo de DMO alta, que muestran una pérdida de función de su capacidad inhibitoria (13,79). De manera contraria, una de estas variantes también se ha encontrado en pacientes con fenotipos totalmente opuestos como la osteoporosis o malformaciones anales (80,81). Además, es interesante resaltar que no se han encontrado SNP en *DKK1* asociados con la DMO o con diferentes parámetros óseos entre los diferentes GWAS. En cambio, sí se ha demostrado asociación con la DMO de un conjunto de SNP agrupados en una región a 350 kb cascada abajo de *DKK1* y a 92 kb cascada arriba de *MBL2* (16,18,19,29,33,34,36,37,39,74) (Fig. 2). Para tratar de distinguir cuál de estos dos genes era el responsable de esta asociación, en un trabajo de nuestro grupo (13), se realizó un ensayo de conformación de la cromatina 4C utilizando la región rica en señales GWAS como anzuelo en tres tipos celulares óseos. Con esto se pudo confirmar la interacción física entre esta región y el promotor de *DKK1* y descartar la interacción con el gen *MBL2* (Fig. 2, panel inferior). Precisamente, en esta región se encuentra el gen *LNCAROD* que especifica un ARN largo no codificante (en inglés, *long noncoding RNA*, lncRNA) activador de *DKK1* que, por lo tanto, es el posible responsable de la asociación de los estudios GWAS (82).

Estudio	Ancestría	Rasgo	Tamaño muestral	Loci genes más relevantes	Loci nuevos/ loci totales
Syrkandottir <i>et al.</i> , 2009 (22)	Europea	DMO-CL, DMO-CE, FO	15 375	MARK3, SOST, SP7 (<i>testis</i>)	4/9
Rivadeneira <i>et al.</i> , 2009 (23)	Europea	DMO-CL, DMO-CE	19 195	WLS, CNNB1, MEPE, STARD3NL, FLJ42280, DCDC3, SORL1, HDAC5, CHH1, MEFC2	13/20
Guo <i>et al.</i> , 2010 (24)	Asiática	DMO-CT	11 568	ALDH7A1	1/1
Kung <i>et al.</i> , 2010 (25)	Europea	DMO-CL, DMO-CE, FO	18 898	JAG1	1/1
Hsu <i>et al.</i> , 2010 (26)	Europea	DMO-CL, DMO-CE, CT-AE, AEC, LCF	11 290	RAP1A, TBC1D8, OSBP1A	3/4
Estrada <i>et al.</i> , 2012 (16)	Europea y asiática	DMO-CL, DMO-CE, FO	83 894	CDKAL1, SORL1, WNT16, MIR200C1, AXIN1, RPS6K45, ERCC1, WNT5B, FAM210A, FAM98KAL1, SORL1, KLDSC1, PTHLH, IDUA, NIDAN1, SFRP4, SUT3H, RUNX2	32/56
Syrkandottir <i>et al.</i> , 2013 (27)	Europea	DMO-CL, DMO-CuT, DMO-C, FO	97 315	LGR4	1/2
Zhang <i>et al.</i> , 2014 (28)	Europea, asiática y afroamericana	DMO-CL, DMO-CE, DMO-CT	27 061	SMO1, CLDN14	2/15
Moayyeri <i>et al.</i> , 2014 (29)	Europea, asiática y norteamericana	AUBA, VS, DMO-T	59 242	TNFRSF35	1/7
Zheng <i>et al.</i> , 2015 (30)	Europea	DMO-CL, DMO-CE, DMO-A, FO	561 489	ENH1	1/96
Syrkandottir <i>et al.</i> , 2016 (31)	Europea y asiática	DMO-CL, DMO-C, FO	30 191	PTCH1	1/14
Nelson <i>et al.</i> , 2016 (32)	Europea y norteamericana	DMO-CL, FVC, FVR	42 869	SLC1A3/RANBP2L	1/5
Mullin <i>et al.</i> , 2017 (33)	Europea	AUBA, VS, FO	16 627	PPP1R3B, LOC387810, SEPT5, TBC1	3/8
Kemp <i>et al.</i> , 2017 (34)	Europea	DMOe-T, FO	142 487	ARID1A, PKN2, TBC15, NCE1, SUSD5, ERCC2, BMP2, PLXNC2, BMP5, MEK2, CRBB5, AQP1, CADM1, EMP1, NFR1C1, TMEM42, GPC5, BMP4, SMAD3, BMP2, AXIN2	153/203
den Hollander <i>et al.</i> , 2017 (35)	Europea y norteamericana	MBSM, OA	12 784	MGP, CDC391	2/5
Medina-Gomez <i>et al.</i> , 2018 (36)	Europea, afroamericana y australiana	DMO-CuT	66 628	S, CBAT, PLCL1, SMAD9, ADAMTS, TOM1L2, TCF1, APC, DUSP5, CD44, COND1, CYP19A1, MAIB, RUNX1, RAI1, ZSCAN25, GRI10, DRG2, ETS2, PSMD13, CSF1	36/80
Pei <i>et al.</i> , 2018 (37)	Europea, asiática, afroamericana e hispana	DMO-CL, DMO-CE	40 449	MACROD2, OSBP1A	2/9
Alonso <i>et al.</i> , 2018 (38)	Europea y australiana	FVC	10 683	2q13	1/1
S. K. Kim 2018 (39)	Europea	DMOe-T, FO	394 929	RPL1, PRSS55, MAPT, GRATCH1, SMG6, WNT1, WNT5B	613/899
Tajanowski <i>et al.</i> , 2018 (19)	Europea, norteamericana, asiática y australiana	FO	562 258	GRB10C, CBL, ETS2, RSP03	4/15

(Continúa en página siguiente)

Tabla 1 (Cont.). Estudios GWAS sobre hueso y genes encontrados con variantes asociadas a fenotipos óseos

Estudio	Ancestría	Rasgo	Tamaño muestral	Loci/genes más relevantes	Loci nuevos/ loci totales
Baird et al., 2019 (40)	Europea, norteamericana y australiana	ARX-MC	15 934	ASTN2, PRHL1, NKX3-2, FGF84, GSC/DIGR1, JHBP	6/8
Hsu et al., 2019 (41)	Europea, norteamericana y asiática	LCF, AE, AEC, SMCf	18 719	IRX1/ADAMTS167	1/4
Morris et al., 2019 (18)	Europea	DMOe-T FO	426 824	DAAM2, WHIT28, WNT28, COL11A1, SERPINC1, PKDCE, HDAC4, HOOK11, BC11A, SOX5, TGFBR3, MMP16, EPHA4, MSH5, SEPT11, LORC1, ADH18, CTSP1, DNMT3A, MEK1	301/518
Pei et al., 2019 (42)	Europea, norteamericana y australiana	DMO-T, DMO-C+T	209 115	FBN2, DEFB, TNFRSF19, NEZL1, SCMH1	18/56
Szykanskiottir et al., 2019 (43)	Europea y asiática	DMO-C-, DMO-CL-AH, FO	28 954	GDF5, ADAMTS13, BCKDH8, CHHD2, DYK, CTDSP2	6/13
Zheng et al., 2019 (44)	Europea, norteamericana y australiana	DMO-G-, DMOe-UT	10 584	BAGLAN2, GALNT1	2/3
Feng et al., 2020 (45)	Europea, norteamericana, afroamericana, asiática e hispana	DMO-C-, MMT, DMOe-T	11 335	MK2R	1/2
Zhang et al., 2020 (46)	Europea, norteamericana, afroamericana, asiática e hispana	DMO-G-, MMCBP	12 445	FTO, PPP1CB, TRMT61B, LSAMP, BAM189A2, LOC101928063	6/26
Surakka et al., 2020 (47)	Europea	DMO-A	19 705	KGF2, ZNF423, SIPA1, PED40, PGIN, TRAIEIIP2, NFIB, LYSDM4, MAM2	0/10
Greenbaum et al., 2022 (48)	Europea, afroamericana, norteamericana y australiana	DMO-G-, DMO-CL	49 487		9/30
El estudio está representado por el primer autor y el año. Los genes son aquellos más relevantes en el estudio por su asociación con fenotipos óseos y por la novedad de su hallazgo. AE: antebrazo; AE: ángulo del codo; AEC: ancho del estrecho del cuello; ARX/MC: absorbometría de rayos X-modos derivados de la forma de la cadera; ALBA: atenuación de ultrasonido de banda ancha; C: cadera; CF: cuello femoral; CL: columna lumbar; CL-AH: columna lumbar-área del hueso; CF: cadera total; CuT: cuerpo total; DMO: densidad mineral ósea; DMO e densidad mineral ósea estimada; FO: fractura osteoporótica; FVC: fractura vertebral clínica; FW: fractura vertebral radiográfica; LCF: longitud de cuello femoral; MBS M: medida bilateral semicuantitativa de mano; MMC BP: masa magra corporal de brazos y piernas; MMT: masa magra corporal de brazos y piernas; MMT: masa magra corporal de brazos y piernas; OAI: osteoartritis; SMCf: sección modular del cuello femoral; T: talón; TO: tamaño óseo; UT: ultrasonido de talón; VS: velocidad de sonido.					

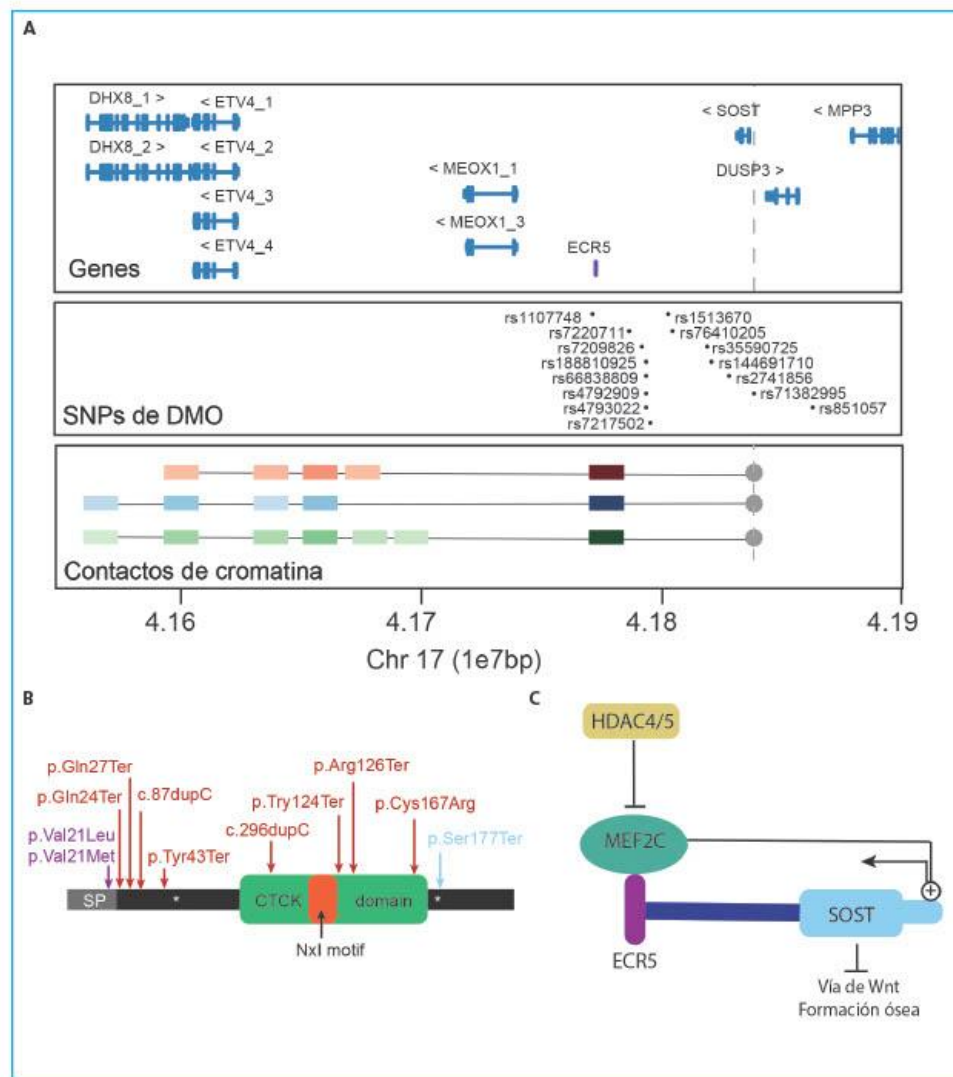


Figura 1. *SOST*. A. Panel superior: Locus que contiene *SOST* y sus genes vecinos (GRC37/hg19). En lila, la región reguladora ECR5. Panel central: SNP asociados con diferentes parámetros óseos en diferentes estudios GWAS, extraídos de *GWAS catalog* (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Panel inferior: Resultados principales del ensayo 4C de Martínez-Gil et al. 2021, donde se representan las principales interacciones entre el promotor de *SOST* (usado como anzuelo e indicado con un punto y una línea discontinua gris). Los cuadrados de colores representan las interacciones con la intensidad de color proporcional a la intensidad de la interacción. Los cuadrados rojos representan las interacciones en células madre mesenquimales, en azul las interacciones de las células hFOB y en verde las interacciones de las células Saos2. Las unidades de la escala genómica utilizada (1e7pb) corresponden a 10 Megabases (1x10⁷ pares de bases). B. Representación esquemática de la proteína esderostina señalando sus dominios funcionales y las variantes descritas causantes de enfermedades esqueléticas humanas. En lila las variantes asociadas a displasia craneodifisaria, en rojo asociadas a esderosteosis y en azul la variante asociada al fenotipo de alta masa ósea. CTCK: C-terminal cysteine knot-like. C. Esquema de algunos de los reguladores positivos y negativos de la expresión de *SOST*.

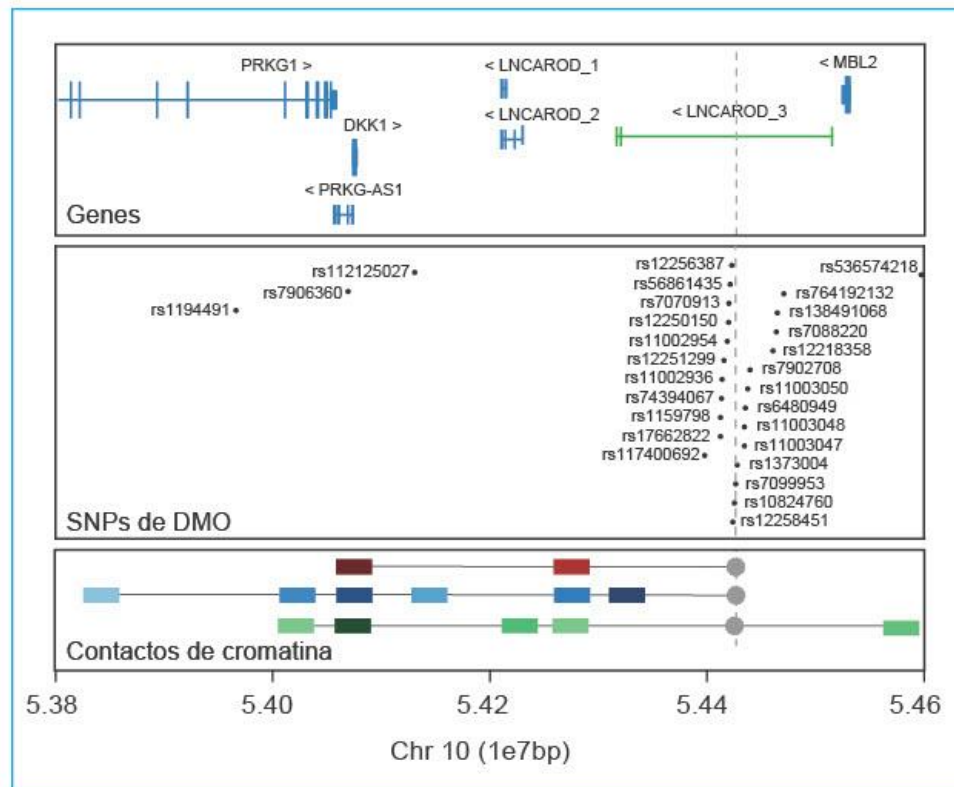


Figura 2. DKK1. Panel superior: locus que contiene *DKK1* y sus genes vecinos (GRC37/hg19). En verde, el lncRNA *LNCAROD* de GENCODE v32.2 (GRC38/hg18). Panel central: SNP asociados con diferentes parámetros óseos en diferentes estudios GWAS, extraídos del GWAS catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas7>). Panel inferior: Resultados principales del ensayo 4C de Martínez-Gil et al. 2020, donde se representan las principales interacciones con la región rica en SNP asociados a DMO (usado como anzuelo e indicado con un punto y una línea discontinua gris). Los cuadrados de colores representan las interacciones con la intensidad de color proporcional a la intensidad de la interacción. Los cuadrados rojos representan las interacciones en células madre mesenquimales, en azul las interacciones de las células hFOB y en verde las interacciones de las células Saos2. Las unidades de la escala genómica utilizada (1e7pb) corresponden a 10 megabases (1×10^7 pares de bases).

Uno de los *loci* más consistentes entre distintos GWAS sobre la DMO es la región genómica situada en 7q31.31 que incluye el gen *WNT16*. Se trata de un *locus* muy complejo que incluye, además de *WNT16*, los genes vecinos *ING3*, *FAM3C* y *CPED1*. El papel de *WNT16* sobre la determinación de la DMO ha sido claramente establecido en estudios funcionales de modelos de ratón KO o KO condicional específico de osteoblasto (6,83,84), que a grandes rasgos coinciden en mostrar fracturas espontáneas debidas a una baja DMO, junto con un grosor cortical y la resistencia ósea reducidos.

Sin embargo, también se han encontrado pruebas sobre la importancia de los otros tres genes vecinos en el metabolismo óseo. En el caso de *ING3* (*Inhibitor Of Growth Family Member 3*), que forma parte del complejo NuA4 histona acetiltransferasa (HAT) implicado en funciones de regulación de la cromatina, se ha determinado que se expresa abundantemente en el tejido óseo (85) y los estudios funcionales en un modelo celular *in vitro* de células mesenquimales KO para *ING3* muestran afectación de la osteoblastogénesis y una estimulación de la diferenciación adipogénica (86).

Para *CPED1* (*Cadherin Like And PC-Esterase Domain Containing 1*), no se conoce la función concreta ni en humanos ni en ratón. Sin embargo, en ratón, los estudios funcionales muestran que *Cped1* se encuentra uniformemente expresado en una variedad de tejidos, incluido el óseo y se han descrito diferentes isoformas debidas a empalmes (*splicing*) alternativos, así como tres regiones promotoras activas durante la diferenciación osteogénica (87). Para acabar de definir su posible rol en la homeostasis ósea, faltarían estudios funcionales adicionales, en modelos celulares *in vitro* o en modelos animales. *FAM3C* (*Family of sequence similarity 3c*) es un factor de crecimiento tipo citocina expresado en multitud de tejidos (88), que juega un papel muy importante en la transición epitelio-mesénquima y en la metástasis del cáncer (89). Su relación con el metabolismo óseo se ha confirmado con el modelo de ratón KO que presenta alteraciones en la estructura ósea (88).

Se han realizado algunos estudios funcionales que abordan la regulación de la expresión de los distintos genes de esta región. Por ejemplo, nuestro grupo ha llevado a cabo estudios de eQTL (del inglés *expression Quantitative Trait Locus*) en osteoblastos primarios que demuestran que SNP situados dentro del gen *WNT16* son reguladores de los niveles de expresión de *FAM3C* en esas células (90). También hemos visto, en células del linaje osteoblástico, que se da una interacción física entre varios potenciadores génicos (*enhancers*) situados dentro del gen *CPED1* y el promotor de *WNT16* (91). Todo ello ilustra una compleja relación entre estos cuatro genes y sugiere la posibilidad de que se dé una sinergia entre ellos. Con todo, queda clara la necesidad de estudios funcionales adicionales que acaben de definir el papel de cada uno de ellos y sus interacciones.

Los trabajos aquí citados evidencian la importancia que tienen los estudios funcionales a partir de los descubrimientos que traen consigo los análisis de GWAS y ponen en el horizonte el reto, en la era post-GWAS, de continuar encontrando correlaciones entre las variantes que se derivan de los estudios de GWAS y los aspectos funcionales de esas variantes, bien sea *in silico*, *in vitro* o *in vivo*, buscando con ello nuevas aproximaciones que puedan dar luces y opciones terapéuticas para las patologías asociadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Lichou F, Gosia T. Functional studies of GWAS variants are gaining momentum. *Nat Commun* 2020;11(1):6283. DOI: 10.1038/s41467-020-20188-y
- Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363(2):166-76. DOI: 10.1056/NEJMr0905980
- Cannon ME, Karen LM. Deciphering the emerging complexities of molecular mechanisms at GWAS loci. *Am J Hum Genet* 2018;103(5):637-53. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.10.001
- Vissecher PV, Wray N, Zhang Q, Sklar P, McCarthy M, Brown M, et al. 10 Years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet* 2017;101(1):5-22. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005
- Buniello A, MacArthur J, Cerezo M, Harris L, Hayhurst J, Malan-gone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1005-12. DOI: 10.1093/nar/gky1120
- Medina-Gomez C, Kemp J, Estrada K, Eriksson J, Liu J, Reppe S, et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the *WNT16* locus. *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002718. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002718
- Loic Y, Sidorenko J, Kemper K, Zheng Z, Wood A, Weedon M, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~70000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet* 2018;27(20):3641-9. DOI: 10.1093/hmg/ddy271
- Tam Y, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2019;20(8):467-84. DOI: 10.1038/s41576-019-0127-1
- Hirschhorn JN. Genomewide association studies—illuminating biologic pathways. *N Engl J Med* 2009;360(17):1699-701. DOI: 10.1056/NEJMp0808934
- Klein RJ, Xing X, Mukherjee S, Willis J, Hayes J. Successes of genome-wide association studies. *Cell* 2010;142(3):350-1.
- Schaid DJ, Chen W, Larson NB. From Genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat Rev Genet* 2018;19(8):491-504.
- Broekema RV, Bakker OB, Jonkers IH. A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era. *Open Biol* 2020;10(1):190221. DOI: 10.1098/rsob.190221
- Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Atalay N, Pineda-Moncusi M, García-Giralt N, Van Hul W, et al. Functional assessment of coding and regulatory variants from the *DKK1* locus. *JBM plus* 2020;4(12):e10423. DOI: 10.1002/jbm4.10423
- Schartl M. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Dis Model Mech* 2014;7(2):181-92. DOI: 10.1242/dmm.012245
- Rao S, Yao Y, Bauer DE. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation. *Genome Med* 2021;13(1):41. DOI: 10.1186/s13073-021-00857-3
- Estrada K, Styrkarsdóttir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44(5):491-501. DOI: 10.1038/ng.2249
- Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone* 2019;126:2-10.
- Morris JA, Kemp JA, Youten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet* 2019;51(2):258-66.
- Trajanoska K, Morris JA, Oei L, Zheng H-F, Evans DM, Kiel DP, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ* 2018;362:k3225. DOI: 10.1016/j.bone.2019.04.005
- García-Ibarbia C, Delgado-Calle J, Casafont I, Velasco J, Arozamena J, Pérez-Núñez M, et al. Contribution of genetic and epi-

- genetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene* 2013;532(2):165-72. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.080
21. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, et al. LRP4 third β -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1856-68. DOI: 10.1093/hmg/ddt578
 22. Styrkarsdóttir U, Halldórsson BV, Gretarsdóttir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41(1):15-7. DOI: 10.1038/ng.284
 23. Rivadeneira F, Styrkarsdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu Y-H, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2009;41(11):1199-206. DOI: 10.1038/ng.446
 24. Guo Y, Tan L-J, Lei S-F, Yang T-L, Chen X-D, Zhang F, et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet* 2010;6(1):e1000806. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000806
 25. Kung AW, Xiao SM, Cherny S, Li GH, Gao Y, Tso G, et al. Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *Am J Hum Genet* 2010;86(2):229-39. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.12.014
 26. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, et al. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet* 2010;6(6):e1000977. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000977
 27. Styrkarsdóttir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Aslaug J, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature* 2013;497(7450):517-20. DOI: 10.1038/nature12124
 28. Zhang L, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei Y-F, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1923-33. DOI: 10.1093/hmg/ddt575
 29. Moayyeri A, Hsu Y-H, Karasik D, Estrada K, Xiao S-M, Nielson C, et al. Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GEFOS consortium. *Hum Mol Genet* 2014;23(11):3054-68. DOI: 10.1093/hmg/ddt675
 30. Zheng H-F, Forgetta V, Hsu Y-H, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature* 2015;526(7571):112-7. DOI: 10.1038/nature14878
 31. Styrkarsdóttir U, Thorleifsson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Center JR, Hun Lee S, et al. Sequence variants in the PTCH1 gene associate with spine bone mineral density and osteoporotic fractures. *Nat Commun* 2016;7:10129. DOI: 10.1038/ncomms10129
 32. Nielson C, Liu C-T, Smith AV, Ackert-Bicknell C, Reppe S, Jakobsdóttir J, et al. Novel genetic variants associated with increased vertebral volumetric BMD, reduced vertebral fracture risk, and increased expression of SLC1A3 and EPHB2. *J Bone Miner Res* 2016;31(12):2085-97. DOI: 10.1002/jbmr.2913
 33. Mullin BH, Zhao JH, Brown SJ, Perry J, Luan J, Zheng H-F, et al. Genome-wide association study meta-analysis for quantitative ultrasound parameters of bone identifies five novel loci for broadband ultrasound attenuation. *Hum Mol Genet* 2017;26(14):2791-802. DOI: 10.1093/hmg/ddx174
 34. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet* 2017;49(10):1468-75. DOI: 10.1038/ng.3949
 35. Hollander W, Boer CG, Hart DJ, Yau MS, Ramos Y, Metrustry S, et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for matrix Gla protein in osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis* 2017;76(12):2046-53. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-211214
 36. 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. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.12.005
 37. Pei Y-F, Hu W-Z, Yan M-W, Li C-W, Liu L, Yang X-L, et al. Joint study of two genome-wide association meta-analyses identified 20p12.1 and 20q13.33 for bone mineral density. *Bone* 2018;110:378-85. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.027
 38. Alonso N, Estrada K, Albagha OME, Herrera L, Reppe S, Olstad OK, et al. Identification of a novel locus on chromosome 2q13, which predisposes to clinical vertebral fractures independently of bone density. *Ann Rheum Dis* 2018;77(3):378-85. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-212469
 39. Kim SK. Identification of 613 new loci associated with heel bone mineral density and a polygenic risk score for bone mineral density, osteoporosis and fracture. *PLoS One* 2018;13(7):e0200785. DOI: 10.1371/journal.pone.0200785
 40. Baird DA, Evans DS, Kamanu FK, Gregory JS, Saunders FR, Giuraniuc CV, et al. Identification of novel loci associated with hip shape: a meta-analysis of genome wide association studies. *J Bone Miner Res* 2019;34(2):241-51. DOI: 10.1002/jbmr.3605
 41. Hsu Y-H, Estrada K, Evangelou E, Ackert-Bicknell C, Akesson K, Beck T, et al. Meta-analysis of genomewide association studies reveals genetic variants for hip bone geometry. *J Bone Miner Res* 2019;34(7):1284-96. DOI: 10.1002/jbmr.3698
 42. Pei YF, Liu L, Liu TL, Yang XL, Zhang H, Wei XT, et al. Joint association analysis identified 18 new loci for bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2019;34(6):1086-94. DOI: 10.1002/jbmr.3681
 43. Styrkarsdóttir U, Stefansson OA, Gunnarsdóttir K, Thorleifsson G, Lund SH, Stefansdóttir L, et al. GWAS of bone size yields twelve loci that also affect height, BMD, osteoarthritis or fractures. *Nat Commun* 2019;10(1):2054.
 44. Zheng J, Maerz W, Gergei I, Kleber M, Drechsler C, Wanner C, et al. Mendelian randomization analysis reveals a causal influence of circulating sclerostin levels on bone mineral density and fractures. *J Bone Miner Res* 2019;34(10):1824-36. DOI: 10.1038/s41467-019-09860-0
 45. Feng GJ, Wei XT, Zhang H, Yang XL, Shen H, Tian Q, et al. Identification of pleiotropic loci underlying hip bone mineral density and trunk lean mass. *J Hum Genet* 2020;66(3):251-60. DOI: 10.1038/s10038-020-00835-4
 46. Zhang YX, Zhang SS, Ran S, Liu Y, Zhang H, Yang XL, et al. Three pleiotropic loci associated with bone mineral density and lean body mass. *Mol Genet Genomics* 2020;296(1):55-65. DOI: 10.1007/s00438-020-01724-3

47. Surakka I, Fritsche LG, Zhou W, Backman J, Kosmicki JA, Lu H, et al. MEPE loss-of-function variant associates with decreased bone mineral density and increased fracture risk. *Nat Commun* 2020;11(1):4093. DOI: 10.1038/s41467-020-17315-0
48. Greenbaum J, Su KJ, Zhang X, Liu Y, Liu A, Zhao LJ, et al. A multiethnic whole genome sequencing study to identify novel loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet* 2022;31(7):1067-81. DOI: 10.1093/hmg/ddab305
49. 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. DOI: 10.1074/jbc.M110.190330
50. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One* 2009;4(11):e7930. DOI: 10.1371/journal.pone.0007930
51. Chang M-K, Kramer I, Huber T, Kinzel B, Guth-Gundel S, Leupin O, et al. Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(48):E5187-195. DOI: 10.1073/pnas.1413828111
52. Wang R, Zhao P, Kong N, Lu R, Pei Y, Huang C, et al. Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes* 2018;22;9(1):54. DOI: 10.3390/genes9010054
53. Velázquez-Cruz R, Jiménez-Ortega RF, Parra-Torres AY, Castillejos-López M, Patiño N, Quiterio M, et al. Analysis of association of MEF2C, SOST and JAG1 genes with bone mineral density in Mexican-Mestizo postmenopausal women. *BMC Musculoskelet Disord* 2014;15:400. DOI: 10.1186/1471-2474-15-400
54. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2016;375(16):1532-43. DOI: 10.1056/NEJMoa1607948
55. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014;370(5):412-20. DOI: 10.1056/NEJMoa1305224
56. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, et al. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blososumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2015;30(2):216-24. DOI: 10.1002/jbmr.2351
57. Langdahl BL, Libanati C, Crittenden DB, Bolognese MA, Brown JP, et al. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) versus teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis transitioning from oral bisphosphonate therapy: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390(10102):1585-94. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31613-6
58. Glorieux FH, Devogelaer JP, Durigova M, Goemaere S, Hemsley S, Jakob F, et al. BPS804 anti-sclerostin antibody in adults with moderate osteogenesis imperfecta: results of a randomized phase 2a trial. *J Bone Miner Res* 2017;32(7):1496-504. DOI: 10.1002/jbmr.3143
59. Lewiecki M, Blicharski T, Goemaere S, Lippuner K, Meisner PD, Miller PD, et al. A phase III randomized placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety of romosozumab in men with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103(9):3183-93. DOI: 10.1210/jc.2017-02163
60. Martínez-Gil N, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. Wnt pathway extracellular components and their essential roles in bone homeostasis. *Genes (Basel)* 2022;13(1):138. DOI: 10.3390/genes13010138
61. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 2002;39(2):91-7. DOI: 10.1136/jmg.39.2.91
62. Sebastian A, Loots GG. Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models. *Metabolism* 2018;80:38-47. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.10.005
63. Collette NM, Genetos DC, Economides AN, Xie L, Shahnazari M, Yao W, et al. Targeted deletion of Sost distal enhancer increases bone formation and bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(35):14092-7. DOI: 10.1073/pnas.1207188109
64. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Cozar M, García-Giralt N, Ovejero D, Nogués X, et al. Genetics and genomics of SOST: functional analysis of variants and genomic regulation in osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2021;22(2):489. DOI: 10.3390/ijms22020489
65. Loots G, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 2005;15(7):928-35. DOI: 10.1101/gr.3437105
66. Kramer I, Baertschi S, Halleux C, Keller H, Kneissel M. Mef2c deletion in osteocytes results in increased bone mass. *J Bone Miner Res* 2012;27(2):360-73. DOI: 10.1002/jbmr.1492
67. Duncan E, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 2011;7(4):e1001372. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk
68. Pei YF, Hu WZ, Hai R, Wang XY, Ran S, Lin Y, et al. Genome-wide association meta-analyses identified 1q43 and 2q32.2 for hip Ward's triangle areal bone mineral density. *Bone* 2016;91:1-10. DOI: 10.1016/j.bone.2016.07.004
69. Zheng HF, Duncan EL, Yerges-Armstrong LM, Eriksson J, Bergström U, Leo PJ, et al. Meta-analysis of genome-wide studies identifies MEF2C SNPs associated with bone mineral density at forearm. *J Med Genet* 2013;50(7):473-8. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101287
70. Gregson CL, Newell F, Leo PJ, Clark GR, Paternoster L, Marshall M, et al. Genome-wide association study of extreme high bone mass: contribution of common genetic variation to extreme BMD phenotypes and potential novel BMD-associated genes. *Bone* 2018;114:62-71. DOI: 10.1016/j.bone.2018.06.001
71. Baertschi S, Baur N, Lueders-Lefevre V, Voshol J, Keller H. Class I and IIa histone deacetylases have opposite effects on sclerostin gene regulation. *J Biol Chem* 2014;289(36):24995-5009. DOI: 10.1074/jbc.M114.564997
72. Kobayashi Y, Uehara S, Koide M. Regulations of osteoclast formation and function by Wnt signals. *Clin Calcium* 2019;29(3):309-15. DOI: 10.20837/4201903309
73. Wein M, Fretwurst T, Nahles S, Dutenhoefer F, Tomakidi P, Steinberg T, et al. Pilot investigation of the molecular discrimination of human osteoblasts from different bone entities. *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43(8):1487-93. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.07.030
74. Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, Gazal S, Burch K, Freund MK, et al. Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am J Hum Genet* 2019;104(1):65-75.

75. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116(13):2627-34. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.07.030
76. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391(6665):357-62. DOI: 10.1038/34848
77. Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK, Osteoporosis-Pseudoglioma Collaborative Group. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;77(5):741-53. DOI: 10.1086/497706
78. Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Pters E, Caussin E, Van Hul W. 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* 2007;22(5):708-16. DOI: 10.1359/jbmr.070211
79. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giralt N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep* 2018;8(1):10951. DOI: 10.1038/s41598-018-29242-8
80. Korvala J, Löija M, Mäkitie O, Sochett E, Jüppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet* 2012;55(10):515-9. DOI: 10.1016/j.ejmg.2012.06.011
81. van de Putte R, Wijers CH, de Blaauw I, Feitz WF, Marcelis CL, Hakobjan M, et al. Sequencing of the DKK1 gene in patients with anorectal malformations and hypospadias. *Eur J Pediatr* 2015;174(5):583-7. DOI: 10.1007/s00431-014-2436-x
82. Ntini E, Louloupis A, Liz J, Muino JM, Marsico A, Vang-Ørom UA. Long ncRNA A-ROD activates its target gene DKK1 at its release from chromatin. *Nat Commun* 2018;9(1):1636. DOI: 10.1038/s41467-018-04100-3
83. Zheng H-F, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Pateroster L, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002745. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002745
84. Movérare-Skrtic S, Henning P, Liu X, Nagano K, Saito H, Börjeson AE, et al. Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nat Med* 2014;20(11):1279-88. DOI: 10.1038/nm.3654
85. Nabbi A, Almami A, Thakur S, Suzuki K, Boland D, Bismar TA, et al. ING3 protein expression profiling in normal human tissues suggest its role in cellular growth and self-renewal. *Eur J Cell Biol* 2015;94(5):214-22. DOI: 10.1016/j.ejcb.2015.03.002
86. Chesá A, Wagley Y, Johnson ME, Manduchi E, Su Ch, Lu S, et al. Genome-scale capture C promoter interactions implicate effector genes at GWAS loci for bone mineral density. *Nat Commun* 2019;10(1):1260. DOI: 10.1038/s41467-019-09302-x
87. Maynard RD, Godfrey DA, Medina-Gomez C, Ackert-Bicknell CL. Characterization of expression and alternative splicing of the gene cadherin-like and PC esterase domain containing 1 (Cped1). *Gene* 2018;674:127-33. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.060
88. Määttä JA, Bendre A, Laanti M, Büki KG, Rantakari P, Tervola P, et al. Fam3c modulates osteogenic cell differentiation and affects bone volume and cortical bone mineral density. *Bonekey Rep* 2016;5:787. DOI: 10.1038/bonekey.2016.14
89. Bendre A, Büki KG, Määttä JA. Fam3c modulates osteogenic differentiation by down-regulating Runx2. *Differentiation* 2017;93:50-7. DOI: 10.1016/j.diff.2016.11.005
90. Martínez-Gil N, Patiño J, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. WNT16 rs2908004 missense variant acts as eQTL of FAM3C in human primary osteoblasts. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2021;13(4):117-21.
91. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Herrera C, Gritti N, Ugartondo N, García-Giralt N, et al. Functional evidence of bone regulation of WNT16 through upstream enhancers within CPED1. *J Bone Miner Res* 2020;35S1:179.

La variante *missense* rs2908004 de *WNT16* actúa como eQTL de *FAM3C* en osteoblastos primarios humanos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2021000300003>

Martínez-Gil N, Patiño J, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD. Barcelona (España)

Fecha de recepción: 13/05/2021 - Fecha de aceptación: 27/09/2021

Trabajo premiado con una beca de Investigación FEIOMM 2019.

Resumen

Introducción: *WNT16* es un gen importante en la homeostasis ósea, que se encuentra en un *locus* muy complejo que también incluye los genes vecinos: *ING3*, *FAM3C* y *CPED1*. Además del claro papel de *WNT16* sobre la determinación de la densidad mineral ósea (DMO), también se han encontrado pruebas sobre la importancia de estos tres genes vecinos en el metabolismo óseo. Queda por tanto esclarecer si las variantes en *WNT16* asociadas a la DMO realizan su efecto propiamente sobre *WNT16* o si lo hacen modificando la expresión de estos genes vecinos.

Material y métodos: Hemos determinado los niveles de expresión de *CPED1* y *FAM3C* en osteoblastos primarios y hemos comprobado si variantes de *WNT16* se comportan como *loci* de rasgos cuantitativos de expresión (*expresión quantitative trait loci*; eQTL) de estos genes.

Resultados: La variante de cambio de aminoácido rs2908004 en *WNT16* actúa como eQTL de *FAM3C* en osteoblastos primarios bajo la hipótesis de modelo dominante.

Discusión: Es posible que el efecto de esta variante sobre la DMO sea debido a la modificación de los niveles de expresión de *FAM3C* además o en vez de un efecto directo de la proteína *WNT16* mutante resultante del cambio de aminoácido.

Palabras clave: *WNT16*, densidad mineral ósea, osteoporosis, transcripción.

INTRODUCCIÓN

WNT16 es un ligando de la vía de Wnt extensamente estudiado por su importancia en la regulación de la homeostasis del hueso. Esto se ha confirmado con el fenotipo de ratones *knock-out* (KO) y ratones KO condicionales en osteoblastos (cKO), que muestran fracturas espontáneas debido a una baja densidad mineral ósea (DMO) cortical, una baja resistencia ósea y una alta porosidad cortical, manteniendo el volumen de hueso trabecular inalterado¹⁻⁴. Por el contrario, la sobreexpresión de *WNT16* en osteoblastos y osteocitos produce un aumento de la DMO y de la resistencia ósea tanto en hueso trabecular como cortical⁵⁻⁷. A pesar de esto, no se conoce el mecanismo preciso por el que *WNT16* actúa y diferentes estudios señalan que el efecto sobre las vías Wnt canónicas y no-canónicas podría ser específico de tejido^{1,8-11}. En el hueso, *WNT16* es expresado principalmente por los osteoblastos y realiza su función tanto estimulando la formación ósea, como inhibiendo su resorción de manera indirecta a través de OPG o de manera directa afectando a la diferenciación de los osteoclastos^{1,12}.

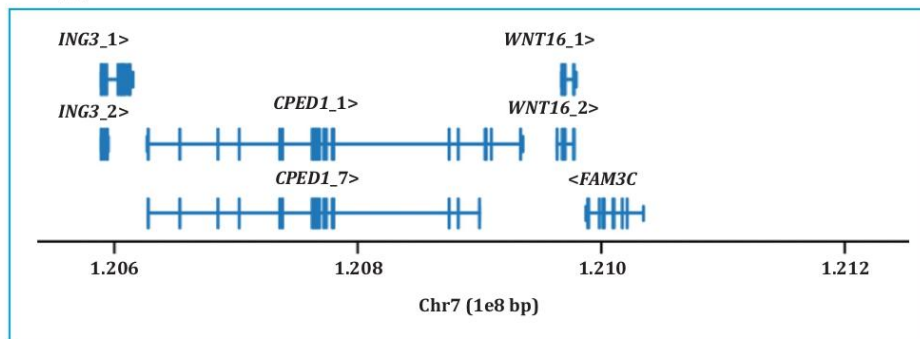
Multitud de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han mostrado asociación entre el *locus* que contiene *WNT16* y varios fenotipos esqueléticos, incluyendo la DMO y el riesgo de fracturas^{2,3,13-26}. *WNT16* se encuentra en un *locus* muy complejo, donde varios genes de la región han mostrado un papel importante sobre el metabolismo óseo. Pertenecen a este *locus* los genes *ING3* y *CPED1* a 5' y *FAM3C* a 3' de *WNT16* (figura 1).

ING3 (*Inhibitor Of Growth Family Member 3*) es responsable de la regulación de la cromatina, ya que forma parte del complejo NuA4 histona acetiltransferasa (HAT) que reconoce la forma trimetilada de la lisina 4 de la histona H3²⁷. Otras funciones no relacionadas con la regulación de la cromatina incluyen la promoción de la apoptosis, la reparación de ADN y la modulación de la movilidad celular²⁷. *ING3* se expresa en multitud de tejidos, especialmente en aquellos con mayor proporción de crecimiento celular, siendo el hueso uno de los que mayor expresión de *ING3* presenta²⁷. El modelo celular *in vitro* de células mesenquimales KO de *ING3*, muestra afectación de la osteoblastogénesis y una estimulación de la diferenciación adipogénica²⁸.



Correspondencia: Núria Martínez-Gil (nuriarmartinez91@ub.edu)

Figura 1. Genes en el locus: *ING3_1* (ENST00000315870.5), *ING3_2* (ENST00000339121.5), *CPED1_1* (ENST00000310396.5), *CPED1_7* (ENST00000450913.2), *WNT16_1* (ENST0000022462.2), *WNT16_2* (ENST00000361301.2), y *FAM3C* (ENST00000359943.3), de GRCh37/hg19



Para *CPED1* (*Cadherin Like And PC-Esterase Domain Containing 1*), no se conoce función concreta en humanos o ratones. En estos últimos, se encuentra uniformemente expresado en una variedad de tejidos sólidos, incluido el óseo, aunque no se detecta en la línea celular RAW264.7 ni en leucocitos circulantes²⁹. Además, *Cped1* presenta diferentes isoformas debidas a *splicing* alternativos y tres regiones promotoras activas durante la diferenciación osteogénica, lo que indica una compleja regulación durante la diferenciación²⁹.

FAM3C (*Family of sequence similarity 3c*) es un factor de crecimiento tipo citocina expresado en multitud de tejidos³⁰, que juega un papel muy importante en la transición epitelio-mesénquima (*Epithelial-to-mesenchymal transition*; *EMT*) y la subsecuente metástasis durante la progresión del cáncer³¹. Su relación con el metabolismo óseo se ha confirmado con el modelo de ratón KO que presenta alteraciones en la estructura cortical y trabecular, con un aumento en la DMO cortical, lo que genera una disminución de la resistencia ósea³⁰. En estudios *in vitro*, se comprobó que las células mesenquimales extraídas de estos ratones KO mostraban una osteoblastogénesis acelerada³¹.

La relación de los genes presentes en el locus '*ING3-CPED1-WNT16-FAM3C*' con el metabolismo óseo y su repetida asociación a la DMO plantea la cuestión de si hay un único gen causal y, en ese caso, cuál es o, si por lo contrario, todos los genes están contribuyendo al fenotipo. Para ello, en el presente trabajo hemos determinado si aquellas variantes de *WNT16* asociadas a la DMO en un trabajo previo de nuestro grupo³² se encuentran modificando la expresión de los genes vecinos *CPED1* y *FAM3C*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Para los ensayos de *loci* que determinan diferencias cuantitativas de expresión génica (*expression quantitative trait loci*; eQTL) se usaron osteoblastos primarios humanos (hOB). Los hOB se obtuvieron a partir de fragmentos de hueso trabecular descartados de operaciones de reemplazo de rodilla realizadas a mujeres con osteoartritis y que no presentaban ningún otro trastorno que pudiera afectar la calidad ósea. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Parc de Salut MAR (números de registro: 2010/3882/1 and

2013/5266/1) y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki, obteniéndose consentimiento informado por escrito de todos los participantes. El protocolo de cultivo de los osteoblastos primarios se encuentra descrito en Roca-Ayats y cols.³³. Brevemente, las muestras de hueso se cortaron en trozos pequeños y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco, Life Technologies). Estas piezas se cultivaron en placas de 140 mm con DMEM suplementado al 10% de FBS, 1% p/s, 0,4% de fungizona (Gibco, Life Technologies) y 100 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). Cuando las células alcanzaron la confluencia, se dividieron en tres matraces de 75 cm², uno para extracción de ADN, otro para extracción de ARN y el tercero para su congelación y almacenamiento. Se utilizaron células a pase 2 o inferior para todas las extracciones.

Ensayo eQTL

Se extrajo el ADN de los hOB cultivados utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN purificado y su calidad se analizó en un espectrofotómetro (Nanodrop). Los genotipos de las variantes rs2908004, rs2707466, rs55710688 y rs142005327 se evaluaron mediante secuenciación Sanger utilizando BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en las instalaciones de Genómica de los CCiT de la Universitat de Barcelona. Los *primers* (Invitrogen, Thermo Fisher) se diseñaron utilizando el Primer3 Input 0.4.0 (tabla 1). El ARN total de los hOB cultivados se extrajo utilizando el kit High Pure RNA Isolation kit (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la cuantificación y la calidad del ARN se comprobaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop. El ARN se retrotranscribió a cADN utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La RT-qPCR se realizó utilizando sondas UPL (Roche) en un LightCycler 480 Instrument II (Roche). Se utilizó la expresión del gen *HMBS* como control de normalización y se calculó la cuantificación relativa (*fold change*) utilizando el método de la segunda derivada. El número y la secuencia de la sonda utilizada, así como los *primers* utilizados para la amplificación de los genes *CPED1*, *FAM3C* y *HMBS* se muestran en la tabla 1.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los eQTL, se utilizó la función *Wgassociation*³⁴ en RStudio. Esta función lleva a cabo un análisis de asociación entre un SNP dado y una variable dependiente (en este caso los niveles de expresión de *CPED1* y *FAM3C*) en cinco modelos de herencia genética diferentes: codominante [homocigoto para alelo mayoritario frente a heterocigoto frente a homocigoto para alelo minoritario], dominante [homocigoto para alelo mayoritario frente a (heterocigoto + homocigoto para alelo minoritario)], recesivo [homocigoto para alelo minoritario frente a (heterocigoto + homocigoto para alelo mayoritario)], sobredominante [heterocigoto frente a (homocigoto para alelo mayoritario + homocigoto para alelo minoritario)] y log-aditivo [cada alelo modifica el riesgo en una cantidad aditiva].

RESULTADOS

Análisis de *cis*-eQTL

Las variantes rs2908004, rs2707466, rs55710688 y rs142005327 de *WNT16* han sido descritas como *cis*-eQTLs, según la base de datos GTEx en diferentes tejidos humanos (tabla 2). Desafortunadamente, esta base de

datos no dispone de información de ningún tejido óseo. Es por esto, que haciendo uso de una base de datos propia de osteoblastos primarios humanos ($n=45$), hemos testado si estas variantes actúan como *cis*-eQTL de los genes vecinos de *WNT16*: *CPED1* y *FAM3C*. Únicamente la variante rs2908004 ha mostrado una asociación significativa con los niveles de expresión de *FAM3C* bajo la hipótesis dominante ($p=0.03$, tabla 3, figura 2). Además, las variantes rs2908004 y rs2707466 muestran una tendencia a la significación con los niveles de expresión de *FAM3C* bajo la hipótesis de codominancia ($p=0.05491$) y bajo la hipótesis dominante ($p=0.06954$), respectivamente (tabla 3, figura 2). La presencia del alelo G (rs2908004) y el alelo C (rs2707466) están asociados con un aumento en la expresión de *FAM3C* (tabla 3, figura 2). Por el contrario, no hemos encontrado asociación significativa ni tendencia entre las variantes analizadas de *WNT16* y los niveles de expresión de *CPED1* (tabla 3, figura 2).

DISCUSIÓN

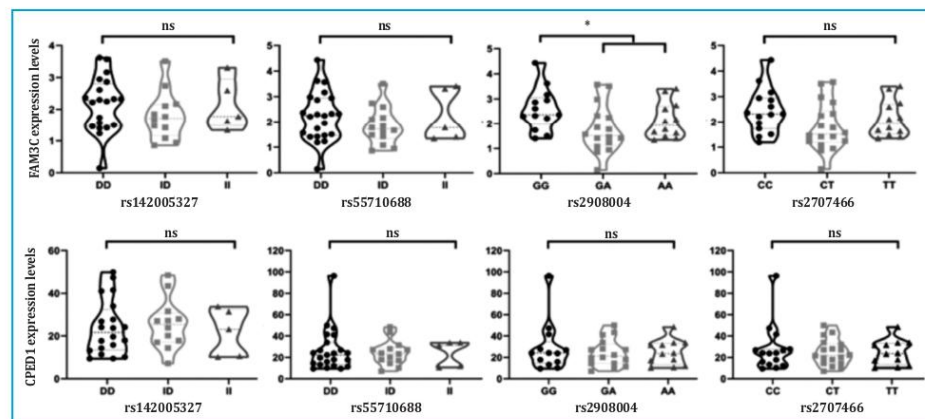
Multitud de trabajos en los últimos 20 años destacan la importancia de *WNT16* en la homeostasis ósea. *WNT16* se encuentra en la posición 7q31.31 junto con otros 3 genes

Tabla 1. *Primers* utilizados en la secuenciación de cuatro SNPs de *WNT16* y para la RT-qPCR de *FAM3C*, *CPED1* y *HMBS*

Nombre del primer	F (5'→3')	R (5'→3')	Sonda
WNT16-rs55710688	GGTAGCTCCAGTAAGAGATTC	CAGATTACCGTCTTTGGGT	
WNT16-rs2908004-rs142005327	ACTTTCAACTGAGCTGGGG	CTGGAAGTGGGAGTCAGG	
WNT16-rs2707466	TGGGACAAAACCAAAGGACG	TGACCACATGGGTGTTGAAC	
FAM3C_qPCR	GGCAATGGAACACAGGAG	TGTATGGCCTTCAGAACTCAA	52
CPED1_qPCR	CCCAAGTCTGCCCTTGTTT	GAAGAAATAGGCTGTAACCCACA	6
HMBS_qPCR	TGCCCTGGAGAAGAATGAAG	CAGCATCATGAGGGTTTTC	79

F: primer forward; R: primer reverse.

Figura 2. Gráficos de violín (*violin plots*) de los niveles de expresión de *FAM3C* (arriba) y *CPED1* (abajo) según los tres genotipos (homocigoto para el alelo mayoritario, heterocigoto, homocigoto para el alelo minoritario) de las 4 variantes estudiadas



I: inserción; D: delección.

también relacionados con el metabolismo óseo. En un estudio previo de nuestro grupo encontramos que las variantes rs142005327, rs55710588, rs2908004 y rs2707466 se hallaban asociadas a la DMO en una cohorte de mujeres postmenopáusicas del área de Barcelona (BARCOS)³². Para determinar si estas variantes están relacionadas con un efecto sobre *WNT16* o con un efecto sobre la expresión de genes vecinos hemos comprobado si están actuando como eQTL de *FAM3C* y *CPED1*. Este trabajo nos ha permitido determinar que la variante missense rs2908004 está actuando como eQTL del gen *FAM3C* bajo la hipótesis de modelo dominante en osteoblastos primarios humanos.

La variante de cambio de aminoácido rs2908004 (p.Gly72Arg/p.Gly82Arg) se ha encontrado asociada a diferentes parámetros óseos por nosotros y por otros autores^{2,32,35-38}. Este cambio de aminoácido de glicina a arginina se considera tolerado y benigno por los predictores de patogenicidad SIFT y PolyPhen-2, por lo que su efecto sobre la DMO podría deberse a su papel como eQTL y no a un cambio sobre la proteína WNT16 resultante.

Cabe destacar que para obtener una significación estadística más robusta es necesario disponer de un banco con un mayor número de osteoblastos primarios. Desafortunadamente la obtención de estas muestras es difícil y solamente hemos logrado conseguir incorporar 45 muestras a nuestro banco.

Además, sería interesante determinar los niveles de expresión de otros genes vecinos que puedan estar influyendo sobre la DMO como *ING3* o directamente sobre los niveles de expresión de *WNT16*, que no han podido ser cuantificados por falta de muestra de ARN de osteoblastos primarios.

CONCLUSIÓN

Mediante este trabajo hemos determinado que la variante rs2908004 de *WNT16* regula los niveles de expresión del gen vecino *FAM3C* bajo la hipótesis de modelo dominante. Si esta asociación se confirma en un banco de osteoblastos primarios mayor indicaría que la asociación de esta variante con la DMO podría ser debida, al menos en parte, a la variación de expresión de *FAM3C*.

Tabla 2. Genes cuya expresión es modificada por las variantes rs2908004, rs2707466, rs55710688, rs142005327 en diversos tejidos humanos (datos extraídos del *Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal*)

SNP	Gen	Tejido
rs2908004	<i>CPED1</i>	Arteria - Tibial
	<i>CYCSP19</i>	Testículo
	<i>FAM3C</i>	Piel - NE y E; Cerebro - Corteza Frontal (BA9); Esófago - Muscularis
rs142005327	<i>CPED1</i>	Arteria - Tibial
	<i>FAM3C</i>	Piel - NE y E; Músculo - esquelético; Corazón - Ventriculo izquierdo; Pecho - tejido mamario; Corazón - Apéndice Auricular; Nervio - Tibial
	<i>WNT16</i>	Adiposo - Subcutáneo
rs2707466	<i>CPED1</i>	Arteria - Tibial
	<i>CYCSP19</i>	Testículo
	<i>FAM3C</i>	Piel - NE y E; Cerebro - Corteza Frontal (BA9)
rs55710688	<i>CPED1</i>	Arteria - Tibial
	<i>FAM3C</i>	Piel - NE y E; Músculo - esquelético; Corazón - Ventriculo izquierdo; Pecho - tejido mamario
	<i>WNT16</i>	Adiposo - Subcutáneo

NE: no expuesta al sol (suprapúbica); E: expuesta al sol (parte inferior de la pierna).

Tabla 3. Resultados de asociación de los 4 SNPs de *WNT16* y la expresión de *CPED1* y *FAM3C*

SNP	A may	A min	HWE	<i>CPED1</i>		<i>FAM3C</i>	
				Codominante	Dominante	Codominante	Dominante
rs55710688	D	I	0,2597	0,90837	0,65906	0,44952	0,34621
rs2908004	G	A	0,2095	0,68815	0,38455	0,05491	0,03061
rs142005327	D	I	0,2325	0,84422	0,91336	0,49356	0,35142
rs2707466	C	T	0,2305	0,80454	0,50710	0,11531	0,06954

En negrita las asociaciones significativas ($p < 0,05$) y en cursiva las que muestran tendencia.
A may: alelo mayoritario; A min: alelo minoritario; HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg.



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

Bibliografía

- Movérare-Skrtic S, Henning P, Liu X, Nagano K, Saito H, Börjesson AE, et al. Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nat Med*. 2014; 20(11): 1279-88.
- Zheng H-F, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Paternoster L, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet*. 2012; 8(7): e1002745.
- Medina-Gomez C, Kemp JP, Estrada K, Eriksson J, Liu J, Reppe S, et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the WNT16 locus. *PLoS Genet*. 2012; 8(7): e1002718.
- Wergedal JE, Kesavan C, Brommage R, Das S, Mohan S. Role of WNT16 in the regulation of periosteal bone formation in female mice. *Endocrinology*. 2015; 156(3): 1023-32.
- Alam I, Alkhouli M, Gerard-O'Riley RL, Wright WB, Acton D, Gray AK, et al. Osteoblast-Specific Overexpression of Human WNT16 Increases Both Cortical and Trabecular Bone Mass and Structure in Mice. *Endocrinology*. 2016; 157(2): 722-36.
- Alam I, Reilly AM, Alkhouli M, Gerard-O'Riley RL, Kasipathi C, Oakes DK, et al. Bone Mass and Strength are Significantly Improved in Mice Overexpressing Human WNT16 in Osteocytes. *Calcif Tissue Int*. 2017; 100(4): 361-73.
- Movérare-Skrtic S, Wu J, Henning P, Gustafsson KL, Sjögren K, Windahl SH, et al. The bone-sparing effects of estrogen and WNT16 are independent of each other. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(48): 14972-7.
- Jiang Z, Von den Hoff JW, Törensma R, Meng L, Bian Z. Wnt16 is involved in intramembranous ossification and suppresses osteoblast differentiation through the Wnt/ β -catenin pathway. *J Cell Physiol*. 2014; 229(3): 384-92.
- Hendrickx G, Boudin E, Verbeek M, Fransen E, Mortier G, Van Hul W. WNT16 Requires G α Subunits as Intracellular Partners for Both Its Canonical and Non-Canonical WNT Signalling Activity in Osteoblasts. *Calcified Tissue International*. 2020; 106(3): 294-302.
- Shen J, Chen X, Jia H, Meyers CA, Shrestha S, Asatrian G, et al. Effects of WNT3A and WNT16 on the Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Perivascular Stem/Stromal Cells. *Vol. 24, Tissue Engineering Part A*. 2018. p. 68-80.
- Sebastian A, Hum NR, Morfin C, Murugesu DK, Loots GG. Global gene expression analysis identifies Mef2c as a potential player in Wnt16-mediated transcriptional regulation. *Vol. 675, Gene*. 2018. p. 312-21.
- Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, et al. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 463(4): 1278-83.
- Moayyeri A, Hsu Y-H, Karasik D, Estrada K, Xiao S-M, Nielson C, et al. Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(11): 3054-68.
- Kemp JPM, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet*. 2017; 49(10): 1468-75.
- Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, an, Chesi 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.
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu Y-H, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*. 2012; 44(5): 491-501.
- Trajanoska K, Schoufour JD, de Jonge EAL, Kieboom BCT, Mulder M, Stricker BH, et al. Fracture incidence and secular trends between 1989 and 2013 in a population based cohort: The Rotterdam Study. *Bone*. 2018; 114: 116-24.
- Morris JA, Kemp JP, Youten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet*. 2019; 51(2): 258-66.
- Kichaev G, Bhatia G, Loh P-R, Gazal S, Burch K, Freund MK, et al. Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *Am J Hum Genet*. 2019; 104(1): 65-75.
- Chesi A, Mitchell JA, Kalkwarf HJ, Bradfield JP, Lappe JM, McCormack SE, et al. A trans-ethnic genome-wide association study identifies gender-specific loci influencing pediatric aBMD and BMC at the distal radius. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(17): 5053-9.
- Koller DL, Zheng H-F, Karasik D, Yerges-Armstrong L, Liu C-T, McGuigan F, et al. Meta-analysis of genome-wide studies identifies WNT16 and ESR1 SNPs associated with bone mineral density in premenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2013; 28(3): 547-58.
- Pei Y-F, Hu W-Z, Yan M-W, Li C-W, Liu L, Yang X-L, et al. Joint study of two genome-wide association meta-analyses identified 20p12.1 and 20q13.33 for bone mineral density. *Bone*. 2018; 110: 378-85.
- Zhang L, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei Y-F, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(7): 1923-33.
- Wang H, Zhang F, Zeng J, Wu Y, Kemper KE, Xue A, et al. Genotype-by-environment interactions inferred from genetic effects on phenotypic variability in the UK Biobank. *Sci Adv*. 2019; 5(8): eaaw3538.
- Zheng H-F, Forgetta V, Hsu Y-H, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature*. 2015; 526(7571): 112-7.
- Mullin BH, Zhao JH, Brown SJ, Perry JRB, Luan J, an, Zheng H-F, et al. Genome-wide association study meta-analysis for quantitative ultrasound parameters of bone identifies five novel loci for broadband ultrasound attenuation. *Hum Mol Genet*. 2017; 26(14): 2791-802.
- Nabbi A, Almami A, Thakur S, Suzuki K, Boland D, Bismar TA, et al. ING3 protein expression profiling in normal human tissues suggest its role in cellular growth and self-renewal. *Vol. 94, European Journal of Cell Biology*. 2015. p. 214-22.
- Chesi A, Wagley Y, Johnson ME, Manduchi E, Su C, Lu S, et al. Genome-scale Capture C promoter interactions implicate effector genes at GWAS loci for bone mineral density. *Nat Commun*. 2019 19; 10(1): 1260.
- Maynard RD, Godfrey DA, Medina-Gomez C, Ackert-Bicknell CL. Characterization of expression and alternative splicing of the gene cadherin-like and PC esterase domain containing 1 (Cped1). *Gene*. 2018 20; 674: 127-33.
- Määttä JA, Bendre A, Laanti M, Büki KG, Rantakari P, Tervola P, et al. Fam3c modulates osteogenic cell differentiation and affects bone volume and cortical bone mineral density. *Bonekey Rep*. 2016; 5: 787.
- Bendre A, Büki KG, Määttä JA. Fam3c modulates osteogenic differentiation by down-regulating Runx2. *Differentiation*. 2017; 93: 50-7.
- Martinez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giral N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep*. 2018 19; 8(1): 10951.
- Roca-Ayats N, Martínez-Gil N, Cozar M, Gerousi M, García-Giral N, Ovejero D, et al. Functional characterization of the C7ORF76 genomic region, a prominent GWAS signal for osteoporosis in 7q21.3. *Bone*. 2019; 123: 39-47.
- Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Vol. 23, Bioinformatics*. 2007. p. 654-5.
- Mitek T, Nagraba L, Deszczyński J, Stolarczyk M, Kuchar E, Stolarczyk A. Genetic Predisposition for Osteoporosis and Fractures in Postmenopausal Women. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1211: 17-24.
- García-Ibarbia C, Pérez-Núñez MI, Olmos JM, Valero C, Pérez-Aguilar MD, Hernández JL, et al. Missense polymorphisms of the WNT16 gene are associated with bone mass, hip geometry and fractures. *Osteoporos Int*. 2013; 24(9): 2449-54.
- Correa-Rodríguez M, Schmidt Rio-Valle J, Rueda-Medina B. Polymorphisms of the WNT16 gene are associated with the heel ultrasound parameter in young adults. *Osteoporos Int*. 2016; 27(3): 1057-61.
- Hendrickx G, Boudin E, Fijałkowski I, Nielsen TL, Andersen M, Brixen K, et al. Variation in the Kozak sequence of WNT16 results in an increased translation and is associated with osteoporosis related parameters. *Bone*. 2014; 59:57-65.



On the association between Chiari malformation type 1, bone mineral density and bone related genes

Núria Martínez-Gil^a, Leonardo Mellibovsky^b, Demián Manzano-López González^c,
Juan David Patiño^a, Monica Cozar^a, Raquel Rabionet^a, Daniel Grinberg^a, Susanna Balcells^{a,*}

^a Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Barcelona, Spain

^b Musculoskeletal Research Group, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Centro de Investigación Biomédica en Red en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), ISCIII, Barcelona, Spain

^c Servicio de Neurocirugía, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Chiari malformation type 1
Bone mineral density
NOTCH2
WNT16
CRTAP
MYO7A

ABSTRACT

Background: Chiari malformation type 1 (C1M) is a neurological disease characterized by herniation of the cerebellar tonsils below the foramen magnum. Cranial bone constriction is suspected to be its main cause. To date, genes related to bone development (e.g. *DKK1* or *COL1A2*) have been associated with C1M, while some bone diseases (e.g. Paget) have been found to cosegregate with C1M. Nevertheless, the association between bone mineral density (BMD) and C1M has not been investigated, yet. Here, we systematically investigate the association between C1M and BMD, and between bone related genes and C1M.

Methods: We have recruited a small cohort of C1M patients (12 unrelated patients) in whom we have performed targeted sequencing of an in-house bone-related gene panel and BMD determination through non-invasive DXA.

Results: In the search for association between the bone related genes and C1M we have found variants in more than one C1M patient in *WNT16*, *CRTAP*, *MYO7A* and *NOTCH2*. These genes have been either associated with craniofacial development in different ways, or previously associated with C1M (*MYO7A*). Regarding the potential link between BMD and C1M, we have found three osteoporotic patients and one patient who had high BMD, very close to the HBM phenotype values, although most patients had normal BMD.

Conclusions: Variants in bone related genes have been repeatedly found in some C1M cases. The relationship of bone genes with C1M deserves further study, to get a clearer estimate of their contribution to its etiology. No direct correlation between BMD and C1M was observed.

1. Introduction

Chiari malformation type 1 (C1M; OMIM 118420) is characterized by downward herniation of the cerebellar tonsils through the foramen magnum by at least 5 mm without involving the brain stem (Barkovich et al., 1986). This herniation results in compression of the neural tissue at the craniovertebral junction leading to neurological dysfunction, which may or may not be accompanied by syringomyelia or hydrocephalus (Milhorat et al., 1999; Urbizu et al., 2013; Speer et al., 2003). C1M presents in many cases as asymptomatic, and in many others with pain or headache within the occipital or upper cervical region, which can also be accompanied by ocular or otoneurological disturbances, lower cranial nerve signs, cerebellar ataxia or spasticity (McVige and

Leonardo, 2014; Piper et al., 2019; Speer et al., 2003). The diagnosis is made through magnetic resonance imaging (MRI) or ultrasonography for the prenatal diagnosis (Fric and Eide, 2020; Holly and Batzdorf, 2019). Although it has been described that some cases of C1M may be the consequence of trauma, many cases can be congenital (Speer et al., 2003). It has been proposed that classical C1M is generated via an insufficient development of the paraxial mesoderm involving occipital bone sclerotomes, resulting in a smaller and shallow posterior fossa (PF), too small to accommodate the normal size of the cerebellum (Nishikawa et al., 1997; Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981). C1M is likely to have a genetic basis, based on familial aggregation, monozygotic twin studies and its overlap with known genetic conditions (Markunas et al., 2014; Mavinkurve et al., 2005; Szeuwka et al., 2006; Speer et al., 2003;

Abbreviations: C1M, Chiari Malformation type 1; HBM, High Bone Mass; BMD, Bone Mineral Density.

* Corresponding author.

E-mail address: sbalcells@ub.edu (S. Balcells).

<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2022.101181>

Received 12 June 2021; Received in revised form 4 March 2022; Accepted 8 March 2022

Available online 15 March 2022

2352-1872/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbott et al., 2018; Speer et al., 2000). The main recent strategy to find the genetic basis of the disease and the inheritance pattern has involved the use of next generation sequencing (NGS) techniques such as whole exome sequencing (WES). These works have found several genes, including chromodomain genes (Sadler et al., 2021) and chromatin remodeling genes (Provenzano et al., 2021).

The fact that the cranial bone constriction is suspected to be the most common biologic mechanism leading to C1M suggests that variants in genes related with bone metabolism may be contributing to the malformation through an incorrect development of the cranial bone. This hypothesis is reinforced by the findings of several recent works which have found association of C1M with rare variants in genes involved in collagen metabolism (Urbizu et al., 2021), in Wnt pathway genes (Merello et al., 2017), or in cranial bone sutures (Provenzano et al., 2021).

In this work, we have further investigated the relationship between C1M and bone metabolism, searching for rare variants in bone related genes through an in-house bone gene panel and, for the first time, exploring the association between bone mineral density and C1M, in a small series of C1M patients.

2. Material and methods

2.1. Study cohort, brain MRI and bone mineral density measurements

C1M cases, previously diagnosed at the Neurosurgery Service of the Hospital del Mar, were invited to participate in the study. Twelve patients agreed to participate, and in three cases, additional family members were also recruited ($n = 6$), four of whom were also affected with C1M. Diagnosis of C1M was based on brain-MRI (Achieva 3.0 T, Philips, Amsterdam, Netherlands) demonstration of downward herniation >5 mm of the cerebellar tonsils on a mid-sagittal T1-weighted image in the presence of signs or symptoms indicating neural compression at the crano-vertebral junction, syringo-hydrumyelia, cerebellar dysfunction or intracranial hypertension. All C1M cases and family members underwent brain MRI. The cohort characterization includes femoral neck and lumbar spine bone mineral density measurements obtained through dual-energy X-ray absorptiometry scans (DXA; QDR 4500 SL; Hologic, Waltham, MA, USA) and collection of blood samples (Table 1). All DXA measurements were performed prior to any treatment that could increase bone mass. For individuals CH7a and CH10 no DXA scan was available, for CH4 no T-score was available and

for CH7 no Z-score was available (Table 1).

2.2. Genetic analyses

The genomic DNA of 12 unrelated C1M and their 6 relatives was isolated from peripheral blood leukocytes using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. The 12 unrelated C1M cases underwent targeted sequencing of the exonic and flanking intronic regions of 127 genes related with BMD in GWAS studies or associated with monogenic bone diseases included in an in-house bone related gene panel (IRN:1000011543, KAPA HyperChoice MAX 0.5 Mb T4, 12 rxn; Supplementary Table 1). Sequencing was performed at CNAG (Barcelona, Spain). Shortly, DNA was enzymatically fragmented and libraries were constructed, pooled and hybridized to the probesets. Captured fragments were sequenced in an Illumina NovaSeq 6000 sequencer. The reads were then aligned to the hg38 reference genome with BWA-mem, duplicate-marked, recalibrated and sorted before calling variants with GATK's haplotype caller (V4) following GATK standard parameters. After quality-filtering following GATK recommended hard filters (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035890471-Hard-filtering-germline-short-variants>), variants were annotated with Varafit (Desvignes et al., 2018), and prioritized under the hypothesis of an autosomal dominant segregation.

Filtering included the exclusion of variants located outside of the coding region (intergenic, 5' and 3' UTR, upstream, downstream, ncRNA or unknown variants); intronic variants not predicted to affect the splice site; synonymous variants; variants with a minor allele frequency > 0.02; missense variants with less than two damaging or potentially damaging prediction scores out of four tools (CADD (>20), <http://cadd.gs.washington.edu>; PROVEAN, <http://provean.jcvi.org/>; Polyphen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; SIFT, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>); or, for indel variants, those with a neutral SIFT indel score (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>). For the remaining variants, cosegregation in available family members (for CH2, CH7 and CH10) was examined by Sanger sequencing at the CqTUB genomics service (Genómica, Parc Científic, Barcelona, Spain) using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, followed by detection on automated capillary sequencer models 3730 Genetic Analyzer and 3730xl Genetic Analyzer.

Table 1
Description of the Spanish C1M case series.

ID	Sex	Age	Family relationships	Disease status	BMD (T-score)		BMD (Z-Score)		TOTAL
					LS	FN	LS	FN	
CH1	F	59		A	*	-2.6	*	-1.3	
CH2	F	65		A	-3.2	-1.5	-0.9	-0.9	-1.8
CH2a	F	35	daughter of CH2	A	-0.5	-1.1	-0.4	-0.8	-1.2
CH2b	F	68	sister of CH2	A	-2.1	-1.6	0	-0.4	-0.4
CH2c	F	71	sister of CH2	N	-1.4	-1.6	+0.8	+0.3	+1.1
CH2d	F	72	sister of CH2	A	-4.1	-3.8	-1.8	-0.1	-1.9
CH3	F	46		A	-0.3	-1.1	+0.1	-0.1	0
CH4	M	24		A	NA	NA	+0.2	0	+0.2
CH5	F	45		A	+1.4	+1.5	+1.8	+2	+3.8
CH6	M	46		A	-0.6	-0.6	-0.4	+0.5	+0.1
CH7	F	61		A	-2.5	-3.2	NA	NA	NA
CH7a	F	63	sister of CH7	A	NA	NA	NA	NA	NA
CH8	M	47		A	-2	-1.9	-1.7	-0.6	-2.3
CH9	F	45		A	+0.9	+0.1	+1.3	+0.6	+1.9
CH10	M	74		A	NA	NA	NA	NA	NA
CH10a	F	NA	sister of CH10	N	-1.1	-0.5	+0.8	+1.4	+2.2
CH11	F	36		A	+0.8	-0.1	+0.8	+0.2	+1
CH12	F	83		A	-2.4	-1.1	+0.3	+1.3	+1.6

F: Female; M: Male; A: Affected; N: Non-affected; FN: Femoral Neck; LS: Lumbar Spine; NA: Not available.

* Dysmorphic lumbar.

3. Results

3.1. Relationship between C1M and BMD

To study the relationship between C1M and BMD we have determined the BMD of a small group of C1M patients (Table 1). The average LS and FN BMD Z-score for the cases with available data was 0.16 and -0.058, respectively. Seven unrelated C1M cases had normal BMD according to the WHO diagnostic criteria based on the T-scores and Z-scores. Instead, following the same criteria, three unrelated C1M cases (CH1, CH2, CH7) and one of their relatives (Ch2d) are classified as osteoporotic. On the other hand, a patient is considered to have high bone mass (HBM) phenotype when the sum of the LS and FN BMD Z-score values is higher than 4 (Little et al., 2002). According to this definition, only one patient (CH5) had values close to this threshold (sum Z-scores = 3.8), while the mean sum Z-score value for all 9 cases was +0.5 (Table 1).

3.2. Relationship between bone-related genes and C1M

To elucidate the relationship between variants in bone related genes and C1M, we sequenced the coding regions and intron boundaries of 127 genes through an in-house bone panel in 12 unrelated patients with C1M. After filtering (see Material and Methods) we identified 32 variants in 24 different genes in the 12 unrelated C1M patients (Supplementary Table 2). Seven of these 24 genes contain variants in more than one C1M patient (Table 2) and only one variant was present in two unrelated patients (p.P582H in *DAAM2*; Table 2).

Next, in three cases (CH2, CH7, CH10) with available DNA from family members, we tested the variants' cosegregation with the C1M phenotype ($n = 6$; Fig. 1 and "Coseg" column in Table 2 and Supplementary Table 2).

Two variants were consistent with cosegregation with the C1M phenotype in the families, p.R222C in *WNT16* and p.L282I in *DMP1*, two were compatible with cosegregation only if assuming incomplete penetrance (i.e. they were present in both affected and healthy

individuals; p.L347F in *CRTAP* and p.R371H in *BMP1*), and four did not cosegregate with the phenotype (i.e. they were absent in other affected family members; p.D478A in *DMP1*, p.L436T in *FKBP10*, p.P582H in *DAAM2* and p.R159L in *SPP1*; Table 2 and Supplementary Table 2). Unfortunately, the variants present in the remaining C1M cases could not be tested for cosegregation for lack of available relatives' samples.

After excluding variants that do not cosegregate with C1M, 26 variants in 23 different genes were present in at least one of the 12 unrelated C1M patients (Supplementary Table 2) and four genes presented variants in more than one C1M patient. These are *WNT16*, *CRTAP*, *MYO7A* and *NOTCH2* (highlighted in bold in Table 2 and Fig. 2).

4. Discussion

Here, we present a first study on the possible relationship among C1M, variants in bone related genes and BMD, through the sequencing of a bone in-house panel and BMD determination in 12 unrelated patients with C1M.

We did not find a clear positive association between BMD and C1M. Even so, we have found 3 unrelated C1M patients with osteoporosis while one patient (CH5) presented a sum Z-score of 3.8, very close to the accepted threshold for HBM. Knowing that C1M can occur as an isolated malformation or as a part of a broader genetic entity (Speer et al., 2003), and many Mendelian diseases have been described to coexist with C1M, we may speculate that these extreme values of BMD (Osteoporotic or HBM) can be somehow related to C1M phenotype. The CH5 patient is of special interest because given the reported prevalence of the HBM phenotype of 0.2–1% (Sarrión et al., 2014; Gregson et al., 2012, 2013), under the hypothesis of no association it would have been highly unlikely to find a HBM case in this small cohort. Nevertheless, this could also be a spurious finding, as it is only one individual. In order to elucidate the relationship between the C1M and bone mass, it would be crucial to measure the LS and FN BMD of the C1M patients from previous publications (Boyles et al., 2006; Markunas et al., 2013; Urbizu et al., 2013; Markunas et al., 2014; Rosenblum et al., 2019; Gonçalves et al., 2019; Merello et al., 2017; Urbizu et al., 2021; Provenzano et al., 2021;

Table 2
Genes with variants in more than one Chiari patient.

Gene	BMD GWAS	OMIM Disease	Variant	C1M patient	Coseg.	CADD	PP	PV	SIFT	MAF gnomAD	rs number
WNT16^a	Y	N	p.R222C	CH10	Y	27.8	D	D	D	0.00001995	rs773948299
			p.S260P	CH4	NA	23.8	D	N	T	0.002061	rs116444834
CRTAP	N	OI	p.C243G	CH12	NA	25.1	D	D	D	NA	NA
			p.L347F	CH2	IP	24.3	D	D	D	0.001987	rs115198029
DMP1^b	Y	ARHR1	p.D478A	CH2	N	22.4	D	D	D	0.0003853	rs148156611
			p.L282I	CH10	Y	8.14	P	N	D	0.005413	rs141979823
DAAM2^c	Y	NPHS24	p.R1049X	CH8	NA	44	NA	NA	NA	0.00002014	rs759817118
			p.P582H	CH7	N	22.2	P	N	D	0.001564	rs150676991
				CH11	NA						
FKBP10	Y	BRKS1, OI	p.R556C	CH5	NA	29	D	D	D	NA	NA
			p.I436T	CH7	N	28.8	D	D	D	0.002465	rs61749879
MYO7A^d	N	DFN; USH1	p.M2008fs	CH6	NA	NA	NA	NA	D ⁺	NA	NA
			p.R654C	CH11	NA	29.1	D	D	D	0.0001296	rs201928014
NOTCH2	N	ALGS2; HJCYS	p.V1064M	CH3	NA	23.1	B	N	D	0.000003978	rs373969789
			p.R91L	CH4	NA	22.1	P	N	T	0.008614	rs143195893

In bold genes not discarded for cosegregation. BMD GWAS: Genes associated with BMD in GWAS; Y: Yes; N: No; OMIM DISEASE: Gene associated with human diseases according to OMIM; N: No; OI: Osteogenesis imperfecta; ARHR1: Hypophosphatemic rickets, autosomal recessive, 1; NPHS24: Nephrotic syndrome, type 24; BRKS1: Bruck syndrome 1; DFN: Deafness; USH1: Usher syndrome, type 1B; ALGS2: Alagille syndrome 2; HJCYS: Hajdu-Cheney syndrome; Coseg: Cosegregation in the available families (CH2, CH7, CH10): Y: Variant present in other C1M cases in the family and/or absent in healthy family members; IP: incomplete penetrance; variant found in a healthy family member; N: NO; variant absent in other C1M cases in the family; CADD: <http://cadd.gs.washington.edu/>; PP: Polyphen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; D: Probably damaging; P: Possibly damaging; B: Benign; NA: Not available; PV: PROVEAN <http://provean.jcvi.org/>; D: Deleterious; N: Neutral; NA: No available; SIFT: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>; D: Deleterious; T: Tolerated; NA: Not available; +: Tested with SIFT indels https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_indels2.html; MAF: minor allele frequency from gnomAD V2.1.1.

^a NM_057168.2.

^b NM_004407.4.

^c NM_001201427.2.

^d NM_000260.4.

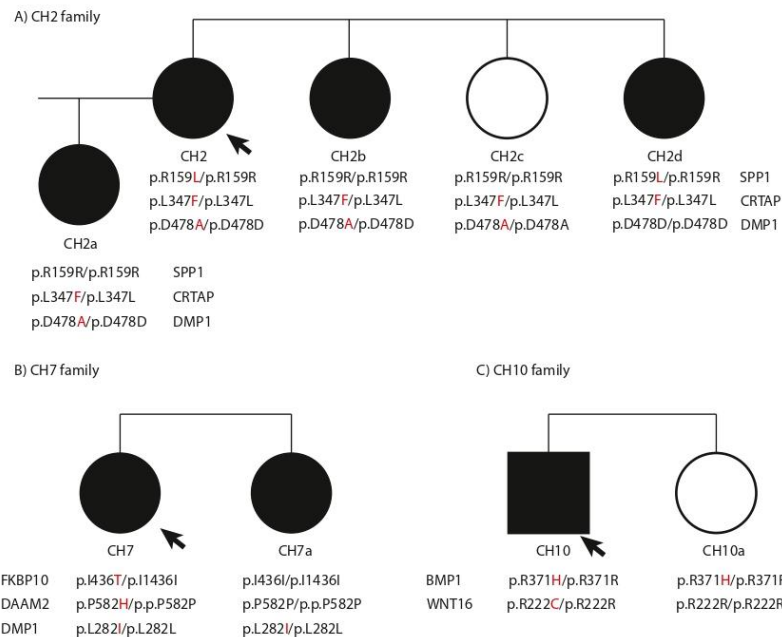


Fig. 1. Pedigree of the three C1M families. In black the C1M members, the arrow indicates the proband, the alternative allele of the variant is highlighted in red color.

Sadler et al., 2021), thus increasing the size of the cohort of patients with C1M and BMD.

Regarding the relationship between variants in bone-related genes and C1M, we have found 4 such genes each with variants in two unrelated C1M patients. These are *WNT16*, *CRTAP*, *MYO7A* and *NOTCH2* (Table 2 and Fig. 2). In *WNT16*, two missense variants, p.S260P and p.R222C, have been found in patients CH4 and CH10, respectively, the latter absent in CH10's healthy sister (CH10a), thus co-segregating with the phenotype in this small family (Fig. 1). *WNT16* is a ligand of the Wnt pathway, both canonical and non-canonical, in a cell-type specific manner (reviewed in Martínez-Gil et al., 2022). *WNT16* locus is one of the most consistent bone-related GWAS signals, and has been associated with different skeletal phenotypes, including BMD, bone strength, geometric parameters, cortical bone thickness and fracture risk (reviewed in Martínez-Gil et al., 2022). No variants in *WNT16* have been previously associated with C1M, but this pathology has been associated with other members of the Wnt pathway, such as *DKKI*, a Wnt pathway inhibitor, in which three missense variants, whose partial loss-of-function has been recently demonstrated by our group (Martínez-Gil et al., 2020), were identified in C1M cases (Provenzano et al., 2021; Merello et al., 2017). In addition, Whyte et al. (2004) described one HBM woman with gain-of-function variants in *LRP5*, a canonical Wnt pathway coreceptor, who also presented with a headache and C1M. Interestingly, we also find a *LRP5* variant (p.R1036Q) in CH3 and a *DAAM2* variant (p.R1049*) in CH8 (Supplementary Table 2). *DAAM2* is an important positive regulator of Wnt signaling and is required for various processes during development, such as dorsal patterning or determination of left/right symmetry (Lee and Deneen, 2012; Lee et al., 2015; Welsh et al., 2013). Taken together, and due to the important and widely described role played by the Wnt pathway in the correct development of the head and face (Mishina and Snider, 2014; Mani et al., 2010), it would be possible

to speculate that rare variants in *WNT16*, *LRP5* and *DAAM2*, alone or in combination with other variants, could be responsible for C1M in these individual cases.

Another gene present in two C1M cases is *CRTAP* (variants p.C243G and p.L347F, in patients CH12 and CH2, respectively). Nevertheless, the p.L347F variant is present in all available CH2 family members (Fig. 1), including the healthy sister (CH2c), which would require the assumption of incomplete penetrance. *CRTAP*, a member of the multifunctional complex P3H1-CRTAP-CypB, is involved in posttranslational modifications of fibrillar collagens. *CRTAP* loss-of-function variants are associated with osteogenesis imperfecta type VII in humans, with a phenotype that includes craniofacial bone defects (Morello et al., 2006; Baldridge et al., 2010; Xu et al., 2020; Barbirato et al., 2015; Valli et al., 2012). Interestingly, the p.C243G variant is modifying the first cysteine of the third CXXXC domain of the CRTAP protein, an important domain that could have disulfide isomerase activity (Fig. 2; Ishikawa and Bächinger, 2013). The involvement of this gene in osteogenesis imperfecta could partially explain the low BMD present in all the studied individuals with *CRTAP* variants. In family CH2, where all family members carry the p.L347F variant, two of them show a clear osteoporosis and the remaining three show osteopenia (Table 1) while patient the CH12, carrying variant p.C243G, shows an osteopenia phenotype (Table 1). Considering all this together, it is tempting to speculate that the variants in *CRTAP* may be contributing to a decrease in BMD and possibly to C1M, too.

In *MYO7A*, we have found a frameshift variant (p.M2008fs) in CH6 and a missense variant (p.R654C) in CH11 (Table 2 and Fig. 2). *MYO7A* encodes an unconventional myosin which is an actin-based motor molecule with ATPase activity, important in intracellular movement (reviewed in Williams and Lopes, 2011). Variants in the *MYO7A* gene have been associated with different forms of inherited deaf-blindness or deafness (Weil et al., 1995; Gibson et al., 1995; Hildebrand et al., 2010;

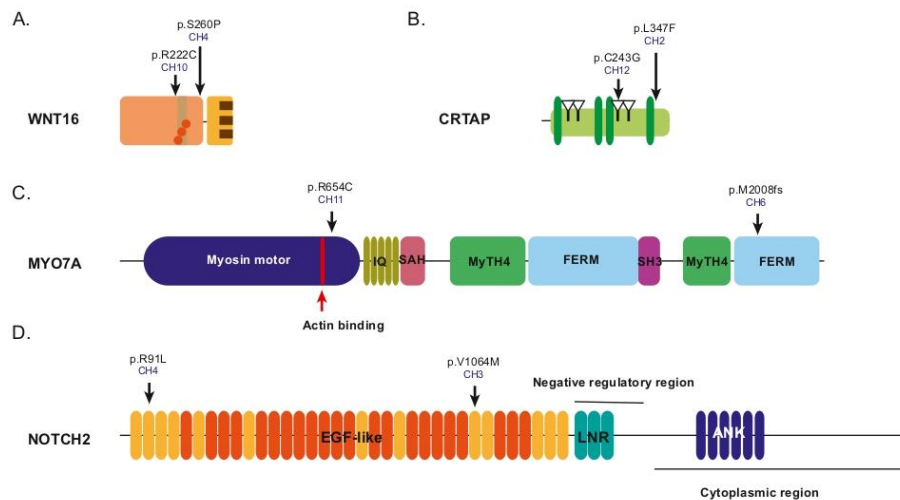


Fig. 2. Linear representation of the *WNT16* (A), *CRTAP* (B), *MYO7A* (C) and *NOTCH2* (D) with its domains and regions. For *WNT16* in orange N-terminal domain, in yellow the CRD domain, in light brown thumb domain, in dark brown finger and in orange circles the O-palmitoleoyl serine modification (reviewed in Martínez-Gil et al., 2022). For *CRTAP* in green the tetratricopeptide repeat motif, triangles show the four CXXXC domains from (Ishikawa and Bächinger, 2013). For *MYO7A* in dark blue the Myosin motor and in red the actin binding site, in dark yellow the isoleucine-glutamine (IQ) motif, in pink the Single alpha-helix (SAH) domain, in green the Myosin Tail Homology 4 (MyTH4) domains, in light blue the FERM domains and in purple the SRC Homology 3 (SH3) domain from uniprot. For *NOTCH2* in yellow the EGF-like domain, in orange the EGF-like with calcium binding, in green the cysteine-rich Lin-12/Notch (LNR) Repeats and in dark blue the Ankyrin (ANK) domains from uniprot. The black arrow signals the position of the variants found and ID patient where is found.

Table 2). The variants found affect the myosin motor and the second FERM domain, which has been described as a regulator of *MYO7A* activation (Fig. 2; Yang et al., 2009). Interestingly, *MYO7A* has been already associated with C1M under the autosomal recessive inheritance pattern in the work of Sadler et al. (2021), who found two missense variants in *MYO7A* (p.R1229Q and p.R605W) in a C1M patient. Actually, in the search for the genetic bases of C1M, 207 different genes have been found to date associated in some way with the phenotype under different segregation hypotheses (Boyles et al., 2006; Markunas et al., 2013; Urbizu et al., 2013; Markunas et al., 2014; Rosenblum et al., 2019; Gonçalves et al., 2019; Merello et al., 2017; Urbizu et al., 2021; Provenzano et al., 2021; Sadler et al., 2021). Of these 207 genes, 5 were included in the bone panel that we used in the present study. These are *MYO7A*, *BMP1*, *COL1A2*, *DKK1* and *LRP4* (Merello et al., 2017; Urbizu et al., 2021; Sadler et al., 2021). Interestingly, in addition to *MYO7A*, we also have found a variant in *BMP1* in one C1M patient (p.R371H in CH10, Supplementary Table 2). The *BMP1* variant is also present in the healthy sister CH10a, indicating that the cosegregation is only possible if incomplete penetrance is assumed. Interestingly, as in the case of *CRTAP*, variants in *BMP1* are also associated with osteogenesis imperfecta. Unfortunately, no BMD information for CH10 is available. Our findings in *MYO7A* and *BMP1* replicate the results by others and reinforce the importance of these two genes in the development of C1M.

In *NOTCH2*, two missense variants p.V1064M and p.R91L have been found, in patients CH3 and CH4, respectively. These two variants are located in the extracellular EGF-like domains (EGF-like 2 and EGF-like 28; Fig. 2). Interestingly, two variants in the extracellular EGF-like domains (p.T294M in EGF-like 7 and p.S978R in EGF-like 25) in *NOTCH3*, another receptor of the Notch family, have been previously found in a C1M patient (Sadler et al., 2021). These EGF-like domains are responsible for the interaction with cognate ligands (Cordle et al., 2008; Zanotti and Canalis, 2016). Thus, the variants found may produce a lower affinity with the ligand that may lead to less activation of the

signaling pathway. The Notch signaling pathway plays an important role in skeletal development, chondrogenesis, osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. Specifically, Notch suppresses cell differentiation in cells of immature osteoblastic lineage through inhibition of the Wnt pathway and by interactions with Runx2, while in osteocytes, Notch decreases *SOST* expression, thus increasing the Wnt pathway activity. In addition, Notch2 induces osteoclast differentiation through its interaction with NFκB. Two diseases associated with variants in *NOTCH2* have been described, the Alagille syndrome, associated with loss-of-function variants, and the Hajdu-Cheney syndrome, associated with gain-of-function variants. Alagille syndrome is characterized by cardiovascular defects, cholestatic liver disease, kidney anomalies and abnormalities of the craniofacial skeleton and vertebrae (Alagille et al., 1987; Zanotti and Canalis, 2016). Problems in craniofacial development can cause craniosynostosis and characteristic facial features, and developmental problems in vertebrae cause a characteristic structure of the vertebrae called “butterfly” that is observed in radiographs (Emerick et al., 1999; Zanotti and Canalis, 2016). Hajdu-Cheney syndrome is characterized by acroosteolysis of the hands and feet and developmental defects of bones, teeth and joints producing craniofacial and skull changes, osteoporosis and short stature (Hajdu and Kauntze, 1948; Zanotti and Canalis, 2016). These patients’ also present platybasia and basilar invagination that can produce severe neurological complications (reviewed in Zanotti and Canalis, 2016). Interestingly, the Hajdu-Cheney syndrome has been previously associated with C1M (Sawin and Menezes, 1997; Speer et al., 2003).

5. Conclusions

In conclusion, while we did not find a clear association of BMD with the C1M, we have found variants in more than one C1M patient in four interesting genes -*WNT16*, *CRTAP*, *MYO7A* and *NOTCH2*- involved in craniofacial development or previously associated with C1M.

Altogether, we consider the relationship of C1M with bone biology a very interesting issue, and we provide a few pieces of evidence supporting it. We encourage the C1M research community to pursue this effort.

Funding

Funds for the study include grants PID2019-107188RB-C21 (Spanish MICINN) and CIBERER (U720). NMG and JDP were recipients of FI and FI-SDUR predoctoral fellowships from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), respectively.

Availability of data and material

All the data are available upon request.

Ethics approval and consent to participate

All procedures performed were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Both the Bioethics Committee of Universitat de Barcelona and the Clinical Research Ethics Committee of Parc de Salut MAR have emitted a favourable bioethical statement regarding the present research. Written informed consents were obtained from the participants in both instances.

CRediT authorship contribution statement

NMG, DG, SB were involved in the study conception and design. LM and DMLG recruited the Chiari 1 malformation cohort and made bone mineral density measurements. NMG, MC, JDP and RR were involved in the design of the bone gene panel and the sequencing of the patients and relatives. The first draft of the manuscript was written by NMG, DG, SB, RR and all authors commented on previous versions of the manuscript and all authors read and approved the final version.

Declaration of competing interest

Núria Martínez-Gil, Leonardo Mellibovsky, Demian Manzano-Lopez Gonzalez, Juan David Patiño, Monica Cozar, Raquel Rabionet, Daniel Grinberg and Susanna Balcells, authors of the above-mentioned manuscript, jointly declare they hold no conflicts of interest regarding the research and results presented in it.

Acknowledgements

We thank Nurgül Atalay for technical assistance and the patients with Chiari malformation type 1 and their family for their enthusiastic participation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2022.101181>.

References

- Abbott, D., et al., 2018. Population-based description of familial clustering of Chiari malformation Type I. *J. Neurosurg.* 128, 460–465. <https://doi.org/10.3171/2016.9.JNS161274>.
- Alagille, D., et al., 1987. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J. Pediatr.* 110, 195–200. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(87\)80153-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(87)80153-1).
- Baldrige, D., et al., 2010. Generalized connective tissue disease in *Crtap*^{-/-} mouse. *PLoS One* 5, e10560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010560>.
- Barbiero, C., et al., 2015. Mutational characterization of the *P3H1/CRTAP*/CypB complex in recessive osteogenesis imperfecta. *Genet. Mol. Res.* 14, 15848–15858. <https://doi.org/10.4238/2015>.
- Barkovich, A.J., et al., 1986. Significance of cerebellar tonsillar position on MR. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 7, 795–799.
- Boyles, A.L., et al., 2006. Phenotypic definition of Chiari type I malformation coupled with high-density SNP genome screen shows significant evidence for linkage to regions on chromosomes 9 and 15. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 2776–2785. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31546>.
- Cordle, J., et al., 2008. Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. *J. Biol. Chem.* 283, 11785–11793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708424200>.
- Desvignes, J.P., et al., 2018. VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 46, W545–W553.
- Emerick, K.M., et al., 1999. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 29, 822–829. <https://doi.org/10.1002/hep.510290331>.
- Fric, R., Eide, P.K., 2020. Chiari type 1-a malformation or a syndrome? A critical review. *Acta Neurochir. (Wien)* 162, 1513–1525. <https://doi.org/10.1007/s00701-019-04100-2>.
- Gibson, F., et al., 1995. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* 374, 62–64. <https://doi.org/10.1038/374062a0>.
- Gonçalves, D., et al., 2019. Chiari malformation type I in a patient with a novel *NKX2-1* mutation. *J. Pediatr. Neurosci.* 14, 169–172. https://doi.org/10.4103/jpn.JPN_108_18.
- Gregson, C.L., et al., 2012. Sink or swim: an evaluation of the clinical characteristics of individuals with high bone mass. *Osteoporos. Int.* 23, 643–654. <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1603-4>.
- Gregson, C.L., et al., 2013. The high bone mass phenotype is characterised by a combined cortical and trabecular bone phenotype: findings from a pQCT case-control study. *Bone* 52, 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.10.021>.
- Hajdu, N., Kauntze, R., 1948. Cranio-skeletal dysplasia. *Br. J. Radiol.* 21, 42–48. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-21-241-42>.
- Hildebrand, M.S., et al., 2010. Variable hearing impairment in a *DFNB2* family with a novel *MYO7A* missense mutation. *Clin. Genet.* 77, 563–571. <https://doi.org/10.1111/j.1365-0004.2009.01344.x>.
- Holly, L.T., Batzdorf, U., 2019. Chiari malformation and syringomyelia. *J. Neurosurg. Spine* 31, 619–628. <https://doi.org/10.3171/2019.7.SPINE181139>.
- Ishikawa, Y., Bachinger, H.P., 2013. An additional function of the rough endoplasmic reticulum protein complex prolyl 3-hydroxylase 1: cartilage-associated protein cyclophilin B: the CXXX motif reveals disulfide isomerase activity in vitro. *J. Biol. Chem.* 288, 31437–31446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498063>.
- Lee, H.K., Deneen, B., 2012. *Dam2* is required for dorsal patterning via modulation of canonical Wnt signaling in the developing spinal cord. *Dev. Cell* 22, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.025>.
- Lee, H.K., et al., 2015. *Dam2*-*PIP5K* is a regulatory pathway for Wnt signaling and therapeutic target for remyelination in the CNS. *Neuron* 85, 1227–1243. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.024>.
- Little, R.D., et al., 2002. A mutation in the *LDL* receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 11–19. <https://doi.org/10.1086/338450>.
- Mani, P., et al., 2010. Visualizing canonical Wnt signaling during mouse craniofacial development. *Dev. Dyn.* 239, 354–363. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22072>.
- Marín-Padilla, M., Marín-Padilla, T.M., 1981. Morphogenesis of experimentally induced Arnold-Chiari malformation. *J. Neurol. Sci.* 50, 29–55. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(81\)90040-x](https://doi.org/10.1016/0022-510x(81)90040-x).
- Markunas, C.A., et al., 2013. Stratified whole genome linkage analysis of Chiari type I malformation implicates known Klippel-Feil syndrome genes as putative disease candidates. *PLoS One* 8, e61521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061521>.
- Markunas, C.A., et al., 2014. Genetic evaluation and application of posterior cranial fossa traits as endophenotypes for Chiari type I malformation. *Ann. Hum. Genet.* 78, 1–12. <https://doi.org/10.1111/ahg.12041>.
- Martínez-Gil, N., et al., 2020. Functional assessment of coding and regulatory variants from the *DKK1* locus. *J. Bone Min. Res.* 35, e10423. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.410423>.
- Martínez-Gil, N., et al., 2022. Wnt pathway extracellular components and their essential roles in bone homeostasis. *Genes (Basel)* 13, 138. <https://doi.org/10.3390/genes13010138>.
- Mavinkurve, G.G., et al., 2005. Familial Chiari type I malformation with syringomyelia in two siblings: case report and review of the literature. *Childs Nerv. Syst.* 21, 955–959. <https://doi.org/10.1007/s00381-005-1146-0>.
- McVie, J.W., Leonardo, J., 2014. Imaging of Chiari type I malformation and syringohydromyelia. *Neurol. Clin.* 32, 95–126. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2013.07.002>.
- Merello, E., et al., 2017. Exome sequencing of two Italian pedigrees with non-isolated Chiari malformation type I reveals candidate genes for cranio-facial development. *Eur. J. Hum. Genet.* 25, 952–959. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.71>.
- Milhorat, T.H., Chou, M.W., Trinidad, E.M., Kula, R.W., Mandell, M., Wolpert, C., Speer, M.C., 1999. Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* 44 (5), 1005–1017. <https://doi.org/10.1097/00006123-199905000-00042>.
- Mishina, Y., Snider, T.N., 2014. Neural crest cell signaling pathways critical to cranial bone development and pathology. *Exp. Cell Res.* 325, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.yescr.2014.01.019>.
- Morello, R., et al., 2006. *CRTAP* is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 127, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.039>.
- Nishikawa, M., et al., 1997. Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa. *J. Neurosurg.* 86, 40–47. <https://doi.org/10.3171/jns.1997.86.1.0040>.

- Piper, R.J., et al., 2019. Chiari malformations: principles of diagnosis and management. *BMJ* 8 (365), 11159. <https://doi.org/10.1136/bmj.11159>.
- Provenzano, A., et al., 2021. Chiari I malformation and exome sequencing in 51 trios: the emerging role of rare missense variants in chromatin-remodeling genes. *Hum. Genet.* 140, 625–647. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02231-6>.
- Rosenblum, J.S., et al., 2019. Chiari malformation type 1 in EPAS1-associated syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2819. <https://doi.org/10.3390/ijms20112819>.
- Sadler, B., et al., 2021. Rare and de novo coding variants in chromodomain genes in Chiari I malformation. *Am. J. Hum. Genet.* 108, 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.12.001>. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2021;108, 368. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2021;108, 530–531.
- Sarrion, P., et al., 2014. Genetic analysis of high bone mass cases from the BARCOS cohort of Spanish postmenopausal women. *PLoS One* 9, e94607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094607>.
- Sawin, P.D., Menezes, A.H., 1997. Basilar invagination in osteogenesis imperfecta and related osteochondrodysplasias: medical and surgical management. *J. Neurosurg.* 86, 950–960. <https://doi.org/10.3171/jns.1997.86.6.950>.
- Speer, M.C., et al., 2000. A genetic hypothesis for Chiari I malformation with or without syringomyelia. *Neurosurg. Focus* 8, E12. <https://doi.org/10.3171/foc.2000.8.3.12>.
- Speer, M.C., et al., 2003. Review article: Chiari type I malformation with or without syringomyelia: prevalence and genetics. *J. Genet. Couns.* 12, 297–311. <https://doi.org/10.1023/A:1023948921381>.
- Szewka, A.J., et al., 2006. Chiari in the family: inheritance of the Chiari I malformation. *Pediatr. Neurol.* 34, 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2005.09.008>.
- Urbizu, A., et al., 2013. Chiari malformation type I: a case-control association study of 58 developmental genes. *PLoS One* 8, e57241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057241>.
- Urbizu, A., et al., 2021. Rare functional genetic variants in COL7A1, COL6A5, COL1A2 and COL5A2 frequently occur in Chiari malformation type 1. *PLoS One* 16, e0251289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251289>.
- Valli, M., et al., 2012. Deficiency of CRTAP in non-lethal recessive osteogenesis imperfecta reduces collagen deposition into matrix. *Clin. Genet.* 82, 453–459. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01794.x>.
- Weil, D., et al., 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374, 60–61. <https://doi.org/10.1038/374060a0>.
- Welsh, I.C., et al., 2013. Integration of left-right Pitx2 transcription and Wnt signaling drives asymmetric gut morphogenesis via Daam2. *Dev. Cell* 26, 629–644. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.07.019>.
- Whyte, M.P., Reins, W.H., Mumm, S., 2004. High-bone-mass disease and LRP5. *N. Engl. J. Med.* 350, 2096–2099. <https://doi.org/10.1056/NEJM200405133502017> author reply 2096–9.
- Williams, D.S., Lopes, V.S., 2011. The many different cellular functions of MYO7A in the retina. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1207–1210. <https://doi.org/10.1042/BST0391207>.
- Xu, H., et al., 2020. Dental and craniofacial defects in the Crtpap-/- mouse model of osteogenesis imperfecta type VII. *Dev. Dyn.* 249, 884–897. <https://doi.org/10.1002/dvdy.166>.
- Yang, Y., et al., 2009. A FERM domain autoregulates Drosophila myosin 7a activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4189–4194. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808682106>.
- Zanotti, S., Canalis, E., 2016. Notch signaling and the skeleton. *Endocr. Rev.* 37, 223–253. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1002>.

Supplementary table 1. The 127 genes included in the in-house bone related panel

ACPS	CTSK	IKBKG	PLEKHM1	SNX10
ALPL	DAAM2	KCNJ1	PLOD2	SOST1
AMER1	DDX56	KDELR2	PLS3	SOX9
ANKH	DKK1	KREMEN	PLXNB2	SP7
ANOS	DMP1	LEMD3	PPIB	SPARC
AQP1	ENPP1	LEPROT	PTH1R	SPP1
ATAD3A	ESR1	LGR4	PTHLH	SPTBN1
ATP5F1A	ETS2	LMNA	PYCR1	SQSTM1
ATPIF1/ATP5IF1	FAM20C	LRP4	RANK/TNFRSF11A	STARD3NL
BGLAP	FAM210A	LRP5	RANKL/TNFSF11	TCIRG1
BMP1	FBXO7	LRP6	RIL/PDLIM4	TENT5A
BMP2	FDP5	MAFB	RIN3	TGFB1
BPGM	FGF23	MBL2	RPN2	TMEM135
CA2	FGFRL1	MBTPS2	RPS6KA5	TMEM38B
CADM1	FKBP10	MESD	RSP03	VDR
CALCA	FUBP3	MMP2	RUNX2	WDR89
CALCR	GALNT3	MMP9	SEC24D	WNT1
CASR	GFM1	MVD	SEM1	WNT16
CCDC170	GGPS1	MVK	SEPW1/SELENOW	ZMPSTE24
CD44	GJA1	MYO7A	SERPINF1	
CLCN5	GORAB	NOTCH2	SERPINH1	
CLCN7	GRB10	NSUN2	SFRP4	
COL1A1	IBSP	OPG/TNFRSF11B	SLC2A2	
COL1A2	IDI1	OSTM1	SLC34A3	
CREB3L1	IDUA	P3H1	SLC8A1	
CRTAP	IFIH1	P4HB	SLCO2B1	
CTNNB1	IFITM5	PHEX	SMAD9	

Supplementary Table 2. Variants found in the Chiari patients

Gene	BMD GWA S	OMIM DISEASE	Coseg.	Variant	CAD D	PP	PV	SIFT	MAF gnomAD	rs number
CH1										
<i>TENT5A</i>	Y	OI	NA	p.D132H	25.5	D	D	T	0.006119	rs138694074
CH2										
<i>SPP1</i> ¹	Y	N	N	p.R159L	27.3	D	D	D	0.00003182	rs138044863
<i>CRTAP</i>	N	OI	IP	p.L347F	24.3	D	D	D	0.001987	rs115198029
<i>DMP1</i> ²	Y	ARHR1	N	p.D478A	22.4	D	D	D	0.0003853	rs148156611
CH3										
<i>LRP5</i> ³	Y	OPPG, HBM, EVR4, PCLD4	NA	p.R1036Q	24.3	P	D	D	0.002446	rs61889560
<i>NOTCH2</i>	N	ALGS2; HJCYS	NA	p.V1064M	23.1	B	N	D	0.000003978	rs373969789
CH4										
<i>ANO5</i> ⁴	N	GDD, MMD3, LGMDR12	NA	p.G231V	25.4	D	D	T	0.0009705	rs137854523
<i>WNT16</i> ⁵	Y	N	NA	p.S260P	23.8	D	N	T	0.002061	rs116444834
<i>NOTCH2</i>	N	ALGS2; HJCYS	NA	p.R91L	22.1	P	N	T	0.008614	rs143195893
CH5										
<i>FKBP10</i>	Y	BRKS1, OI	NA	p.R556C	29	D	D	D	NA	NA
<i>SPTBN1</i> ⁶	Y	DDISBA	NA	p.D2004G	23.7	B	D	T	0.000007956	rs753842009
<i>SLC8A1</i>	Y	N	NA	p.R613H	15.76	P	N	T	0.003920	rs5556
<i>IDUA</i>	Y	MPS	NA	p.H82Q	15.01	D	D	T	0.002906	rs148775298
CH6										
<i>MMP2</i> ⁷	Y	MONA	NA	p.I520T	28.6	D	D	D	0.000003977	rs1413803169
<i>MMP9</i>	Y	MANDP2	NA	p.P81fs	NA	NA	NA	D*	NA	NA
<i>MYO7A</i> ⁸	N	DFN, USH1	NA	p.M2008fs	NA	NA	NA	D*	NA	NA
CH7										
<i>FKBP10</i>	Y	BRKS1; OI	N	p.I436T	28.8	D	D	D	0.002465	rs61749879
<i>DAAM2</i> ⁹	Y	NPHS24	N	p.P582H	22.2	P	N	D	0.001564	rs150676991

<i>DMP1</i> ²	Y	ARHR1	Y	p.L282I	8.14	P	N	D	0.005413	rs141979823
CH8										
<i>DAAM2</i> ⁹	Y	NPHS24	NA	p.R1049X	44	NA	NA	NA	0.00002014	rs759817118
<i>IFIH1</i>	N	AGS7; SGMRT1	NA	p.N812S	26.2	D	D	D	0.0001447	rs199638804
<i>FGFRL1</i>	Y	N	NA	p.R424L	24.7	D	N	D	0.01840	rs4647931
CH9										
<i>RPN2</i> ¹⁰	N	N	NA	p.G374D	24.4	P	N	T	0.01659	rs117475222
<i>PLOD2</i>	N	BRKS2	NA	p.M376I	23.5	P	B	T	NA	NA
<i>COL1A1</i>	Y	OI; EDSARTH1; CAFYD	NA	p.A1075T	20.9	NA	NA	NA	0.0171	rs1800215
CH10										
<i>BMP1</i>	N	OI	IP	p.R371H	28.2	D	D	D	0.004046	rs145284541
<i>WNT16</i> ⁵	Y	N	Y	p.R222C	27.8	D	D	D	0.00001995	rs773948299
CH11										
<i>MYO7A</i> ⁸	N	DFN; USH1	NA	p.R654C	29.1	D	D	D	0.0001296	rs201928014
<i>DAAM2</i> ⁹	Y	NPHS24	NA	p.P582H	22	P	N	D	0.001564	rs150676991
CH12										
<i>CRTAP</i>	N	OI	NA	p.C243G	25.1	D	D	D	NA	NA
<i>FDPS</i> ¹¹	N	POROK	NA	p.V364A	23.1	B	D	T	0.01584	rs41314549
<i>MVD</i>	Y	POROK	NA	p.N278H	22.9	P	D	D	0.002695	rs34519538

In blue, genes with variants in more than one patient; ¹ NM_001040058.2; ² NM_004407.4; ³ NM_002335.4; ⁴ NM_213599.3; ⁵ NM_057168.2; ⁶ NM_003128.3; ⁷ NM_004530.6; ⁸ NM_000260.4; ⁹ NM_001201427.2; ¹⁰ NM_002951.5; ¹¹ NM_002004.4; BMD GWAS: Genes associated with BMD in GWAS; Y: Yes; N: No; OMIM DISEASE: Gene associated with human diseases in OMIM; N: No; OI: Osteogenesis imperfecta; ARHR1: Hypophosphatemic rickets, autosomal recessive, 1; OPPG: Osteoporosis-pseudoglioma syndrome; HBM: High bone mass; EVR4: Exudative vitreoretinopathy 4; PCLD4: Polycystic liver disease 4 with or without kidney cysts; ALGS2: Alagille syndrome 2; HJCYS: Hajdu-Cheney syndrome; GDD: Gnathodiaphyseal dysplasia; MMD3: Miyoshi muscular dystrophy 3; LGMDR12: Muscular dystrophy, limb-girdle, autosomal recessive 12; BRKS2: Bruck syndrome 2; DDISBA: Developmental delay, impaired speech, and behavioral abnormalities; MPS: Mucopolysaccharidosis; MONA: Multicentric osteolysis, nodulosis, and arthropathy; MANDP2: Metaphyseal anadysplasia 2; DFN: Deafness; USH1: Usher syndrome, type 1B; NPHS24: Nephrotic syndrome, type 24; AGS7: Aicardi-goutieres syndrome 7; SGMRT1: Singleton-merten syndrome 1; EDSARTH1: Ehlers-danlos syndrome, arthrochalasia type, 1; CAFYD: Caffey disease; POROK: Porokeratosis. Coseg. Cosegregation in the available families (CH2, CH7, CH10): Y:Yes: Variant present in other C1M cases in the family and/or absent in healthy family members; IP: incomplete penetrance: variant

found in a healthy family member; N: NO; variant absent in other C1M cases in the family; CADD: <http://cadd.gs.washington.edu>; PP: Polyphen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; D: Probably damaging; B: Benign; NA: Not available; PV: PROVEAN <http://provean.jcvi.org/>; D: Deleterious; N: Neutral; NA: Not available; SIFT: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>; D: Deleterious; T: Tolerated; NA: Not available; +: Tested with SIFT indels https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_indels2.html; MAF: minor allele frequency from gnomAD V2.1.1.

