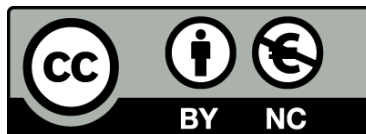




Estudio genético de dos fenotipos óseos: osteochondromatosis múltiple y alta masa ósea

Patricia Sarrión Pérez-Caballero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**

ESTUDIO GENÉTICO DE DOS FENOTIPOS ÓSEOS: OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE Y ALTA MASA ÓSEA

Memoria presentada por
Patricia Sarrión Pérez-Caballero

para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Barcelona
Programa de Genética
Departamento de Genética

Tesis realizada bajo la dirección del **Dr. Daniel Grinberg Vaisman** y la **Dra. Susana Balcells Comas** en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona

Dr. Daniel Grinerg Vaisman

Dra. Susana Balcells Comas

Patricia Sarrión Pérez-Caballero
Barcelona, 2013

INTRODUCCIÓN.....	1
I. INTRODUCCIÓN GENERAL: EL TEJIDO ÓSEO	3
1. TEJIDO ÓSEO: DEFINICIÓN Y FUNCIONES	3
2. LOS HUESOS: MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA	3
3. TIPOS DE TEJIDO ÓSEO	6
4. COMPONENTES DEL TEJIDO ÓSEO	6
4.1. Matriz extracelular	7
4.2. Células	7
4.2.1. Osteoblastos	7
4.2.2. Osteocitos	8
4.2.3. Osteoclastos	9
5. FORMACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO	9
5.1. Osificación membranosa	10
5.2. Osificación endocondral	10
6. REMODELADO ÓSEO	15
6.1. Regulación del remodelado óseo	16
7. DENSIDAD MINERAL ÓSEA	16
7.1. <i>T-score</i>	17
7.2. <i>Z-score</i>	18
8. ENFERMEDADES GENÉTICAS Y OTROS FENOTIPOS ÓSEOS	18
II. OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE HEREDITARIA	19
1. CLÍNICA	19
1.1. Osteocondromas	19
1.2. Osteocondromatosis múltiple <i>versus</i> osteocondroma solitario	20
1.3. Otros fenotipos patológicos relacionados	21
2. GENÉTICA DE LA OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE	21
2.1. Perspectiva histórica	21
2.2. <i>EXT1</i>	23
2.3. <i>EXT2</i>	23
2.4. Formación del heparán sulfato	24

2.5. Hipótesis sobre el desarrollo de los osteocondromas	26
2.6. Estudios mutacionales previos	27
3. MODELOS ANIMALES	29
3.1. Modelos no mamíferos	29
3.2. Modelos murinos	30
4. TRATAMIENTO	31
III. FENOTIPO DE ALTA MASA ÓSEA	32
1. ASPECTOS HISTÓRICOS	32
2. CONDICIONES CON ELEVADA DMO	34
3. LA VÍA DE WNT Y SU FUNCIÓN EN EL HUESO	35
3.1. <i>LRP5</i> : estructura y expresión	37
3.2. Regulación canónica de la β -catenina	39
3.3. Inhibidores de <i>LRP5</i>	40
3.3.1. Esclerostina	41
3.3.2. Dickkopf 1	41
3.4. Modelos de actuación de la vía de Wnt	43
4. HBM EN LA POBLACIÓN GENERAL: ¿CONDICIÓN MONOGÉNICA O MULTIFACTORIAL?	45
OBJETIVOS	47
OBJETIVOS DE LA TESIS	49
Osteocondromatosis múltiple	49
Fenotipo de alta masa ósea	49
RESULTADOS	51
INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LAS PUBLICACIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL	53
CAPÍTULO 1. OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE	57

ARTÍCULO 1. Mutaciones en los genes <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> en pacientes españoles con osteocondromatosis múltiple	57
ARTÍCULO 2. Una nueva mutación <i>nonsense</i> en el gen <i>EXT1</i> en un paciente argentino con Exostosis Múltiple Hereditaria	67
ARTÍCULO 3. Amplio espectro de cambios genómicos en pacientes <i>EXT1/EXT2</i> -CDG latinoamericanos con CDG por <i>EXT1/EXT2</i> que presentan un fenotipo severo de osteocondromatosis múltiple	75
CAPÍTULO 2. ALTA MASA ÓSEA	103
ARTÍCULO 4. Una aproximación genómica y transcripcional al fenotipo de Alta Masa Ósea: evidencias de heterogeneidad y del efecto aditivo de <i>TWIST1</i> , <i>IL6R</i> , <i>DLX3</i> y <i>PPARG</i>	103
DISCUSIÓN.....	131
I. ANÁLISIS MUTACIONAL Y TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR	133
II. OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE	137
1. FRECUENCIAS MUTACIONALES DE <i>EXT1</i> Y <i>EXT2</i>	137
2. CORRELACIONES FENOTIPO-GENOTIPO	140
3. CASOS EN LOS QUE NO SE HA ENCONTRADO LA MUTACIÓN CAUSAL	144
4. MODELO CELULAR DE OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE	146
III. ALTA MASA ÓSEA	148
1. EL ESTUDIO DE LA ALTA MASA ÓSEA PARA AVANZAR EN EL ESTUDIO DE LA OSTEOPOROSIS	148
2. ALTA MASA ÓSEA ¿MONOGÉNICA, COMPLEJA O AMBAS?	149
CONCLUSIONES	155
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	159

ABREVIATURAS

DMO	densidad mineral ósea
DXA	densitometría de rayos X de energía dual
FN	<i>femoral neck</i> , cuello de fémur o cadera
GAG	glucosaminoglucano
GWA	<i>genome-wide association</i>
HBM	<i>high bone mass</i> , fenotipo de alta masa ósea
HS	heparán sulfato
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i> , receptor de lipoproteínas de baja densidad
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> , pérdida de heterocigosidad
LRP5	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i> , proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
LS	<i>lumbar spine</i> , columna lumbar
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> , amplificación múltiple dependiente de la ligación de sondas
MO	<i>multiple osteochondromas</i> , osteocondromatosis múltiple
QTL	<i>quantitative trait locus</i> , locus de rasgo cuantitativo
RANK	miembro 11A de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral
RANKL	ligando de RANK
SO	<i>solitary osteochondroma</i> , osteocondroma solitario

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN GENERAL: EL TEJIDO ÓSEO

1. TEJIDO ÓSEO: DEFINICIÓN Y FUNCIONES

El tejido óseo es un tipo altamente especializado de tejido conectivo que, junto con el cartílago, constituye el sistema esquelético de los vertebrados. Se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión.

Las principales funciones del tejido óseo son: mecánica, sirviendo de soporte a músculos, órganos y tejidos blandos y permitiendo así el movimiento; de protección de la médula ósea y de órganos vitales; y metabólica, por la regulación homeostática mineral sobre todo de fósforo y calcio (Harada y Rodan, 2003). Además permite que se lleve a cabo la hematopoyesis, ya que aloja a la médula ósea.

2. LOS HUESOS: MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

Los huesos se clasifican según su morfología en huesos largos, cortos, planos e irregulares (Rosell et al., 2001). Los huesos largos son los que tienen una longitud mayor que las otras dos dimensiones. Se encuentran en el esqueleto apendicular (por ejemplo fémur, húmero, falanges, etc.). Los huesos cortos presentan dimensiones similares de longitud, anchura y grosor. Su principal función es amortiguar los choques. A este grupo pertenecen por ejemplo los carpos de las manos y los tarsos de los pies. Los huesos planos son delgados y anchos, protegen los órganos que cubren y permiten la inserción de grandes masas musculares. Son ejemplos el omóplato, huesos del cráneo y la pelvis. Los huesos irregulares tienen formas variadas y desarrollan distintas funciones según la parte del esqueleto en que se encuentren, como por ejemplo las vértebras, el esternón y los huesos del oído (Figura 1. A).

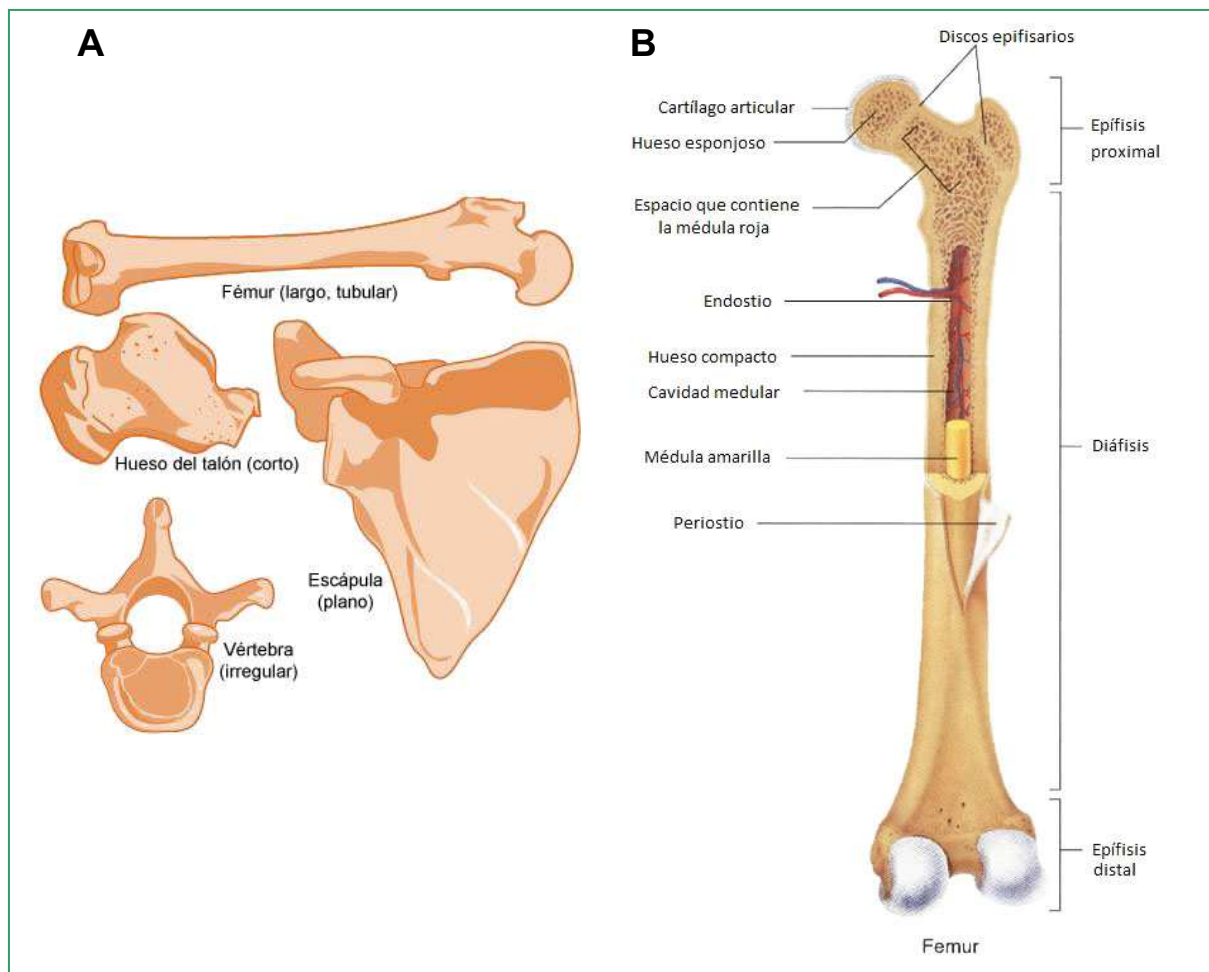


Figura 1. A. Tipos de huesos según su morfología. **B.** Estructura e histología de los huesos largos. (Adaptado de <http://www.sirinet.net/~jgjohnso/skeletonorg.html>).

Los huesos largos del esqueleto maduro están constituidos por un tallo o diáfisis y dos extremos expandidos o epífisis. Las epífisis están separadas de la diáfisis por la metafisis, que está ocupada por el cartílago de crecimiento formando lo que se denomina placa de crecimiento o epifisaria (Figura 1. B). Esta placa epifisaria permite al hueso aumentar de longitud progresivamente. Una vez que termina el crecimiento, el cartílago es sustituido por hueso (Ross y Pawlina, 2008).

La superficie externa de los huesos está revestida por una capa densa fibrosa, el periostio, excepto en las regiones articulares que estarían recubiertas por cartílago hialino o articular (Figura 1.B). El periostio que tapiza hueso en crecimiento activo está compuesto por una capa de tejido conectivo fibroso externa y por una capa interna que contiene células osteoprogenitoras. Las cavidades del hueso esponjoso y los canales están revestidos por una membrana, el endostio. Es una delicada capa fibrosa de tejido conectivo que contiene células osteoprogenitoras, osteoblastos y algunos osteoclastos (Figura 2). Tanto el endostio como el periostio son los responsables del crecimiento, la remodelación continua y la reparación de las fracturas óseas (Ross y Pawlina, 2008; Welsch, 2010).

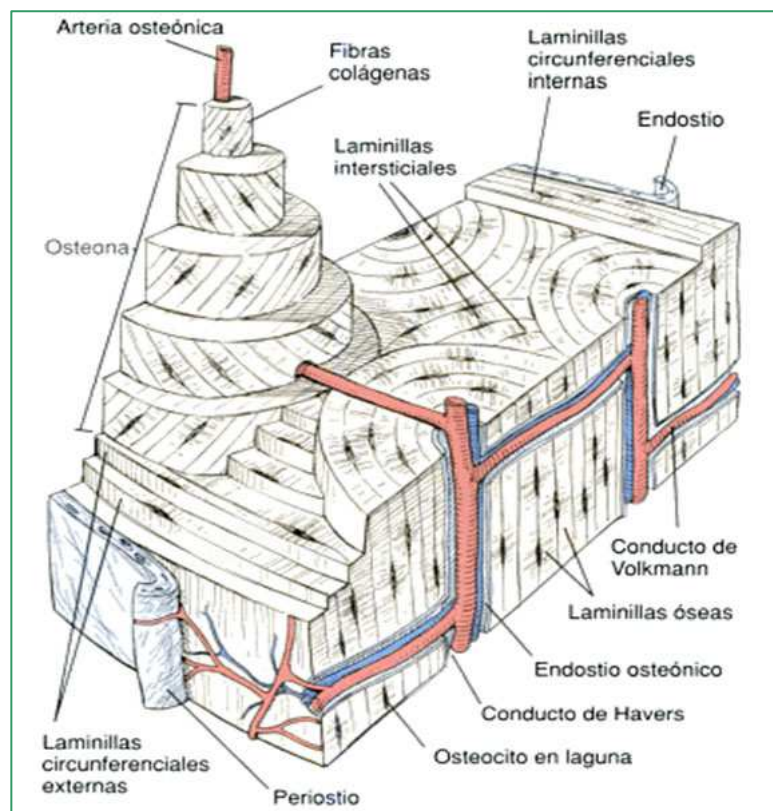


Figura 2. Diagrama tridimensional de un bloque de hueso compacto de la diáfisis de un hueso largo (adaptado de Ross et al. 2008).

3. TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

Según la densidad de la matriz extracelular se distinguen dos tipos de tejido óseo: cortical o compacto en el que la matriz es muy densa y sin cavidades, y trabecular o esponjoso donde la matriz presenta numerosas oquedades que le da un aspecto laxo de matriz porosa (Welsch, 2010).

El hueso cortical es el responsable de la actividad mecánica, ocupa casi todo el espesor de las diáfisis y también se encuentra en la parte externa de las epífisis de los huesos largos y del resto de huesos del cuerpo. Por otro lado, el hueso trabecular, encargado de mantener la homeostasis mineral y que alberga la médula ósea roja, se localiza principalmente en el centro de las epífisis de los huesos largos, aunque todos los huesos albergan una pequeña cantidad en su región interna (Ross y Pawlina, 2008).

La estructura histológica del tejido óseo consiste en laminillas de matriz ósea que se distribuyen de manera concéntrica alrededor de un canal central, el conducto de Havers, formando una estructura cilíndrica que se denomina osteona o sistema de Havers. Estas osteonas se distribuyen longitudinalmente siguiendo las líneas de tensión a las que está sometido el hueso. Los canales de Havers contienen vasos sanguíneos, linfáticos y nervios y se conectan de forma transversal con los canales de osteonas cercanas, el endostio y el periostio mediante los denominados canales de Volkmann (Ross y Pawlina, 2008).

4. COMPONENTES DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo está compuesto por distintas células y componentes extracelulares calcificados que forman la matriz ósea.

4.1. Matriz extracelular

La matriz extracelular del tejido óseo está formada por una fracción orgánica que representa el 30% de su peso seco y el 70% restante corresponde a las sales minerales que se depositan en ella. El componente mineral del hueso consiste fundamentalmente en calcio y fósforo en forma de cristales de hidroxiapatita que se conjugan con una pequeña porción de carbonato de magnesio, iones de sodio y de potasio. Estos cristales de hidroxiapatita, al depositarse entre las fibras de colágeno, son los responsables de la mineralización del tejido óseo, su dureza y resistencia (Welsch, 2010).

El colágeno tipo I es el componente principal (90%) de la fracción orgánica de la matriz extracelular ósea y el resto (10%) está constituido por los proteoglicanos de la sustancia fundamental y un grupo de moléculas no colagénicas que intervienen en la regulación de la mineralización del hueso. La sustancia fundamental de la matriz ósea posee una concentración menor de proteoglicanos que la del cartílago, y están compuestos fundamentalmente por los glucosaminoglicanos condroitín sulfato y ácido hialurónico, organizados en agregados (Ross y Pawlina, 2008).

4.2. Células

4.2.1. Osteoblastos

Son las células secretoras formadoras de la matriz ósea no mineralizada, el osteoide, e intervienen en su calcificación. Se caracterizan por su forma cúbica, su distribución monoestratificada en la superficie de la matriz y por tener un citoplasma abundante, un núcleo grande y claro, un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado, muchos ribosomas libres y un gran aparato de Golgi debido a la gran cantidad de proteínas que sintetizan. Los osteoblastos están conectados mediante uniones en hendidura (*gap junctions*). Los nexos celulares y

estas uniones permiten que las células adyacentes del tejido óseo se comuniquen (de la Mata Llord, 1997).

Los osteoblastos se diferencian a partir de células madre mesenquimales (MSC) que se encuentran en la médula ósea y que también pueden diferenciarse dando lugar a mioblastos, condrocitos y adipocitos. Lo que hace que las MSC se diferencien hacia osteoblastos en vez de hacia otros tipos celulares es la presencia de determinados factores de crecimiento, factores de transcripción y hormonas como Runx2, BMPs, el sistema Wnt/LRP5, etc. Los osteoblastos una vez diferenciados pueden entrar en apoptosis o bien madurar y dar lugar a osteocitos y a células del revestimiento. Estas células planas, alargadas e inactivas que cubren las superficies óseas, además de su papel metabólico, tienen la capacidad de volver a diferenciarse a osteoblastos.

4.2.2. Osteocitos

Son osteoblastos diferenciados al quedar atrapados en espacios de la matriz ósea mineralizada. Los osteocitos son células planas, con poco retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi pequeño. Son los responsables del mantenimiento de la matriz ósea. Están situados en lagunas de dicha matriz y mediante sus múltiples prolongaciones establecen nexos con prolongaciones de osteocitos contiguos. Esto permite el intercambio de electrolitos y moléculas pequeñas entre ellos y el flujo de sustancias desde los osteoblastos de la superficie (Checa Vizcaíno et al., 2009).

Una de las funciones de los osteocitos es la mecanotransducción, por la cual la célula responde a fuerzas mecánicas aplicadas al hueso. Diferentes estímulos mecánicos, como la falta de gravedad o el aumento de la carga mecánica, alteran el mecanismo apoptótico celular y la expresión génica que inducen la diferenciación de nuevos osteoblastos para la remodelación del hueso. Los osteocitos pueden sintetizar matriz nueva y también resorberla, aunque en un grado limitado. Estos procesos contribuyen de manera importante a la homeostasis del calcio en sangre (Ross y Pawlina, 2008).

4.2.3. Osteoclastos

Los osteoclastos son células fagocitarias multinucleadas grandes que se encargan de la resorción ósea. Se forman por fusión de células precursoras de monocitos y macrófagos de la médula ósea que se diferencian a partir de células madre hematopoyéticas debido a factores pre-osteoclásticos como M-CSF (factor estimulador de colonias), TNF (factor de necrosis tumoral), IL (interleucinas) y RANKL (ligando de RANK).

Los osteoclastos se sitúan en la superficie de la matriz ósea, en depresiones reabsorbidas, las lagunas de Howship. La parte de la membrana del osteoclasto en contacto con el hueso se caracteriza por formar finas microvellosidades que constituyen el borde fruncido y que contiene gran cantidad de mitocondrias y lisosomas. En el límite de este borde fruncido los osteoclastos se encuentran muy adosados a la matriz ósea, y se adhieren a sus componentes a través de integrinas especiales de membrana, osteopontinas y filamentos de actina. Así se crea una zona de sellado, el compartimento subosteoclástico, que limita funcionalmente el espacio debajo del borde fruncido y es donde se produce la resorción de la matriz.

5. FORMACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo se forma mediante la sustitución del tejido conectivo preexistente. Esta sustitución se puede llevar a cabo por dos procesos diferentes según cuál sea el tejido conectivo que se reemplace: mediante osificación membranosa cuando es tejido mesenquimatoso; o mediante osificación endocondral cuando es cartílago. Estos dos tipos de osificación sólo hacen referencia al mecanismo inicial de formación del hueso. En el caso del remodelado, el tejido óseo inicialmente depositado es sustituido por tejido óseo definitivo, idéntico en ambos casos (Ross y Pawlina, 2008).

5.1. Osificación membranosa

Los huesos de la bóveda del cráneo, el maxilar y la mayor parte de la mandíbula se originan por osificación membranosa. En este proceso el tejido óseo se crea por un proceso lento de sustitución del mesénquima primitivo por matriz ósea. Las células mesenquimáticas características se concentran en los centros de osificación provistos de vasos abundantes y allí se diferencian continuamente a osteoblastos. Los osteoblastos forman asociaciones aplanadas y al principio secretan el osteoide que contiene sobre todo proteoglicanos, glucoproteínas y colágeno tipo I. A continuación este osteoide se calcifica pero siempre persiste un reborde estrecho de osteoide no calcificado. Así se van formando las trabéculas óseas finas que al ir haciéndose más gruesas atrapan a los osteoblastos que se convertirán en osteocitos conectados con los osteoblastos de la superficie. Las trabéculas van aumentando de tamaño y se unen en una red trabecular que adquiere la configuración del hueso en desarrollo (Welsch, 2010).

5.2. Osificación endocondral

Los huesos largos, las vértebras, la pelvis y los huesos de la base del cráneo se forman sobre un molde de cartílago que es sustituido progresivamente por hueso mediante el proceso de osificación endocondral (Figura 3-1).

La osificación endocondral es un método de formación de hueso que permite a éste soportar las tensiones funcionales durante su crecimiento y que se observa mejor durante el desarrollo de los huesos largos. También es éste el proceso mediante el que se forman los osteocondromas, tumores óseos presentes en la osteocondromatosis múltiple que se estudiará más adelante en el presente trabajo.

En primer lugar, se forma un molde pequeño del hueso largo con cartílago hialino sólido que experimenta un crecimiento fundamentalmente aposicional hasta dar lugar a una masa de cartílago alargada, con forma de reloj de arena,

consistente en un tallo (diáfisis) y las futuras regiones articulares (epífisis) rodeadas por el pericondrio.

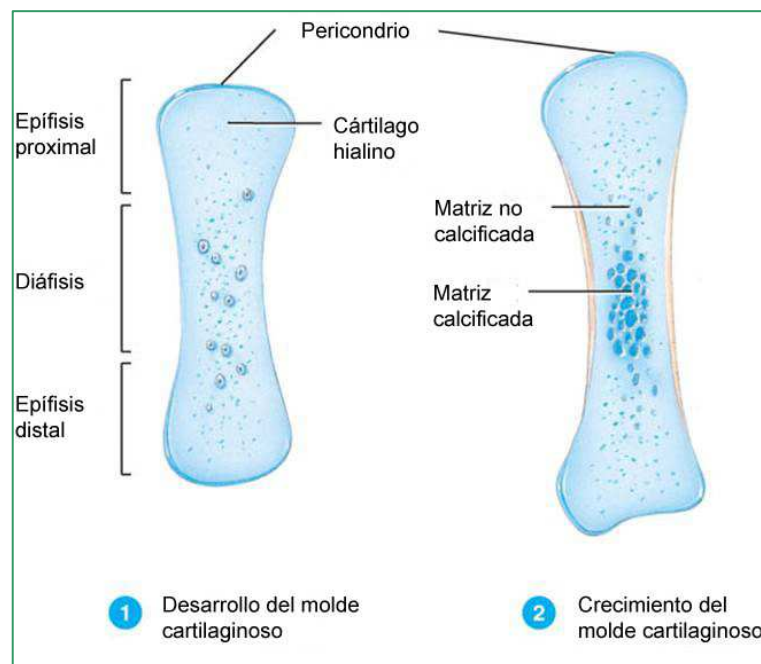


Figura 3. Fases de la osificación endocondral. 1) Desarrollo del molde cartilaginoso. 2) Crecimiento del molde cartilaginoso (adaptado de <http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch06/ch06.htm>).

En el interior de la diáfisis del molde cartilaginoso, los condrocitos aumentan mucho de tamaño y reabsorben la matriz que los rodea, de forma que sólo dejan una matriz cartilaginosa de delgadas trabéculas perforadas. Después, esta matriz se calcifica impidiendo la difusión de las sustancias nutritivas y los condrocitos degeneran, abriendo grandes espacios comunicantes (Figura 3-2). Durante este período, el pericondrio de la diáfisis desarrolla potencial osteogénico y asume la función de periostio que, inmediatamente, deposita una fina capa de hueso alrededor de la superficie de la diáfisis (Figura 3-2). Al mismo tiempo, las células mesenquimales primitivas y los vasos sanguíneos invaden los espacios dejados por los condrocitos degenerados de la diáfisis. Las células mesenquimales primitivas se diferencian a osteoblastos y a células hematopoyéticas de la médula ósea. Los osteoblastos forman una capa de células sobre la superficie de los restos

calcificados de la matriz cartilaginosa, con lo que se inicia la formación de hueso irregular no laminar.

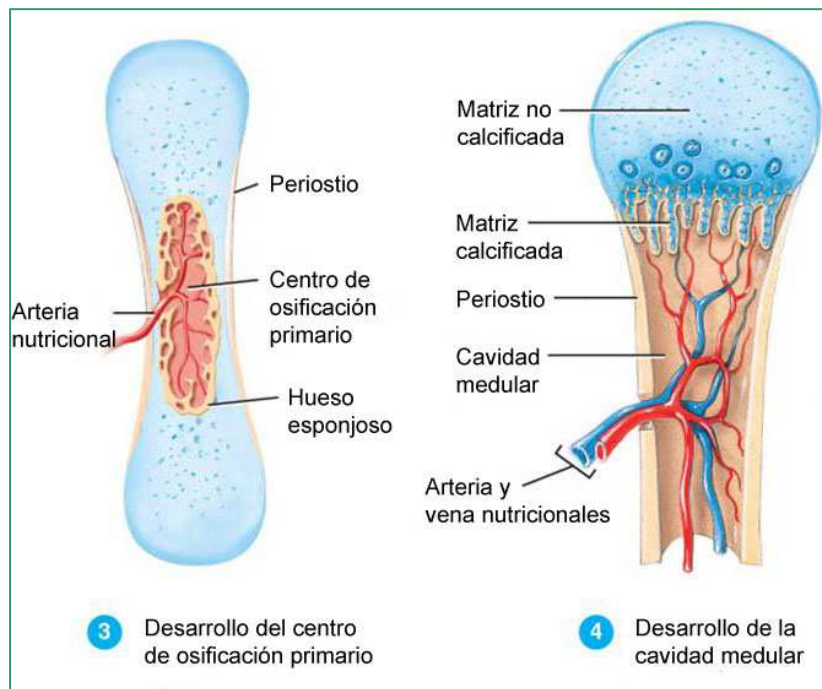


Figura 4. Fases de la osificación endocondral. 3) Desarrollo del centro de osificación primario. 4) Desarrollo de la cavidad medular (adaptado de <http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch06/ch06.htm>).

Los extremos del molde original de cartílago quedan así separados de la diáfisis por una gran zona de osificación primaria (Figura 4-3). El diámetro de estos extremos cartilagosos continúa creciendo. Entre tanto, el cartílago de los extremos de la diáfisis experimenta cambios regresivos seguidos de osificación, que hace que el hueso en desarrollo consista ahora en una diáfisis ósea alargada con una epífisis cartilaginosa semilunar en cada uno de sus extremos. Las regiones entre la diáfisis y cada una de las epífisis terminales constituyen las placas de crecimiento o epifisarias (Figura 4-3). En estas placas de crecimiento se pueden distinguir 4 zonas según la distribución y características de los condrocitos (Figura 5):

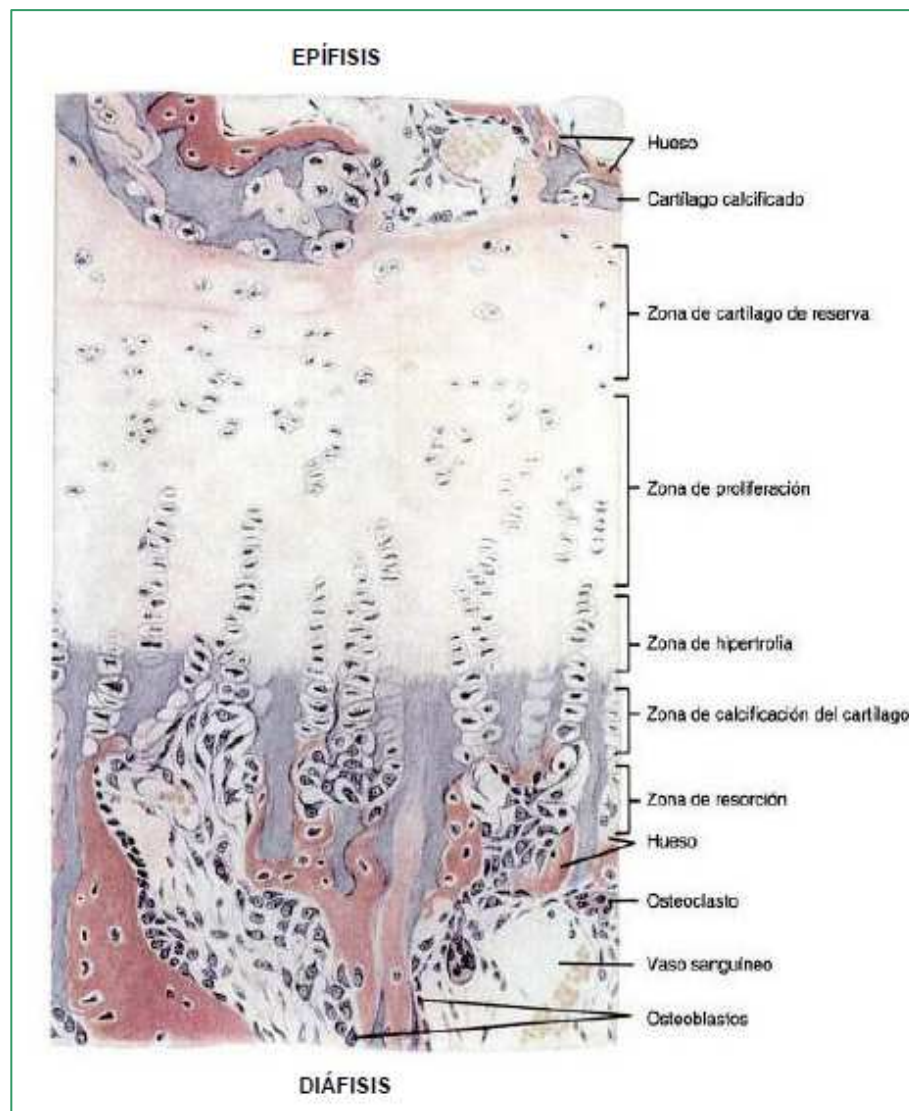


Figura 5. Placa de crecimiento del hueso y sus distintas zonas (adaptado de Ross 2008).

- **Germinal.** Los condrocitos se dividen con poca frecuencia, actuando como precursores de la zona proliferativa.
- **Proliferativa.** Contiene condrocitos que se dividen activamente. En la región que está más cerca de la diáfisis, las células de esta zona están organizadas en columnas, mientras que en la región más próxima a la epífisis están agrupadas.
- **Hipertrófica.** Aquí los condrocitos tienen un tamaño mucho mayor que los de la zona proliferativa. Los condrocitos hipertrofiados sintetizan una matriz especializada necesaria para la formación de hueso por parte de

los osteoblastos. Las células de esta zona secretan un factor de crecimiento que estimula la angiogénesis, permitiendo el ingreso de vasos sanguíneos a la placa de crecimiento y garantizando el suministro de nutrientes.

- De mineralización. Esta zona está en contacto con el frente de osificación. En ella se forman los espacios para que células osteoprogenitoras se alojen junto con las ramas vasculares.

En esta placa de crecimiento, el cartílago prolifera de manera continua provocando el alargamiento progresivo del hueso. En la parte diafisaria de cada placa de crecimiento, los condrocitos maduran y mueren y la zona de cartílago que degenera va siendo sustituida por hueso. De esta forma, la diáfisis ósea se alarga y las placas de crecimiento se van separando progresivamente.

Por otro lado, en el centro de la masa de cartílago de cada epífisis, cuando penetran los vasos sanguíneos, se producen cambios y formaciones de hueso similares a las del cartílago diafisario, junto con crecimiento aposicional del cartílago en toda la superficie externa de la diáfisis. Son los centros de osificación secundarios (Figura 6-5). En la superficie queda siempre una fina zona de cartílago hialino como cartílago articular (Figura 6-5).

Bajo la influencia de las tensiones funcionales, los restos de cartílago calcificado y el hueso no laminar irregular adyacente sufren una remodelación completa hasta que el hueso queda constituido en su totalidad por una capa externa compacta con una médula de hueso esponjoso.

Cuando el individuo alcanza la madurez sus cambios hormonales inhiben la proliferación del cartílago y las placas de crecimiento son sustituidas por hueso, con la consiguiente fusión entre la diáfisis y las epífisis. Además, el hueso esponjoso se reabsorbe casi por completo, dejando un gran espacio medular lleno de médula ósea (Figura 6-6).

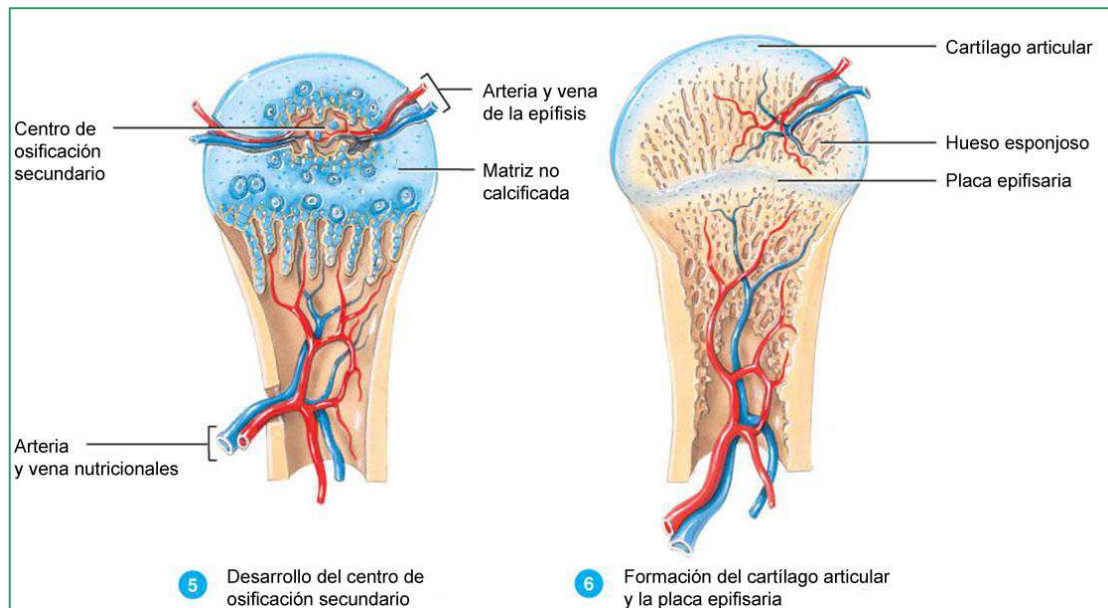


Figura 6. Fases de la osificación endocondral. 5) Desarrollo del centro de osificación secundario. 6) Formación del cartilago articular y la placa epifisaria (adaptado de <http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch06/ch06.htm>).

6. REMODELADO ÓSEO

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y resorción, lo que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Este fenómeno cíclico y equilibrado denominado proceso de remodelado permite la renovación de un 5-10% del hueso total al año (Arnett, 2004). El remodelado óseo ocurre durante toda la vida adulta, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo. En la treintena se alcanza la máxima masa ósea, que se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí, existe un predominio de la resorción y la masa ósea empieza a disminuir (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006).

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en las unidades básicas multicelulares (BMUs, del inglés *basic multicellular units*), donde los osteoclastos

reabsorben una cantidad determinada de hueso y los osteoblastos forman la matriz osteoide y la mineralizan para rellenar la cavidad previamente creada. En estas unidades hay osteoclastos, macrófagos, preosteoblastos y osteoblastos regidos por una serie de factores, tanto generales como locales, permitiendo el normal funcionamiento del hueso y el mantenimiento de la masa ósea. Cuando este proceso se desequilibra aparecen las patologías óseas (Janssens y Van Hul, 2002; González, 2004; Robling et al., 2006).

6.1. Regulación del remodelado óseo

El remodelado óseo está ampliamente regulado a través de distintos factores genéticos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales como los factores de crecimiento y las citoquinas (Hill, 1998). Algunos de los factores más importantes en este remodelado son las hormonas calciotrópicas que regulan el metabolismo del calcio, las hormonas sexuales que tienen un efecto antirresortivo, los factores de crecimiento de tipo TGF que estimulan la formación ósea, y las citoquinas de la familia IL6 que favorecen la osteoclastogénesis (Jilka et al., 1992).

Otros elementos de regulación del remodelado óseo son el estrés mecánico y el sistema nervioso. La falta de presión mecánica produce un aumento drástico del recambio óseo y como consecuencia una disminución de la masa ósea (Robling et al., 2006). En cambio, la formación de hueso se acelera en regiones esqueléticas de alto estrés mecánico. Se sabe que el remodelado óseo está regulado mediante el sistema nervioso central a través de la leptina (Ducy et al., 2000) y mediante el sistema nervioso simpático y los receptores adrenérgicos (Takeda et al., 2002).

7. DENSIDAD MINERAL ÓSEA

La densidad mineral ósea es un término médico que hace referencia a la cantidad de minerales, en gramos, que contiene un centímetro cuadrado de hueso, principalmente fósforo y calcio. La DMO se usa en medicina clínica como un indicador indirecto de osteoporosis y riesgo de fractura. Esta densidad ósea no es

la verdadera "densidad" del hueso, la cuál sólo se puede determinar mediante una tomografía computerizada cuantitativa y se debería medir en masa por volumen.

La DMO está determinada genéticamente en un 60-90% (Duncan et al., 2011), pero además puede verse modificada por distintos factores que pueden ser positivos o negativos. Por ejemplo, alteraciones en el proceso de crecimiento óseo y de consolidación pueden dar como resultado una baja DMO por formación ósea inadecuada. En cambio, en etapas posteriores de la vida, una baja densidad ósea se puede atribuir a incrementos en la tasa de resorción ósea. Por tanto, los factores que afectan a la DMO son las variables que alteran las tasas de formación y resorción óseas, como la constitución genética (Styrkarsdottir et al., 2008; Rivadeneira et al., 2009; Styrkarsdottir et al., 2009), las hormonas sexuales (Kanellakis et al., 2012), la edad (Melton et al., 1982; Riggs et al., 2002), el ejercicio (Zanchetta y Talbot, 2001), la ingesta de calcio (Cumming, 1990), etc.

La DMO se mide mediante densitometría ósea y se puede realizar con rayos X, ultrasonidos o isótopos radiactivos. La densitometría de rayos X de doble energía es lo que se conoce como DXA (del Río, 2004). Normalmente mediante esta técnica no invasiva se toman medidas de la región lumbar de la columna vertebral (LS, del inglés *lumbar spine*) y la parte alta de cadera o cuello de fémur (FN, del inglés *femoral neck*) (Cole, 2008). La densidad de estas localizaciones óseas de un individuo es comparada con un valor poblacional promedio que tiene en cuenta la edad y el sexo, obteniéndose una nueva variable relativa, que permite determinar el riesgo de fracturas y osteoporosis en un individuo. Estos valores relativos normalmente se expresan en forma de *T-score* y *Z-score*. Estos estadísticos indican el número de desviaciones estándar que la DMO varía del promedio.

7.1. *T-score*

El *T-score* se obtiene al comparar la DMO de una persona con el promedio de DMO óptima (a los 30 años) de la población sana para el mismo género y etnia. Es el número de desviaciones estándar por encima o por debajo de la DMO promedio.

Este estadístico se usa en mujeres postmenopáusicas y en varones de 50 años o más. Un T-score entre -1 y -2.5 se considera osteopénico y un valor menor de -2.5 es un indicativo de osteoporosis (WHO, 2003).

7.2. Z-score

El Z-score es el número de desviaciones estándar que resultan de comparar la DMO de una persona con el promedio de los valores considerados normales para su edad, género y etnia. Este estadístico es útil para determinar si existe algo inusual contribuyendo al metabolismo óseo. El Z-score se calcula en mujeres premenopáusicas, varones menores de 50 años y jóvenes (National Guideline, 2010). En el presente trabajo se usará el valor de Z-score para definir el fenotipo de alta masa ósea estudiado.

8. ENFERMEDADES GENÉTICAS Y OTROS FENOTIPOS ÓSEOS

Como se ha visto anteriormente, el mantenimiento de la homeostasis ósea es muy importante. Se pueden producir desequilibrios entre resorción y formación ósea por alteraciones tanto en la función osteoblástica como en la osteoclástica, debidas a cambios hormonales, sobreproducción de citoquinas inflamatorias o factores de crecimiento, entre otros. Estos desequilibrios pueden estar causados por productos de uno o más genes y dar lugar a aumentos patológicos de la masa ósea (como en la osteopetrosis) o a una disminución de ésta (como en la osteoporosis). Los trastornos de los huesos son numerosos y variados.

Las enfermedades monogénicas, tienen una prevalencia muy baja en la población y siguen un patrón de herencia mendeliana simple. Un ejemplo de ellas sería la osteocondromatosis múltiple. Por otro lado, las enfermedades más comunes suelen estar causadas por efectos combinados de múltiples genes y el ambiente, presentando una herencia compleja o multifactorial. Éste es el caso de la osteoporosis. Algunos fenotipos, como la alta masa ósea, pueden presentar ambos tipos de herencia.

II. OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE HEREDITARIA

1. CLÍNICA

La osteocondromatosis múltiple (MO, del inglés *Multiple Osteochondromas*), también conocida como exostosis múltiple hereditaria, es una displasia esquelética autosómica dominante caracterizada por la presencia de múltiples osteocondromas que crecen a partir de las metáfisis de los huesos largos. A nivel poblacional, la MO también se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica en cuanto al número, tamaño y localización de los osteocondromas.

1.1. Osteocondromas

El osteocondroma, o exostosis cartilaginosa, es un tumor óseo recubierto por cartílago (Figura 7) que surge en la superficie de las metáfisis de los huesos y que contiene una cavidad para la médula que es continua con la del hueso en el que se encuentra (Khurana et al., 2002). Este tipo de crecimiento se puede dar en cualquier hueso de formación endocondral. Por lo general afecta a los huesos largos de las extremidades, la pelvis o la escápula (omóplato) (Huvos, 1991).



Figura 7. Osteocondromas. **A.** Sésil. **B.** Pedunculado

El osteocondroma es el crecimiento óseo benigno más común (Bell et al., 2006) y se manifiesta con mayor frecuencia durante el período de crecimiento esquelético, es decir, entre los 10 y los 30 años. Radiológica y anatómo-patológicamente se clasifican, según su base de implantación en el hueso, en sésiles o pedunculados. Los osteocondromas sésiles (Figura 7. A) se unen a través de una base ancha a la corteza del hueso, mientras que los pedunculados (Figura 7. B) lo hacen a través de un tallo. Por otro lado, algunos osteocondromas pueden tener un aspecto arborescente, como de coliflor, debido a sus numerosas calcificaciones (Hameetman et al., 2004).

Aunque la mayoría de los osteocondromas son asintomáticos, dependiendo de su localización y tamaño pueden llegar a causar dolor, problemas funcionales y deformidades debido a nervios y tendones comprimidos, obstrucción mecánica, pseudoaneurisma de algún vaso cercano, fractura del tallo de la lesión, irritación de los tejidos blandos de alrededor o la formación de una bolsa sinovial sobre el osteocondroma. Esto puede dar lugar a una estatura más baja de lo normal, dolor en músculos adyacentes o una extremidad más larga que la otra (Pannier y Legeai-Mallet, 2008). La complicación más grave es la transformación del osteocondroma en condrosarcoma secundario periférico (Bovee, 2008).

1.2. Osteocondromatosis múltiple *versus* osteocondroma solitario

Los osteocondromas pueden presentarse como lesiones esporádicas en el osteocondroma solitario (SO, del inglés *Solitary Osteocondroma*), o de forma múltiple en la MO. Aproximadamente el 15% de los pacientes con osteocondromas tienen lesiones múltiples (Bovee y Hogendoorn, 2002). Los osteocondromas solitarios y los múltiples son histológicamente indistinguibles entre sí (Hameetman et al., 2004). Se estima que el SO afecta a un 1-2% de la población general, mientras que la prevalencia de la MO es de 1:50.000 personas (Schmale et al., 1994). En cuanto a la transformación en condrosarcoma, se estima que ocurre en <1% de los casos solitarios y de un 0,5% a un 5% de los casos múltiples (Bovee, 2008). El SO no tiene un carácter hereditario, mientras que aproximadamente el 90% de los casos de MO

tiene una historia familiar positiva (Jennes et al., 2009). Ambas afecciones están causadas por alteraciones genéticas en el gen *EXT1* o en el gen *EXT2* (Wu et al., 1994; Wuyts et al., 1995; Ludecke et al., 1997).

1.3. Otros fenotipos patológicos relacionados

El diagnóstico diferencial del osteocondroma se realiza con la displasia epifisaria hemimélica (osteocondroma de las epífisis, enfermedad de Trevor o aclasia tarsoepifísea) (Glick et al., 2007), con la metacondromatosis (Bovee et al., 2006), y con las encondromatosis de la enfermedad de Ollier y del síndrome de Maffucci (Mertens y Unni, 2002). A pesar de las similitudes, todas ellas son afecciones distintas y radiológicamente tienen fenotipos distintos, fáciles de reconocer por un ojo experto.

La MO también hay que diferenciarla de dos síndromes causados por deleciones cromosómicas que incluyen a los genes *EXT1* y *EXT2*: el síndrome de Langer-Giedion en el que está delecionado el gen *TRPS1* además de *EXT1*, y los individuos afectados tienen exostosis y también retraso mental, anomalías craneofaciales y dactilares (Langer et al., 1984); y el síndrome de Potocki-Shaffer (o DEFECT 11) causado por una deleción de los genes *ALX4* y *EXT2* y que cursa con múltiples exostosis, defectos en la osificación del cráneo, disostosis craneofacial y retraso mental (Bartsch et al., 1996; Potocki y Shaffer, 1996).

2. GENETICA DE LA OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE

2.1. Perspectiva histórica

En 1786, John Hunter menciona por primera vez las exostosis, que afectan a casi cualquier hueso en el cuerpo (Hunter y Palmer, 1837). En 1814, Boyer publica la primera descripción de una familia con MO (Boyer, 1814) y en 1825 se describe el segundo caso familiar de MO (Guy's, 1825). En 1876, Virchow le da el nombre de "exostosis múltiple" a la enfermedad (Virchow, 1876). Desde entonces se han

usado diferentes nombres para referirse a dicha afección, como "aclasia diafisaria", "osteochondromatosis múltiple hereditaria", "osteochondromatosis múltiple congénita", "osteoma condral", "condrodisplasia deformante", "discondroplasia", "enfermedad exostosante", "displasia exostótica", "condrodisplasia deformante hereditaria", "osteomatosis múltiple", "enfermedad osteogénica", "osteochondromatosis" o "exostosis cartilaginosa múltiple" (Ehrenfried, 1915; Keith, 1920; Peterson, 1989; Hennekam, 1991).

En 1961, se publicó un estudio de 6 familias con MO de la isla de Guam de las islas Marianas (Krooth et al., 1961). En esa isla la prevalencia de la enfermedad era de uno de cada 1000 individuos, presentando los hombres un fenotipo más severo que las mujeres. Más adelante, en un estudio de 56 pacientes se vio que no había diferencias en el número de afectos entre hombres y mujeres y que en dos tercios de los casos la enfermedad era heredada (Solomon, 1963). Sin embargo, en 1995, una revisión que recoge el estudio de 43 probandos y 137 familiares afectos (Wicklund et al., 1995), señala que hay mayor número de varones afectos que de mujeres (104:76), debido a que los hombres padecen una forma más severa de la enfermedad. También apunta que un 2,8% de los casos malignizan, a diferencia de lo publicado anteriormente que postulaba que la malignización ocurría en un 0,5-2% de los casos (Hennekam, 1991), y que la penetrancia de la enfermedad era del 100%. En una revisión posterior (Legeai-Mallet et al., 1997), se defiende que existe penetrancia incompleta según el género. Actualmente, se estima que la prevalencia de la enfermedad en la población general es de 1:50.000 personas (Schmale et al., 1994) y que la proporción en ambos sexos es casi igual (Pedrini et al., 2011).

En 1984 se sugirió que la mutación causante de la exostosis múltiple debería estar estrechamente ligada al locus de Langer-Giedion (8q24) ya que sus exostosis eran indistinguibles (Buhler y Malik, 1984). Se realizaron numerosos análisis de ligamiento que localizaron el gen *EXT1* en 8q24.11 (Cook et al., 1993; Yoshiura et al., 1994; Hou et al., 1995; Ludecke et al., 1995) y el gen *EXT2* en 11p11-p12 (Wu et al., 1994; Hecht et al., 1995; Blanton et al., 1996). Finalmente, en 1995 se identificó

el gen *EXT1* por clonación posicional (Ahn et al., 1995), y en 1996 el gen *EXT2* fue identificado mediante la misma técnica por dos grupos independientes (Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996). También se sugirió la existencia de un tercer gen *EXT* en el cromosoma 19p, el *EXT3* (Le Merrer et al., 1994), pero todavía no se ha identificado dicho gen y podría ser un falso positivo del análisis de ligamiento (Jennes et al., 2009).

2.2. *EXT1*

Este gen está compuesto por 11 exones (Figura 8), ocupa aproximadamente 350 kb y tiene un promotor característico de gen constitutivo (Ludecke et al., 1997). El ARNm de *EXT1* es de expresión ubicua y está compuesto por una secuencia codificante de 2238 nt (Ahn et al., 1995). En embriones de ratón se han encontrado altos niveles de ARNm de *Ext1* (gen ortólogo de *EXT1*) en las zonas de desarrollo de los miembros (Lin y Wells, 1997; Lohmann et al., 1997). También se han identificado ortólogos de *EXT1* en *Drosophila melanogaster* (*tout-velu*, *ttv*) (Bellaiche et al., 1998) y *Caenorhabditis elegans* (*rib-1*) (Clines et al., 1997).



Figura 8. Estructura génica del gen *EXT1*.

EXT1 codifica la proteína exostosina 1, de 746 aminoácidos, que es una proteína transmembrana de tipo II del retículo endoplasmático. Es una glucosiltransferasa que forma un complejo con la proteína de *EXT2*, que se acumula en el aparato de Golgi, y que es la encargada de la elongación de la cadena de heparán sulfato (HS) durante su síntesis (McCormick et al., 1998; McCormick et al., 2000).

2.3. *EXT2*

El gen *EXT2* está formado por 16 exones (Figura 9) y abarca aproximadamente 108 kb del ADN genómico (Clines et al., 1997). Su ARNm, de expresión ubicua, está

constituido por 2154 nt con un *splicing* alternativo en el exón 1 (Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996). Da lugar a una proteína con una región C-terminal muy similar a la de *EXT1*. El gen *EXT2*, al igual que *EXT1*, pertenece a la familia de genes *EXT* en la que también están incluidos *EXTL1*, *EXTL2* y *EXTL3*. Se han encontrado ortólogos de *EXT2* en ratón (Clines et al., 1997; Stickens y Evans, 1997), en *Drosophila melanogaster* (*sister of tout-velu, sotv*) (Han et al., 2004) y en *Caenorhabditis elegans* (*rib-2*) (Clines et al., 1997) entre otros.

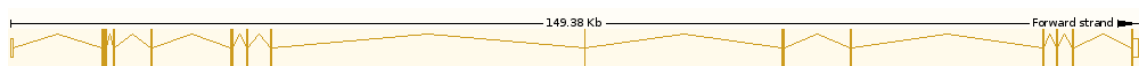


Figura 9. Estructura génica del gen *EXT2*.

Este gen codifica la exostosina 2, una de las dos glucosiltransferasas implicadas en el paso de elongación durante la síntesis del HS (Lind et al., 1998). Las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 presentan un 70% de homología (Ahn et al., 1995; Wuyts et al., 1996). Ambas tienen estructura de proteínas transmembrana tipo II: una corta cola citoplasmática N-terminal, un dominio transmembrana, un tallo, y una cola globular C-terminal en el lumen (Lind et al., 1998; McCormick et al., 1998). Al igual que la exostosina 1, la exostosina 2 también se localiza en el retículo endoplasmático y juntas forman un complejo hetero-oligomérico que se acumula en el aparato de Golgi (McCormick et al., 2000); (Esko y Selleck, 2002).

2.4. Formación del heparán sulfato

La síntesis de la cadena de heparán sulfato (HS) empieza con la formación del tetrasacárido ácido glucurónico-galactosa-galactosa-xilosa (GluA-Gal-Gal-Xil) en un residuo serina específico del núcleo proteico del proteoglucano (Figura 10). Este intermediario sirve como precursor donde se unirá la N-acetilglucosamina en el primer paso en la síntesis del HS. La elongación de la cadena tiene lugar mediante la adición alternativa de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina por parte del complejo *EXT1/EXT2* (Esko y Selleck, 2002). Después de la polimerización, la cadena de HS sufre una serie de modificaciones: desacetilación, epimerización y

sulfatación (Esko y Lindahl, 2001; Esko y Selleck, 2002). Estas modificaciones de los residuos sulfatados y los epímeros de ácido urónico dan lugar a sitios de unión para varios ligandos como factores de crecimiento, enzimas extracelulares y adhesinas virales (Kjellen y Lindahl, 1991).

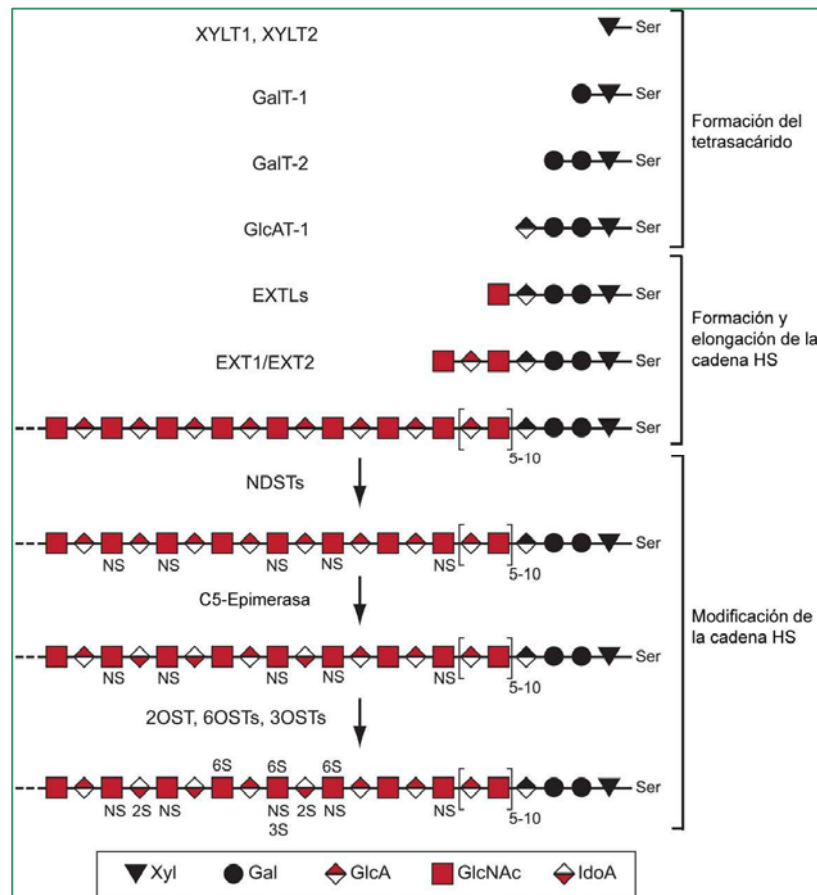


Figura 10. Síntesis del heparán sulfato y modificaciones posteriores (adaptado de Kreuger 2012).

Los proteoglucanos de HS son macromoléculas ubicuas asociadas a constituyentes de la superficie de la membrana celular y de la matriz extracelular (Vlodavsky et al., 1999; Vlodavsky y Friedmann, 2001). Sin embargo en los osteocondromas, dichos proteoglucanos de HS, se acumulan en el citoplasma en vez de ser transportados a la membrana celular (Hameetman et al., 2007). Estos proteoglucanos juegan un papel muy importante en varias vías de señalización del crecimiento, en la adhesión celular a la matriz extracelular, en el secuestro de factores de crecimiento y en la hidratación de la matriz extracelular. Además, se ha visto que están implicados en la difusión del morfógeno Indian Hedgehog (IHH)

(Bellaiche et al., 1998; Lai y Mitchell, 2005), componente de la vía de señalización de Hedgehog (Hh). Esta vía es muy importante durante el desarrollo y está especialmente activa en la placa de crecimiento durante la formación endocondral del hueso, regulando la proliferación y diferenciación de los condrocitos (revisado por Bovee, 2008).

2.5. Hipótesis sobre el desarrollo de los osteocondromas

En el pasado, los osteocondromas se habían considerado como una anomalía del crecimiento normal de los huesos, como consecuencia de un desarrollo epifisario aberrante. Estudios posteriores detectaron en osteocondromas aberraciones citogenéticas en 8q22-24.1 y 11p11-3 sugiriendo que la pérdida o mutación de los genes *EXT1* y *EXT2* era importante en la patogénesis tanto de los osteocondromas solitarios como de los hereditarios, lo que indicaba el origen neoplásico de dichas lesiones. En 1995, dos estudios distintos (Hecht et al., 1995; Raskind et al., 1995) encontraron pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *loss of heterozygosity*) en marcadores de *EXT1* y *EXT2*, y sugerían que el desarrollo de osteocondromas seguía el modelo *two-hits* de Knudson (Knudson, 1971) para la inactivación de genes supresores de tumores. En este modelo, una mutación germinal (primer impacto o *hit*) causa la predisposición para la enfermedad y la inactivación somática de la copia *wild-type* del gen que queda (segundo *hit*) lleva al crecimiento anormal (Zuntini et al., 2010).

Actualmente, hay publicaciones contradictorias sobre la necesidad de la inactivación completa de los genes *EXT* para el desarrollo de los osteocondromas. En 1999, se encontró LOH en el locus de *EXT1* en tres de ocho casos de SO y en dos de seis casos de MO (Bovee et al., 1999; Bovee et al., 1999). Más recientemente, el mismo grupo describió deleciones homocigotas de *EXT1* en siete de ocho casos de SO. Por otra parte, en un estudio realizado en 12 casos de MO y 4 casos de SO, (Hall et al., 2002) sólo encontraron un caso de SO con 2 mutaciones somáticas, concluyendo que los datos disponibles proporcionaban poco apoyo a la hipótesis de *two-hits*.

Hasta ahora, sigue sin quedar claro si *EXT1* y *EXT2* encajan en el modelo clásico de *two-hits* para genes supresores de tumores o si la haploinsuficiencia de uno de los genes, mediante la inactivación mutacional, es suficiente para causar el desarrollo de los osteocondromas (Jennes et al., 2009).

Por otro lado, la regulación de la conversión de condrocitos proliferativos en condrocitos hipertróficos es muy importante durante la formación endocondral del hueso. Esta regulación está determinada por el bucle de retroalimentación de las vías de señalización IHH/PTHrP (péptido relacionado con la hormona paratiroidea). El desarrollo de los osteocondromas se puede explicar por la reducida cantidad de HS, que perturba la señalización de IHH y de factores de crecimiento de fibroblastos en la placa de crecimiento, y esto resulta en un aumento de la proliferación de condrocitos y un retraso en la diferenciación (Jennes et al., 2009).

2.6. Estudios mutacionales previos

La MO es una patología estudiada en numerosas poblaciones. Aunque la caucásica (principalmente europea) es la más descrita, también hay publicaciones de la población asiática (china y japonesa sobre todo). Existe un gran número de artículos que recogen las mutaciones causantes de MO encontradas hasta la fecha y la gran mayoría de ellas están recopiladas en la base de datos *online Multiple Osteochondromas Mutation Database* (MOdb) (<http://medgen.ua.ac.be/LOVD>, administrada por Wim Wuyts).

Los casos de MO causados por mutaciones en *EXT1* representan entre el 56% y el 78% del total, mientras que aquéllos en los que la mutación causal se encuentra en el gen *EXT2* representan entre el 21 y el 44%. Sin embargo, en la población china es más frecuente que la MO se deba a mutaciones en *EXT2* (Pedrini et al., 2011). La mayoría (80%) de las mutaciones en *EXT1* y *EXT2* que dan lugar a MO son de pérdida de sentido (*nonsense*), inserciones y deleciones que provocan ruptura de la pauta de lectura (*frame shift*) o bien mutaciones que modifican señales de *splicing*,

lo que provocaría la síntesis de proteínas truncadas y por tanto la pérdida de su función, mientras que sólo el 20% son mutaciones de cambio de sentido (*missense*) (Wuyts y Van Hul, 2000; Francannet et al., 2001).

En relación a la distribución en los genes, las mutaciones de *EXT1* se encuentran a lo largo de todo el gen, mientras que las mutaciones de *EXT2* se concentran en la región 5' del gen (Figura 11), que dará lugar al dominio N-terminal de la proteína. Esto parece contradictorio, ya que es la parte C-terminal de la proteína la que está altamente conservada, lo que implicaría una mayor importancia funcional en esta región (Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996).

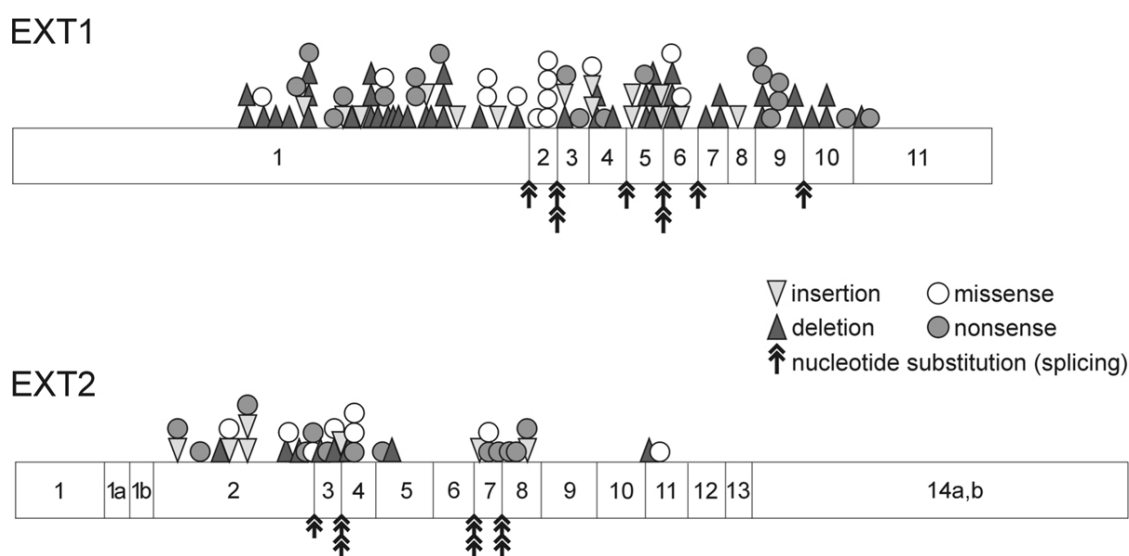


Figura 11. Distribución de mutaciones de pacientes con MO en los genes *EXT1* y *EXT2* (adaptado de Hameetman et al. 2004).

Por otro lado no hay muchas publicaciones que describan correlaciones genotipo-fenotipo que saquen conclusiones definitivas. Los estudios apuntan a que hay un riesgo ligeramente más alto de transformación maligna en los pacientes con mutaciones en *EXT1* en comparación con los que tienen mutaciones en *EXT2* (Hameetman et al., 2004).

3. MODELOS ANIMALES

Los genes EXT están bien conservados a lo largo de la escala filogenética, y hay ortólogos identificados en muchas especies de vertebrados e invertebrados. Se han desarrollado modelos mutantes de *EXT1* o *EXT2* en animales modelo.

3.1. Modelos no mamíferos

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, tiene ortólogos de *EXT1*, *tout-velu* (*ttv*); de *EXT2*, *sister of tout-velu* (*sotv*); y de *EXTL3*, *brother of tout-velu* (*botv*). Los genes *ttv* y *sotv* desempeñan una función parecida a la de *EXT1* y *EXT2* en la síntesis de HS en vertebrados. Mutaciones en cualquiera de estos tres genes de *Drosophila* dan lugar a una disminución en la síntesis del HS (Jennes et al., 2009). Los proteoglucanos de HS, en *D. melanogaster*, determinan el gradiente de señalización de los homólogos de Hh, Wnt y BMP y por tanto alteraciones en los genes *ttv* o *sotv* afectan a dicha señalización, como se ha comprobado en *D. melanogaster* mutantes. Además de estas diferencias en el gradiente de señalización, en estas moscas mutantes la pérdida de actividad de *sotv* o *ttv* provoca defectos en sus alas indicativo de una señalización aberrante del homólogo de Wnt (Bornemann et al., 2004).

El pez cebra también tiene ortólogos de *EXT1* (*ext1a*, *ext1b*, y *ext1c*), de *EXT2* (*dackel*; *dak*) y de *EXT3L* (*boxer*; *box*). Como ocurre en la osificación endocondral de mamíferos, después de formarse el esqueleto cartilaginoso del pez cebra, parte de este esqueleto es reemplazado por hueso. La investigación sobre los ortólogos de *EXT1* es difícil debido a que son tres genes parálogos, sin embargo se ha descrito un pez cebra nulo para *dak* con defectos del cartílago parecidos a los de los pacientes con MO (Jennes et al., 2009).

3.2. Modelos murinos

El gen *EXT1* humano y su ortólogo en ratones comparten un 99% de homología (Lin y Wells, 1997), por tanto el ratón es un buen candidato para realizar un modelo animal. A pesar de esto, ha habido algunas dificultades para realizar un modelo murino de la formación de osteocondromas con un fenotipo comparable al humano, ya que los ratones que heredaban un genotipo heterocigoto para una mutación en *EXT1* o *EXT2* que causaría MO en humanos, no presentaban el mismo fenotipo que en los pacientes de MO. Los ratones heterocigotos para una mutación en *Ext1* no mostraban osteocondromatosis (Lin et al., 2000). Por otro lado, una pequeña minoría de ratones con una mutación en heterocigosis en el gen *Ext2*, formaban un solo osteocondroma en una costilla sin diferencias en el tamaño de los ratones pero con anomalías en la diferenciación condrocítica en las placas de crecimiento de todos los huesos (Stickens et al., 2005). Por último, los ratones homocigotos para mutaciones en *Ext1* o *Ext2* morían en una etapa temprana de la embriogénesis (Lin et al., 2000; Stickens et al., 2005).

El primer modelo murino que imitaba el fenotipo humano se consiguió a partir de ratones heterocigotos *Ext1* +/-, mediante una estrategia de LOH somática en un alto porcentaje de condrocitos, es decir, siguiendo la hipótesis de que las células deben perder la única copia funcional de *Ext1* (Jones et al., 2010). Esta aproximación dio lugar a un tejido cuyas células en general sólo tenían un alelo *Ext1*, y algunas de ellas carecerían por completo del alelo funcional lo que daba lugar a la formación de múltiples osteocondromas en la mayoría de los huesos endocondrales, localizados principalmente cerca de las placas de crecimiento. Un resultado inesperado fue que muchos osteocondromas, aunque no todos, además de los condrocitos carentes de alelo funcional, también contenían condrocitos con un alelo *Ext1* funcional. El interés de este resultado es que aporta una posible explicación al hecho de que no se haya encontrado LOH en algunos de los osteocondromas humanos analizados (Jones et al., 2010).

4. TRATAMIENTO

El tratamiento del osteocondroma depende de si es sintomático o no, de si hay complicaciones o incluso de motivos estéticos. El tratamiento consiste en la extirpación quirúrgica completa del osteocondroma, sin dejar restos de tejido tumoral ni de la cubierta de cartílago para evitar recurrencias. Además pueden ser necesarias cirugías de reconstrucción.

La evaluación completa de los pacientes se realiza mediante un examen físico, una tomografía computerizada, una imagen de resonancia magnética y una biopsia de la lesión. La presencia de un SO asintomático no justificaría una escisión quirúrgica ya que el riesgo de la cirugía es mayor que el que plantea el tumor. En cambio, los casos en los que el osteocondroma debe ser extirpado son los siguientes: cuando es demasiado grande y provoca dolor persistente; si provoca lesiones por compresión en los nervios, en los vasos sanguíneos o en los tendones; cuando causa retraso en el crecimiento, deformidad de las extremidades y pérdida de la movilidad articular; o, aunque sean casos raros, cuando obstruya el tracto urinario o intestinal, o cause hemotórax. La escisión quirúrgica sería obligatoria si se notara un cambio en el grosor de la cubierta de cartílago, un aumento en el tamaño del osteocondroma o si se transformara en un osteosarcoma (revisado por Kitsoulis et al., 2008).

III. FENOTIPO DE ALTA MASA ÓSEA

1. ASPECTOS HISTÓRICOS

En 1997, Johnson et al., abordando el estudio de la base genética de la osteoporosis mediante un nuevo enfoque, trataron de determinar la base genética del mecanismo que regula el pico de masa ósea estudiando una familia con un síndrome opuesto a la osteoporosis, la alta masa ósea (HBM, del inglés *High Bone Mass*; OMIM #601884) transmitida en esta familia con un patrón de herencia autosómica dominante. Para ello realizaron un análisis de ligamiento en dicha familia, cuyos miembros afectados tenían una densidad ósea espinal muy alta y ninguna característica clínica inusual, mientras que los miembros no afectados presentaban una densidad ósea espinal normal. En este estudio se identificó el locus de la HBM en el cromosoma 11q12-13.

Por otro lado, en esta región descrita como asociada a la HBM, ya estaba localizado el gen responsable del síndrome de osteoporosis pseudoglioma (OPPG; OMIM #259770) (Gong et al., 2001). El OPPG es un rasgo autosómico recesivo caracterizado por la ceguera causada por una vascularización aberrante del ojo (pseudoglioma) y una osteoporosis juvenil severa, un fenotipo opuesto a la HBM. Los análisis genéticos de clonación posicional en varias familias afectadas por OPPG y los estudios *in vitro* y en ratones revelaron que el gen *LRP5* era el responsable de la OPPG. Las mutaciones de este gen que causaban los defectos óseos producían una pérdida de función de la proteína (Gong et al., 2001).

En 2002, Little et al. tras ampliar el pedigrí estudiado por Johnson et al. (Johnson et al., 1997), analizaron los haplotipos y refinaron el intervalo donde se localizaba el gen responsable de la HBM en la familia de estudio a una región de 3cM. Mediante clonación posicional localizaron 16 genes candidatos y tras secuenciar 231 exones de dicha región en todos los miembros de la familia y 84 individuos control, encontraron 146 polimorfismos y la mutación causal presente sólo en los individuos afectados. El gen que causaba el fenotipo HBM era gen de la

proteína 5 relacionada con el receptor de proteínas de baja densidad (*LRP5*), es decir el mismo responsable de OPPG. La mutación G171V, localizada en el exón 3 de *LRP5*, era de ganancia de función, provocaba un aumento de la masa ósea pero sin efectos adversos en la estructura esquelética. Todos los miembros afectados presentaban la mutación en heterocigosis, coherente con el modelo de herencia autosómica dominante. Esta misma mutación se encontró en otra familia con un síndrome autosómico dominante caracterizado por alta masa ósea, y además una mandíbula ancha y prominente y *torus palatinus*, que consiste en una protuberancia nodular de hueso en el paladar (Figura 12) (Boyden et al., 2002).

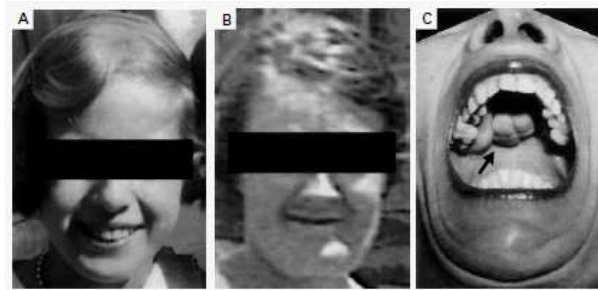


Figura 12. Características clínicas de afectos del fenotipo HBM. Las fotografías de una mujer afecta con 12 años (foto A) y con 45 años (foto B) muestran el desarrollo de la mandíbula ancha y prominente. La foto C muestra el *torus palatinus* (flecha) (adaptado de Boyden 2002).

El descubrimiento de la implicación del gen *LRP5* en las variaciones de DMO, puso de manifiesto el papel de la vía de Wnt en el metabolismo óseo, y en la diferenciación y/o función de los osteoblastos (Balemans y Van Hul, 2007). Desde que se publicaron los primeros estudios que relacionaban al gen *LRP5* con los fenotipos de OPPG y HBM, muchos investigadores han descrito mutaciones en este gen que dan lugar a fenotipos con masa ósea alterada (Okubo et al., 2002; Van Wesenbeeck et al., 2003; Balemans et al., 2007; Chung et al., 2009; Marques-Pinheiro et al., 2010; Nikopoulos et al., 2010; Pangrazio et al., 2011). Además de los estudios arriba descritos sobre los fenotipos mendelianos simples, los análisis de ligamiento en poblaciones caucásicas proporcionaron evidencias de la presencia de, al menos, un locus de rasgo cuantitativo (QTL) de la DMO en el cromosoma

11q12–13. Estos resultados se reforzaron con los datos de la asociación positiva entre las variantes comunes del gen *LRP5* y la DMO (Balemans y Van Hul, 2007).

2. CONDICIONES CON ELEVADA DMO

La HBM se ha descrito como es un fenotipo óseo de herencia autosómica dominante, caracterizado por unos huesos inusualmente densos y un esqueleto muy fuerte que da como resultado una ausencia total de fracturas en uno de los pedigríes descritos (Johnson et al., 1997). En el individuo adulto, la formación de hueso por parte de los osteoblastos tiene lugar en el contexto del remodelado óseo explicado anteriormente y es contrarrestado por la resorción llevada a cabo por los osteoclastos. Es el balance global de estas dos actividades lo que permite que la masa ósea aumente en niños y jóvenes y que se mantenga en adultos. Por el contrario, el aumento de la resorción o la disminución de la formación ósea lleva a la pérdida de hueso y a la osteoporosis en personas mayores (Baron y Rawadi, 2007). Los individuos con HBM presentan una elevada formación ósea y un engrosamiento del hueso trabecular y cortical, pero con una resorción y una arquitectura normales. En algunos casos se pueden desarrollar complicaciones secundarias asociadas con la excesiva formación de hueso, como ensanchamiento mandibular, craneosinostosis, compresión de nervios, *torus palatinus*, etc. (Whyte et al., 2004). Existen diferentes definiciones para considerar un fenotipo como HBM, según el umbral de *Z-score* que se tenga en cuenta en cada caso (Tabla 1).

Tabla 1.

Definiciones de HBM	Autores	Año
Z (DMO) espinal > 3	Johnson et al.	1997
Z (DMO) espina lumbar > 5	Boyden et al.	2002
Z-scores espinal + <i>cadera</i> > 4 o Z-score espinal > 2	Little et al.	2002
Z-scores espina lumbar + <i>fémur</i> > 4	Levasseur et al.	2005
Z-score L1 > 3,5 y Z-score de cadera > 1,2; o Z-score de cadera > 3,5	Gregson et al.	2010

En el presente trabajo se considerará como condición para adjudicar al fenotipo de HBM el tener una *Z-score* total, suma del *Z-score* lumbar (L1-L4) y del *Z-score* de cadera, mayor de 4, de acuerdo a la definición de Little et al. (2002).

Whyte (1997) apuntó que la HBM puede deberse a la osteosclerosis (aumento en la densidad del hueso trabecular) y/o a la hiperostosis (engrosamiento del hueso cortical). De acuerdo con esto, existen al menos 20 causas genéticas raras bien conocidas de aumento de masa esquelética (Frame et al., 1987). Por tanto, es importante realizar una caracterización fenotípica correcta. Por ejemplo, pacientes inicialmente diagnosticados con hiperostosis endosteal, enfermedad de Worth, enfermedad de van Buchem, osteosclerosis autosómica dominante, u osteopetrosis tipo I autosómica dominante resultaron presentar mutaciones *missense* de ganancia de función en *LRP5*, incluso alguna coincidía con las ya descritas asociadas a la HBM (Van Wesenbeeck et al., 2003). Es decir que en algunos casos las manifestaciones clínicas pueden dar lugar a una caracterización fenotípica errónea, como ocurrió en algunos de los casos anteriores. Estas variaciones en las manifestaciones fenotípicas pueden ser debidas a factores ambientales pero es más probable que haya genes modificadores implicados (Balemans y Van Hul, 2007).

3. LA VÍA DE WNT Y SU FUNCIÓN EN EL HUESO

La vía de señalización de Wnt es muy importante en diversos procesos del desarrollo como la formación de los ejes del cuerpo, el desarrollo del sistema nervioso central y las especificaciones axiales en el desarrollo de las extremidades (Akiyama, 2000). Esta vía está altamente conservada evolutivamente (Behrens, 2000). Se sabe que la señalización de Wnt se da a través de la vía canónica (Wnt/ β -catenina) y las vías no canónicas (Wnt/ Ca^{2+} , Wnt/polaridad celular planar) (Figura 13). La vía de Wnt juega un papel muy importante en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la determinación del destino celular, proliferación,

migración, polaridad y expresión génica (Figura 13) (Moon et al., 2002; Baek et al., 2003; Boland et al., 2004; De Boer et al., 2004; Kleber y Sommer, 2004).

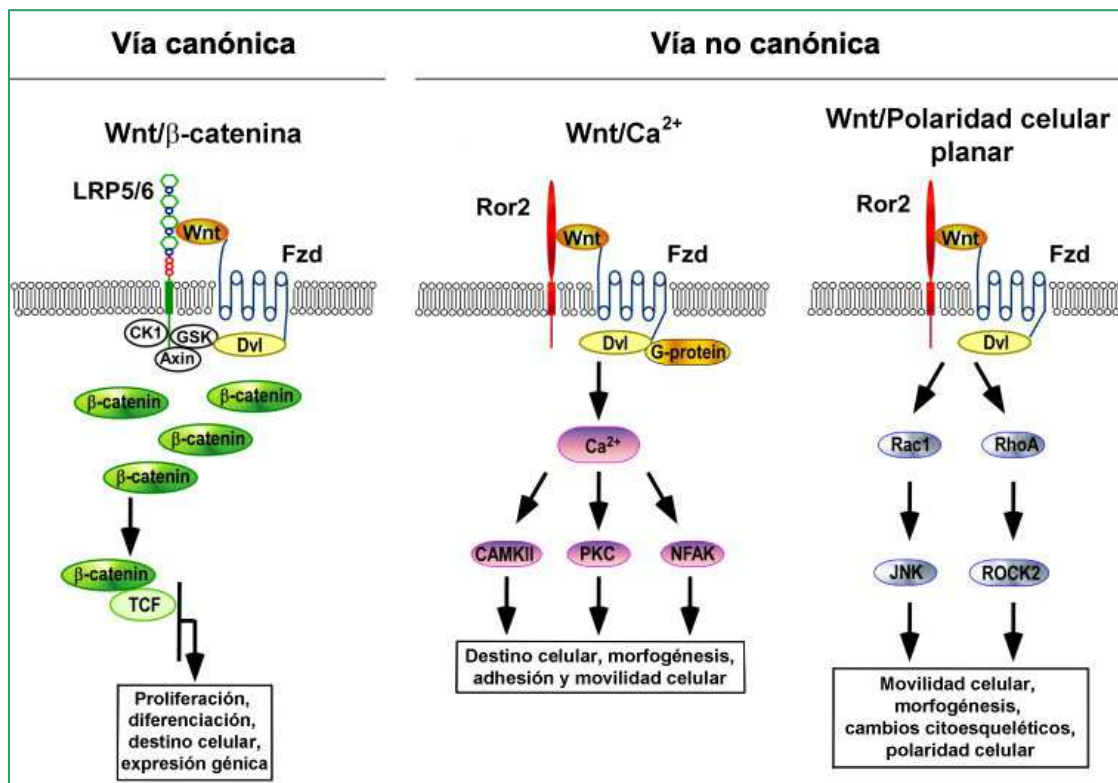


Figura 13. Vías canónica y no canónicas de Wnt y su función sistémica (adaptado de King 2012).

La importancia de la vía canónica de Wnt en el control de la masa ósea se puso de manifiesto con la identificación de mutaciones en el co-receptor LRP5, que inducen el síndrome OPPG o el fenotipo HBM, como ya se ha dicho anteriormente. La importancia de *LRP5*, y por tanto de la vía de Wnt en la modulación ósea se vio reforzada por los estudios realizados en ratones, que se comentarán más adelante. También hay evidencias de que variaciones más sutiles en *LRP5* modulan los cambios de DMO en la población general. Varios estudios de asociación han descubierto polimorfismos de *LRP5* y de otros genes de la vía de Wnt, que se relacionan con la DMO y/o con las fracturas osteoporóticas (Koay et al., 2004; Sims et al., 2008; van Meurs et al., 2008; Richards et al., 2009; Rivadeneira et al., 2009; Agueda et al., 2011). Se ha demostrado que la señalización de Wnt a través de la β-catenina es esencial en la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia osteoblastos o condrocitos (Day et al., 2005; Hill et al., 2005; Hill et al., 2006). Otro

mecanismo por el que la vía de Wnt puede controlar indirectamente la diferenciación a osteoblastos es mediante el bloqueo de la adipogénesis, ya que puede inhibir factores de transcripción adipogénicos como PPAR- γ , como se ha demostrado en ratones (Bennett et al., 2005) e *in vitro* (Rawadi et al., 2003). Por otro lado, la vía de Wnt induce la osteoblastogénesis, estimula la replicación de preosteoblastos, y la mineralización e inhibe la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Figura 14) (revisado por Krishnan et al., 2006).

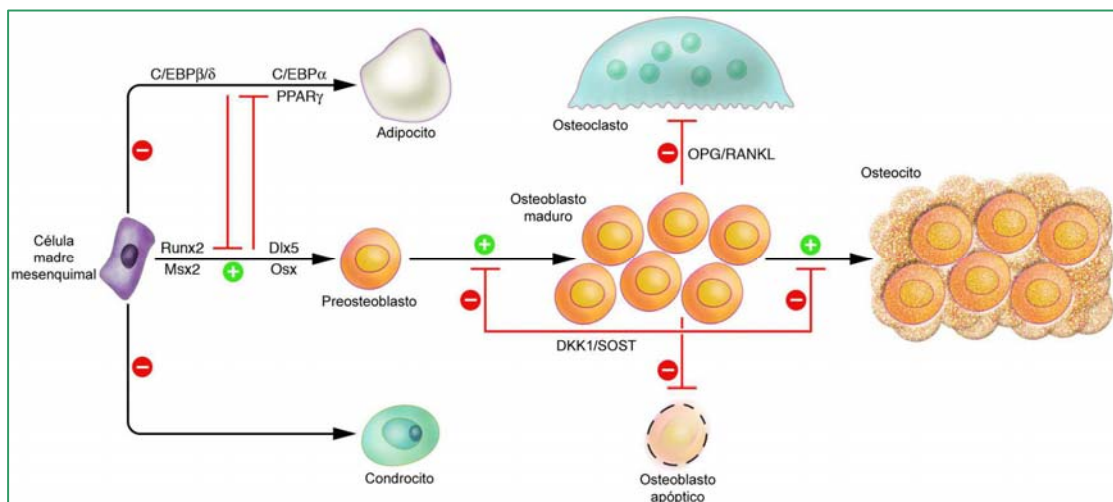


Figura 14. Función de la vía de Wnt en la diferenciación de las células madre mesenquimales. La vía induce el desarrollo osteoblástico e inhibe la adipogénesis, las condrogénesis, la osteoclastogénesis y la apoptosis osteoblástica (adaptado de Krishnan 2006).

3.1. *LRP5*: estructura y expresión

El gen *LRP5* codifica una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), implicada en la vía canónica de señalización de Wnt (Figuras 13 y 16). Como ya se ha dicho el gen *LRP5* se localiza en la banda cromosómica 11q13.4, ocupa 136 kb aproximadamente, tiene 23 exones y codifica una proteína de 1615 aminoácidos con un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. El dominio extracelular consta de un péptido señal seguido por 4 estructuras β -propeller cada una formada por 6 motivos YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp) repetidos, seguidas cada una por un motivo parecido a un factor de crecimiento

epidérmico (EGF-like, del inglés *epidermal growth factor-like*). A continuación tiene 3 motivos LDLR que preceden al dominio transmembrana (Figura 15). La región intracelular de LRP5 carece del motivo de internalización NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) de otros LDLRs, y en su lugar tiene 5 dominios PPPSP (Pro-Pro-Pro-Ser-Pro) fosforilables, esenciales para transmitir la señal en la vía Wnt/ β -catenina (Tamai et al., 2004).

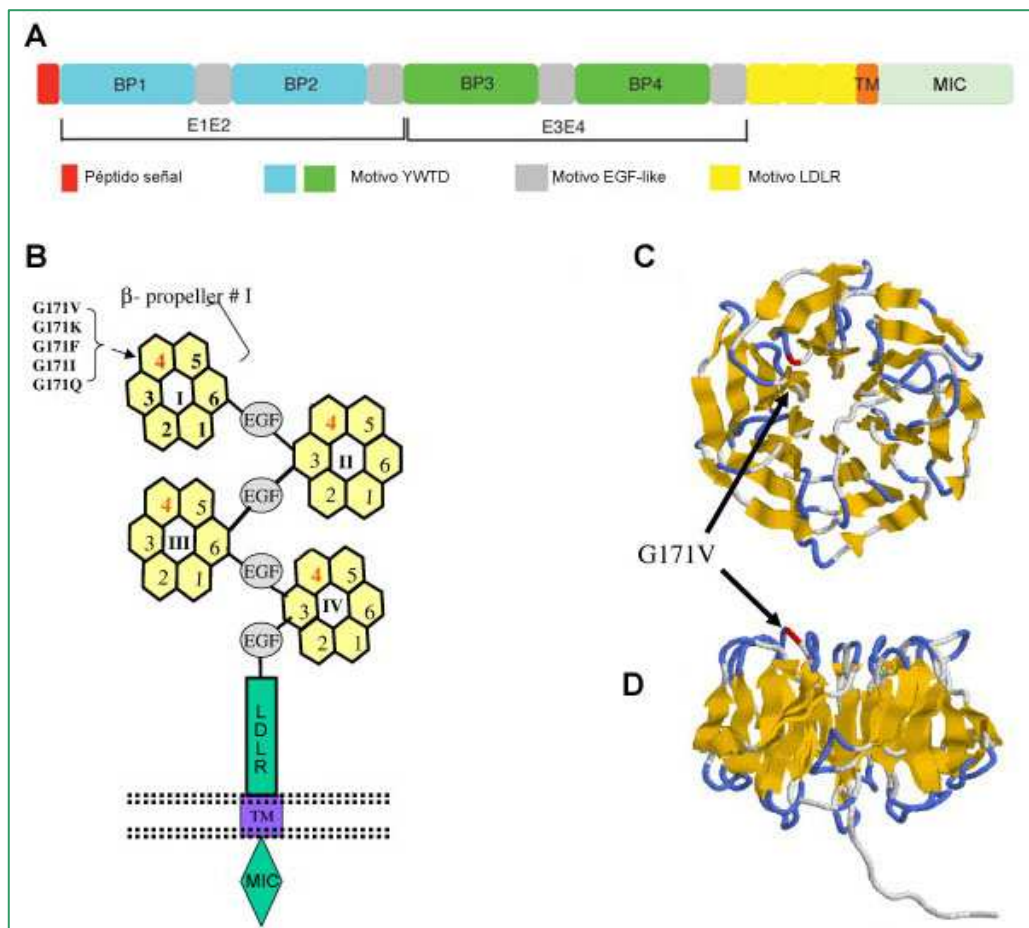


Figura 15. Estructura proteica de LRP5. **A.** Distribución de sus motivos. **B.** Detalle de los β -propeller y localización del aminoácido G171. **C y D.** Modelo estructural del primer β -propeller con la posición G171 marcado (adaptado de Cheng 2011 y Bhat 2007).

El gen *LRP5* tiene una expresión muy extendida en tejidos de adulto y embrionarios incluyendo hueso, tejido adiposo, cerebro, corazón, hígado y páncreas. (Figuroa et al., 2000; Kato et al., 2002). En hueso se expresa en osteoblastos de las superficies endosteal y trabecular, pero no en osteoclastos (Kato et al., 2002).

Después de la identificación en *LRP5* de las mutaciones de pérdida de función (en pacientes OPPG) o de ganancia de función (en individuos HBM), estos fenotipos fueron reproducidos en modelos animales. La supresión de *Lrp5* en todos los tejidos del ratón recapitula la baja densidad ósea de pacientes OPPG (Kato et al., 2002; Fujino et al., 2003), mientras que la sobre-expresión transgénica de *LRP5-G171V* con un promotor de colágeno 1 específico de osteoblastos de rata, produce alta masa ósea con aumento de la resistencia mecánica (Babij et al., 2003; Akhter et al., 2004). Experimentos posteriores indicaron que *LRP5* era necesario para una señalización de Wnt eficiente y para la activación de la β -catenina en osteoblastos, mientras que mutaciones de ganancia de función de *LRP5* prevenían la internalización de *LRP5* y la unión a otros ligandos como *DKK1* y esclerostina (Boyden et al., 2002; Zhang et al., 2004; Ellies et al., 2006).

3.2. Regulación canónica de la β -catenina

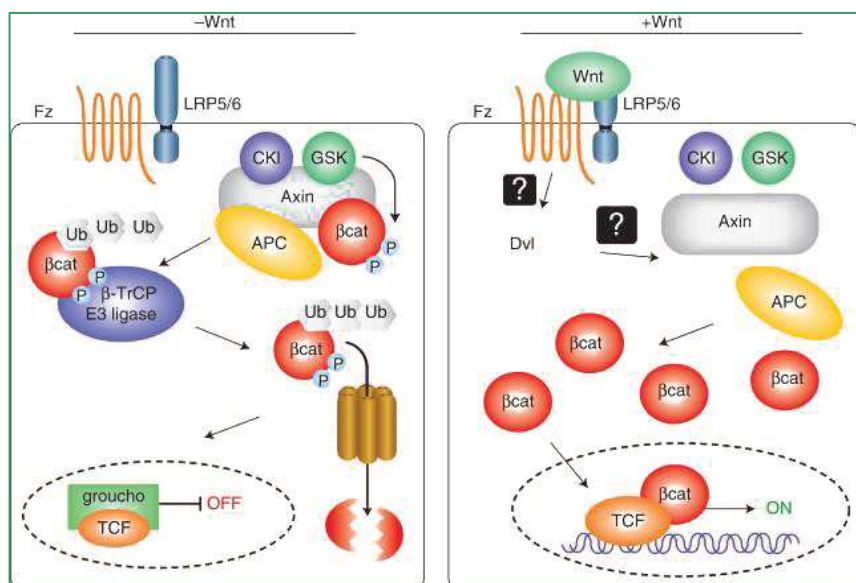


Figura 16. Vía Wnt/ β -catenina. Inhibida (- Wnt) y activada (+ Wnt) (adaptada de Cadigan 2009).

El acontecimiento clave en la vía canónica de Wnt es la acumulación de la β -catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo celular, donde modula la transcripción de diferentes genes (Figura 16). En condiciones basales, cuando no se encuentra estimulada la vía de Wnt, la β -catenina citoplasmática es

capturada en un complejo formado por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), el supresor tumoral de la poliposis adenomatosa del colon (APC), la axina y la casein quinasa I (CKI), facilitando su fosforilación (Clevers, 2006). La β -catenina fosforilada es reconocida y marcada para su poliubiquitinación y destrucción en el proteosoma. De esta manera, los niveles intracelulares de β -catenina se mantienen relativamente bajos. Mientras tanto, los factores de transcripción Tcf-Lef1 (*T cell factor/lymphocyte enhancer factor 1*) se unen a la familia de co-represores Groucho y mantienen a los genes diana de Wnt silenciados (Arce et al., 2006).

Sin embargo, cuando la vía de Wnt se activa por la unión de los ligandos Wnt al receptor de siete dominios transmembrana Frizzled (Fz) y a los co-receptores LRP5/6, esenciales para la señalización canónica, la unión del ligando provoca la fosforilación de la cola citoplasmática de LRP5, creando un lugar de unión para la axina. El reclutamiento de la axina descompone el complejo axina-CKI-APC-GSK3, lo que disminuye la actividad fosforilativa de la GSK3 en un proceso que requiere de Disheveled (Dvl). A su vez, esto disminuye la fosforilación de la β -catenina y en consecuencia su degradación en los proteosomas. La β -catenina hipofosforilada se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde reemplaza a Groucho y regula la expresión génica a través de la activación de diversos factores de transcripción, como el Tcf-Lef1 (Arce et al., 2006; Gordon y Nusse, 2006) que estimulan la diferenciación a osteoblastos.

Mutaciones en miembros de la familia Wnt, ablaciones de los co-receptores LRP5 o LRP6, o el uso de inhibidores de Wnt, reducen la osteoblastogénesis y la formación de hueso (Tian et al., 2003; Bodine et al., 2004; Li et al., 2005; Semenov et al., 2005).

3.3. Inhibidores de LRP5

Los antagonistas de la vía de Wnt pueden impedir su actividad mediante el bloqueo de los receptores de la vía (como es el caso de DKK1 y de esclerostina) o por la unión directa a los ligandos Wnt (como hacen las proteínas solubles

relacionadas con Fz, sFRP). Los inhibidores esclerostina y DKK1 se unen al co-receptor LRP5 impidiendo la señalización de la vía canónica de Wnt (Canalis et al., 2007), mientras que los antagonistas de clase sFRP inhiben la transducción de ambas vías canónica y no canónica.

3.3.1. Esclerostina

La esclerostina, codificada por el gen *SOST* que se localiza en el cromosoma 17q12-q21, es una proteína que se expresa en los osteocitos. La esclerostina bloquea los co-receptores LRP5/6 y ejerce un efecto inhibitorio sobre la transmisión de señales Wnt y en consecuencia es un regulador negativo de la formación ósea. Hay que señalar que la mutación G171V de *LRP5* impide la unión de la esclerostina con LRP5, lo que sugiere que la elevada DMO observada en individuos con HBM puede ser el resultado de la reducción en el grado de inhibición ejercida por la esclerostina endógena, DKK1 o ambos (revisado por Monroe et al., 2012).

Los avances en las técnicas de análisis genético han demostrado que la esclerostosis es el resultado de la pérdida total de función de la esclerostina, mientras que el síndrome Van Buchem está asociado con una expresión disminuida del gen *SOST* lo que causa un fenotipo menos severo (Kusu et al., 2003; Baron y Rawadi, 2007). Estudios en animales, realizados con anticuerpos monoclonales que neutralizan a la esclerostina, muestran un aumento de la actividad anabólica ósea y un incremento del remodelado en hueso trabecular, sin incrementar la resorción ósea (Li et al., 2011).

3.3.2. Dickkopf 1

DKK1 es un inhibidor de LRP5 secretado por osteocitos y osteoblastos, miembro de la familia Dickkopf y codificado por el gen *DKK1* localizado en 10q11.2 (Roessler et al., 2000). DKK1 se une de forma simultánea a LRP5 y a Kremen, un co-receptor de superficie de los osteoblastos, lo que provoca la internalización del complejo receptor de Wnt, reduciendo la actividad de esta vía (Figura 17) (Fedi et al., 1999). Al igual que en el caso de la esclerostina, la mutación G171V de *LRP5* también

impide que el co-receptor sea inhibido mediante DKK1 (Boyden et al., 2002; Ai et al., 2005).

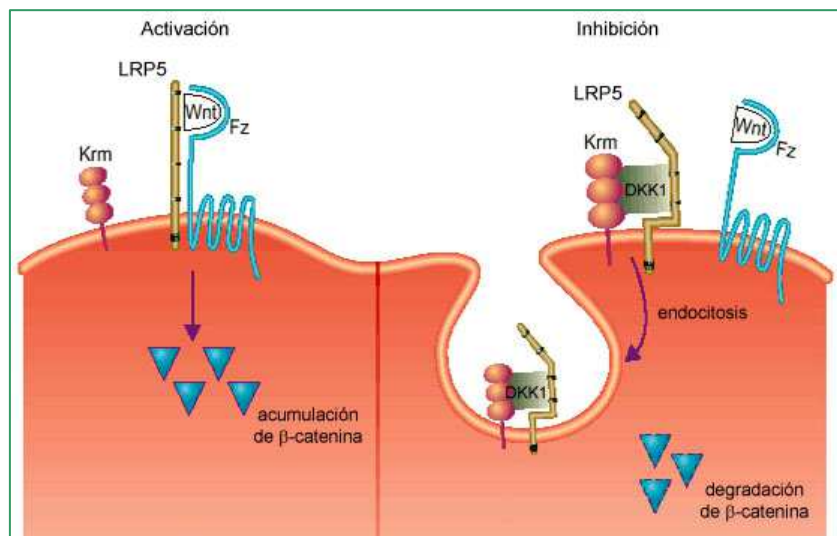


Figura 17. Actuación de DKK1 en la vía de Wnt.

El exceso o sobre-expresión de DKK1, que inhibe la diferenciación y proliferación de osteoblastos, está asociado con la presencia de lesiones óseas osteolíticas en pacientes con mieloma múltiple (Tian et al., 2003). Se cree que DKK1 también podría participar en los procesos de destrucción articular asociados a la artritis reumatoide (Fiter, 2010).

Los modelos animales han proporcionado datos adicionales que apoyan al papel regulador de Dkk1 en el desarrollo óseo. En ratones, deficiencias germinales de Dkk1 resultan en letalidad embrionaria asociada a la ausencia de estructuras craneales y anomalías de los dedos en las extremidades (Mukhopadhyay et al., 2001). Estudios en ratones heterocigotos para una mutación inactivante de Dkk1 muestran alta masa ósea asociada con un aumento significativo en el ratio de formación de hueso (Morvan et al., 2006). Además, la heterocigosidad de un alelo hipomórfico de Dkk1 también resulta en un aumento de la masa ósea (MacDonald et al., 2007).

3.4. Modelos de actuación de la vía de Wnt

Aún no se comprenden por completo los mecanismos fisiológicos por los cuales *LRP5* regula la masa ósea. Dado que *LRP5* se expresa en células de la línea osteoblástica, se supone que mutaciones en este gen alteran directamente la actividad de las células formadoras de hueso. Sin embargo, *LRP5* también se expresa en otros tejidos además del óseo, por lo que cabe la posibilidad de que alteraciones en el gen *LRP5* afecten a la formación del hueso de manera indirecta.

Para determinar si *LRP5* regula directamente las células de la línea osteoblástica, (Yadav et al., 2008) crearon ratones *Lrp5 knock-out* condicionales y ratones *Lrp5 knock-in* condicionales con mutaciones de ganancia de función (G171V o A214V). Ni la delección condicional de *Lrp5* en los progenitores de los osteoblastos o en los osteoblastos maduros, ni la activación condicional por la mutación G171V en los osteoblastos maduros, afectó a la densidad vertebral, al número de osteoblastos ni al ratio de formación ósea. Este resultado parece indicar que *Lrp5* no actúa directamente sobre los osteoblastos. Para explicar esto los autores plantearon la hipótesis de que *Lrp5* tiene una acción sistémica. Según estos autores, la actividad de *Lrp5* está inversamente asociada con la síntesis de serotonina en las células madre intestinales del duodeno, que devuelven la señal a los osteoblastos para influenciar de forma endocrina en la formación del hueso y regular la masa ósea. El mecanismo hormonal que proponen es que la expresión de *Lrp5* en las células enterocromafines inhibe la triptófano hidrolasa 1 y esto hace que disminuya el contenido de serotonina lo que favorece el aumento de la masa ósea (Figura 18). Su modelo está basado en numerosas pruebas realizadas *in vitro* e *in vivo* (Yadav et al., 2008).

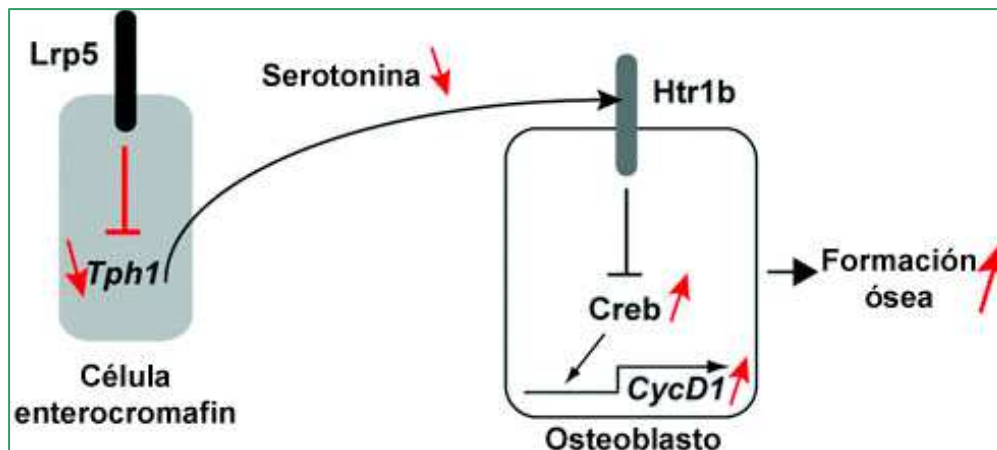


Figura 18. Modelo de regulación Lrp5-serotonina del aumento de masa ósea (Yadav 2008).

Unos años después, otro grupo (Cui et al., 2011) realizó una serie de experimentos similares creando también ratones con alelos *knock-in* de *Lrp5* o alelos condicionales de *Lrp5 knock-out*. Los resultados mostraron que la delección condicional de *Lrp5* en pre-osteocitos y osteocitos reducía la densidad ósea trabecular en los fémures distales y la vértebra L5 y que debilitaba la resistencia del hueso cortical. Sin embargo la delección de *Lrp5* en las células madre intestinales no tenía efecto sobre la masa ósea. Además, la expresión condicional de los alelos de HBM G171V o A214V en los osteocitos aumentaba tanto la masa ósea como su resistencia. Por otro lado, no detectaron cambios en los niveles de serotonina como resultado de las alteraciones en la actividad de *Lrp5* (revisado por Monroe et al., 2012).

Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en las construcciones genéticas, en los modelos murinos, en los métodos usados para medir la densidad ósea, los huesos analizados y/o las técnicas de ensayo de la serotonina (revisado por Monroe et al., 2012). El papel de *Lrp5* en la regulación de la masa ósea no se ha aclarado todavía y el saber si el mecanismo de regulación de la masa ósea a través de *Lrp5* funciona por un mecanismo directo o indirecto es una importante pregunta por resolver.

4. HBM EN LA POBLACIÓN GENERAL: ¿CONDICIÓN MONOGÉNICA O MULTIFACTORIAL?

Los estudios en gemelos y de segregación en familias, además de los resultados obtenidos en los análisis de mapeo genético, muestran que una parte importante de la variación en los fenotipos óseos más estudiados es de origen genético y de carácter poligénico. Los fenotipos óseos más estudiados en la población general son la DMO y la osteoporosis. Estos estudios muestran que para la DMO el 60-90% de su variación estimada es debida a factores genéticos y que además esta heredabilidad es poligénica. De todas formas, los genes implicados, descubiertos con los estudios de mapeo genético, sólo explican una pequeña parte de la heredabilidad de la DMO y además, individualmente contribuyen en menos del 1% a su varianza genética (revisado por Duncan y Brown, 2010). Por ejemplo, en un reciente estudio de meta-análisis de GWA (*genome-wide association*) se han identificado 56 *loci* a lo largo de todo el genoma, que en conjunto explican el 5,8% de las diferencias de DMO femoral en la población general (Estrada et al., 2012).

Aunque la mayoría de los genes tienen una contribución pequeña en la determinación de la DMO, también se sabe que pueden darse grandes variaciones en la DMO debidas a mutaciones poco frecuentes, como ocurre en los fenotipos monogénicos. Estudios de varios genes asociados con enfermedades esqueléticas monogénicas han demostrado que variantes comunes en estos genes están asociadas con la DMO en la población general. Un ejemplo de esto es el gen *LRP5*, ya que mutaciones de pérdida de función en este gen dan lugar al OPPG, mientras que las que son de ganancia de función están asociadas a HBM y por otro lado, se ha visto que variantes comunes o polimorfismos están asociados a variaciones de la DMO de la población general (van Meurs et al., 2008).

Por otro lado, la DMO se distribuye siguiendo una distribución normal en la población general, en uno de cuyos extremos se encontrarían los individuos con HBM. Por tanto, ¿los fenotipos extremos pueden explicarse por alelos raros muy

penetrantes, o por un gran número de variantes comunes poco penetrantes y de efecto aditivo, es decir por un rasgo multifactorial?

OBJETIVOS

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis es realizar el estudio genético de dos fenotipos óseos: la osteocondromatosis múltiple (MO) y la alta masa ósea (HBM). Con el fin de abordar este estudio, se proponen los siguientes objetivos específicos:

Osteocondromatosis múltiple

- Búsqueda de mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2*, en pacientes, mayoritariamente españoles, con MO.
- Estudio de la correlación genotipo-fenotipo en pacientes con MO.

Fenotipo de alta masa ósea

- Análisis mutacional de los genes *LRP5* y *DKK1* en los exones relevantes y sus regiones intrónicas flanqueantes en los probandos con HBM.
- Valoración del efecto aditivo de variantes comunes de riesgo de osteoporosis, en la determinación de la masa ósea en mujeres con HBM mediante su genotipado y el cálculo del riesgo genético de las mujeres con HBM.
- Análisis de la expresión diferencial de genes relevantes en el metabolismo óseo en osteoblastos primarios de dos individuos con HBM frente a individuos control.

RESULTADOS

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LAS PUBLICACIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL

Título de la Tesis: “ESTUDIO GENÉTICO DE DOS FENOTIPOS ÓSEOS: OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE Y ALTA MASA ÓSEA”

Autora: Patricia Sarrión Pérez-Caballero

Directores: Daniel Grinberg Vaisman y Susana Balcells Comas

ARTÍCULO 1

Título: *Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in Spanish patients with multiple osteochondromas*

Autores: Patricia Sarrión, Anna Sangorrin, Roser Urreizti, Andrea Delgado, Rafa Artuch, Loreto Martorell, Judith Armstrong, Jordi Anton, Ferran Torner, Maria Antonia Vilaseca, Julian Nevado, Pablo Lapunzina, Carla G. Asteggiano, Susana Balcells y D. Grinberg

Publicación: *Scientific Reports*. 2013 Feb 26;3:1346. doi: 10.1038/srep01346.

Índice de impacto: Se adjudicará a partir de 2013

Aportación de la doctoranda al artículo: Participación en el diseño del estudio. Coordinación con la doctora Anna Sangorrín, para la recopilación estandarizada de los datos fenotípicos de los pacientes. Diseño de los *primers* de *EXT1* (exones 2-11) y de *EXT2*. Amplificación y genotipado de los genes *EXT1* y *EXT2*. Análisis de las secuencias resultantes. Realización de la técnica de MLPA y análisis e interpretación de los resultados obtenidos. Análisis estadístico de los resultados. Participación en la discusión de los resultados, en la redacción del borrador del artículo y en la elaboración del manuscrito final.

ARTÍCULO 2

Título: *A novel nonsense mutation of the EXT1 gene in an Argentinian patient with multiple hereditary exostoses: a case report*

Autores: Delgado MA, Sarrión P, Azar N, Zecchini L, Robledo HH, Segura F, Balcells S, Grinberg D, Dodelson de Kremer R, Asteggiano CG.

Publicación: *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Jun 6;94(11):e76. doi: 10.2106/JBJS.J.01920.

Índice de impacto : 3,3

Aportación de la doctoranda al artículo: Diseño de los *primers* de EXT1 (exones 2-11) y de EXT2. Colaboración en la redacción del manuscrito.

ARTÍCULO 3

Título: *A broad spectrum of genomic changes in EXT1/EXT2-cdg latin american patients with a severe phenotype of multiple osteochondromatosis.*

Autores: Delgado M.A., Martinez-Domenech G., Sarrión P., Urreizti R., Zecchini L., Robledo H.H., Segura F., Dodelson de Kremer R., Balcells S., Grinberg D., Asteggiano C.G.

Publicación: *Manuscrito en preparación*

Aportación de la doctoranda al artículo: La doctoranda ha colaborado en la amplificación y genotipado de los genes EXT1 y EXT2, realización de la técnica de MLPA y análisis e interpretación de los resultados obtenidos. También ha colaborado en la redacción del manuscrito.

ARTÍCULO 4

Título: *A Genomic and Transcriptomic Approach to the High Bone Mass Phenotype: Evidence of Heterogeneity and Additive Effects of TWIST1, IL6R, DLX3 and PPARG.*

Autores: Patricia Sarrión, Leonardo Mellibovsky, Roser Urreizti, Sergi Civit, Neus Cols, Natàlia García-Giralt, Guy Yoskovitz, Alvaro Aranguren, Jorge Malouf, Silvana

Di Gregorio, Luís Del Río, Roberto Güerri, Xavier Nogués, Adolfo Díez-Pérez, Daniel Grinberg and Susana Balcells.

Publicación: *Manuscrito en preparación*

Aportación de la doctoranda al artículo: Participación en el diseño del estudio. Diseño de los *primers* para la amplificación de los genes de interés de *LRP5* y *DKK1*. Amplificación y análisis de secuencias. Análisis de los datos del genotipado de los 55 loci. Cultivos celulares de osteoblastos primarios. Extracción de ARN, síntesis de cADN y PCR a tiempo real. Participación en la selección de genes para el estudio transcriptómico. Participación en el análisis estadístico de los resultados. Participación en la discusión de los resultados, en la redacción del borrador del artículo y en la elaboración del manuscrito final.

Barcelona, 7 de mayo de 2013

Conformidad de los directores de tesis:

Dra. Susana Balcells Comas

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

CAPÍTULO 1. OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE

ARTÍCULO 1. Mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2* en pacientes españoles con osteocondromatosis múltiple

RESUMEN

La osteocondromatosis múltiple es una enfermedad esquelética autosómica dominante caracterizada por la formación de múltiples tumores recubiertos por cartílago. Se han identificado dos genes causales, *EXT1* y *EXT2*, que son responsables del 65% y el 30% de los casos, respectivamente.

Hemos llevado a cabo el análisis mutacional de los genes *EXT1* y *EXT2* en 39 pacientes españoles no relacionados, la mayoría de ellos con un fenotipo moderado, y hemos buscado correlaciones genotipo-fenotipo.

Hemos encontrado el alelo mutado en 37 pacientes, 29 en *EXT1* y 8 en *EXT2*. Cinco de las mutaciones de *EXT1* eran deleciones identificadas mediante MLPA. Se han documentado dos casos de mosaicismo. Detectamos un menor número de exostosis en los pacientes con mutaciones *missense* frente a otro tipo de mutaciones.

En conclusión, hemos encontrado la mutación en *EXT1* o *EXT2* en el 95% de los pacientes españoles. Dieciocho de las mutaciones eran nuevas.

REFERENCIA

P. Sarrión, A. Sangorrin, R. Urreizti, A. Delgado, R. Artuch, L. Martorell, J. Armstrong, J. Anton, F. Torner, M. A. Vilaseca, J. Nevado, P. Lapunzina, C. G. Asteggiano, S. Balcells & D. Grinberg. Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes in Spanish patients with multiple osteochondromas. *Scientific Reports*. 2013 Feb 26;3:1346. doi: 10.1038/srep01346.



Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes in Spanish patients with multiple osteochondromas

SUBJECT AREAS:
GENETIC CAUSE OF DISEASE
BONE CANCER
METABOLIC DISORDERS
BONE DEVELOPMENT

P. Sarrion¹, A. Sangorrin², R. Urreiziti¹, A. Delgado³, R. Artuch², L. Martorell², J. Armstrong², J. Anton², F. Torner², M. A. Vilaseca², J. Nevado⁴, P. Lapunzina⁴, C. G. Asteggiano^{3,5,6}, S. Balcells^{1*} & D. Grinberg^{1*}

¹Department of Genetics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, Spain, ²Hospital Sant Joan de Déu, CIBERER, Barcelona, Spain, ³CEMECO, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, ⁴INGEMM-IdiPaz, Hospital Universitario La Paz, CIBERER, Madrid, Spain, ⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina, ⁶Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Received
26 October 2012

Accepted
7 February 2013

Published
26 February 2013

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.G. (dgrinberg@ub.edu)

* These authors contributed equally to this work.

Multiple osteochondromas is an autosomal dominant skeletal disorder characterized by the formation of multiple cartilage-capped tumours. Two causal genes have been identified, *EXT1* and *EXT2*, which account for 65% and 30% of cases, respectively. We have undertaken a mutation analysis of the *EXT1* and *EXT2* genes in 39 unrelated Spanish patients, most of them with moderate phenotype, and looked for genotype-phenotype correlations. We found the mutant allele in 37 patients, 29 in *EXT1* and 8 in *EXT2*. Five of the *EXT1* mutations were deletions identified by MLPA. Two cases of mosaicism were documented. We detected a lower number of exostoses in patients with missense mutation versus other kinds of mutations. In conclusion, we found a mutation in *EXT1* or in *EXT2* in 95% of the Spanish patients. Eighteen of the mutations were novel.

Multiple osteochondromas (MO, MIM#133700, #133701), also known as multiple hereditary exostoses, is an autosomal dominant skeletal disorder characterized by the formation of multiple cartilage-capped tumours (exostoses or osteochondromas). The prevalence of MO is estimated at 1/50,000 in the Western population¹. Osteochondromas are the result of excessive chondrocyte proliferation and bone growth at the juxtaepiphyseal regions of long bones and are the most common benign bone tumour. MO is characterized by an important inter- and intra-familial phenotypic variability, including variations in the number and size of osteochondromas and in the number and location of bones involved. Secondary complications are heterogeneous too, and may consist of deformities, functional limitations, compression of nerves and blood vessels, pain caused by pressure on neighbouring tissues and short stature². The most serious secondary complication is the malignant transformation toward a secondary peripheral chondrosarcoma, occurring in 0.5–5% of patients³.

MO is a genetically heterogeneous disease. In almost 90% of MO patients, germline mutations in *EXT1* (MIM #608177)⁴ or *EXT2* (MIM #608210)^{5,6} are found. *EXT1* maps to chromosome 8q24.11–q24.13, comprises 11 exons and spans approximately 350 kb⁷, while *EXT2*, located at 11p11–p11.2, consists of 16 exons and spans almost 108 kb⁸. Both genes act as tumour suppressors. Involvement of other genes has been suggested, since there are families with no mutation identified in either *EXT1* or *EXT2*.

The *EXT* genes encode ubiquitous glycosyltransferases, catalyzing heparan sulfate (HS) polymerization at HS proteoglycans (HSPGs). These HSPGs play a major role in the diffusion of signalling molecules such as Indian Hedgehog (Ihh), which is an important regulator of chondrocyte proliferation and differentiation in the growth plate⁹.

Approximately 10% of patients have a *de novo* mutation¹⁰. Loss of the wild-type allele in hereditary cases indicates that inactivation of both *EXT* alleles is required for osteochondroma formation¹¹, confirming their tumour suppressor action that results in a loss of chondrocyte polarization¹². However, the inactivation of both alleles probably occurs only in some of the cells in the cartilaginous cap of osteochondromas^{12,13}.

Several studies have reported on MO causing mutations in different populations. These are being gathered in the Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOMdb) (<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>), currently listing over 400 and 200 different mutations in *EXT1* and *EXT2*, respectively. Most of the mutations (80%) are nonsense, frame-shift and splice-site mutations, resulting in a premature termination of translation, or involve partial or total deletion of the gene. Although it has been suggested that mutations in *EXT1* are associated with a



more severe phenotype than mutations in *EXT2*^{14–16}, many aspects of the phenotypic variability observed in patients have yet to be understood at the genetic level. As suggested by the Human Variome Project initiative, characterization of causative mutations in familial and sporadic cases in diverse populations is needed for full understanding of Mendelian diseases¹⁷.

Here we present the mutational analysis of 39 unrelated Spanish MO patients and the clinical features of most of them. This is the first report of MO mutations in the Spanish population.

Results

Clinical features. The main clinical features of the patients are detailed in Table 1. Most of the patients (77%) had deformities (classes II and III). More than half the cases (51%) had more than 20 exostoses. Mean age of onset was 2 years and clinical evaluation was performed, on average, 12 years later. Only one of the 39 cases developed a malignant transformation.

***EXT1* and *EXT2* point mutations.** On sequencing all exons and flanking regions of the *EXT1* and *EXT2* genes in the samples of 39 unrelated patients, 31 pathogenic point mutations were identified (Table 2). Twenty-four different mutations were found in the *EXT1* gene, while 7 were found in *EXT2*. One of them (*EXT2*, c.544C > T) was found in two unrelated patients. Eighteen out of the 31 mutations were novel, two of them missense in *EXT1*: p.Asp231Val and p.Pro337Arg. Bioinformatic predictions suggested a pathogenic role for both of them [PolyPhen, probably_damaging (1); SIFT, deleterious (0)]. The mutation screening also detected two changes that were interpreted as non-pathogenic (*EXT1*, c.962+8_962+11delTCTG and *EXT2*, c.1178G > A), indicated in italics in Table 2. These two changes were found in patients BCN33 and BCN29, respectively, together with additional mutations, as indicated in Figure 1 and Table 2. In the case of BCN33, the patient inherited the *EXT1*, c.962+8_962+11delTCTG change

from his unaffected mother, while the other mutation, *EXT2*, c.544C > T (p.Arg182*), was putatively inherited from his affected father (from whom a sample was not available). Patient BCN29 inherited the *EXT2*, c.1178G > A (p.Arg393Gln) change from her unaffected father, while she presented with a *de novo*, previously described mutation in the *EXT1* gene: c.1019G > C (p.Arg340Pro). After sequencing and thorough manual checking of chromatograms, seven patients remained undiagnosed at the molecular level.

***EXT1* deletions.** Exon dosage for *EXT1* and *EXT2* was assessed by MLPA analysis of the seven samples without identified point mutations. Five unrelated patients (BCN06, BCN07, BCN19, BCN20/25 and BCN22) were found to bear different *EXT1* deletions (Figure 2 and Table 2). No large deletion was found in the *EXT2* gene. The proband from family 20/25 was hemizygous for all *EXT1* exons (i.e., he presented with half a dose), while probands BCN06 and BCN07 (the latter not shown in Figure 2) were hemizygous for exons 2 to 11, and patient BCN19 was hemizygous only for exon 8. In contrast, patient BCN22 showed a partial loss of dose for exons 2 to 11, consistent with a mosaic constitution (see Figure 2). Relatives of patient BCN06, including the affected father, were available for MLPA examination. As seen in Figure 2, the father had a partial loss of dose of exons 2 to 11, compared with the unaffected relatives (proband’s mother and brother), consistent with a case of mosaicism for the deletion present in his son. For two cases (BCN21 and BCN28) no mutation was found after sequencing and MLPA analyses.

Phenotype-genotype correlations. We examined the *EXT1* and *EXT2* mutations in relation to the various phenotypic aspects shown in Table 1. Gene distribution within the three clinical classes showed a higher proportion of *EXT2* mutations in class III than in classes I and II (Figure 3A). No significant differences were found when comparing patients with *EXT1* and *EXT2* mutations for

Table 1 | Clinical and genetic data of the 39 patients with multiple osteochondromas

	All patients n = 39	With <i>EXT1</i> mutations n = 29 (74.4%)	With <i>EXT2</i> mutations n = 8 (20.5%)	No mutation n = 2 (5.1%)
Clinical class				
I	7 (18.9%)	6 (21.4%)	1 (14.3%)	0
II	17 (45.9%)	14 (50.0%)	2 (28.6%)	1 (50.0%)
III	13 (35.1%)	8 (28.6%)	4 (57.1%)	1 (50.0%)
NA	2	1	1	0
Number of exostoses				
≤5	3 (8.1%)	3 (10.7%)	0	0
6–20	14 (37.8%)	9 (32.1%)	4 (57.1%)	1 (50.0%)
>20	20 (54.1%)	16 (57.1%)	3 (42.9%)	1 (50.0%)
NA	2	1	1	0
Malignant transformation	1	1	0	0
Gender				
Male	24 (61.5%)	17 (58.6%)	5 (62.5%)	2 (100%)
Female	15 (38.5%)	12 (41.4%)	3 (37.5%)	0
Disease onset				
Range	0.5–5	0.5–5	0.5–3	2
Mean (SD)	2 (1.53)	2 (1.60)	1 (1.21)	2 (0)
Lumbar densitometry				
Impaired	6 (33.3%)	4 (28.6%)	2 (50%)	-
Normal	12 (66.6%)	10 (71.4%)	2 (50%)	-
NA	21	15	4	2
Type of mutation				
Missense	6 (15.4%)	6 (20.7%)	0	-
Other	31 (79.5%)	23 (79.3%)	8 (100%)	-
Not found	2 (5.1%)	0	0	2

NA: not available.

Table 2 | Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes

Gene	Exon or intron	cDNA change	Protein change	Reference	Family	
<i>EXT1</i>	Exon 1	c.208C > T	p.Gln70*	Present study	BCN01	
	Exon 1	c.228_229delCA	p.Ser76Serfs*111	Present study	BCN36	
	Exon 1	c.294C > A	p.Cys98*	Present study	MAD03	
	Exon 1	c.369_370delA	p.Glu125Argfs*11	Present study	BCN40	
	Exon 1	c.551G > A	p.Trp184*	Present study	MAD04	
	Exon 1	c.552G > A	p.Trp184*	Present study	BCN31	
	Exon 1	c.692A > T	p.Asp231Val	Present study	BCN11	
	Exon 1	c.793delG	p.Val265Tyrfs*8	Jennes et al. ²¹	BCN09 [†]	
	Intron 1	c.962+8_962+11delTCTG	Unknown	Signori et al. ²³	BCN33	
	Exon 2	c.967_972del	p.Asp323_Tyr324del	Present study	BCN39	
	Exon 2	c.1010C > G	p.Pro337Arg	Present study	BCN35	
	Exon 2	c.1016G > A	p.Gly339Asp	Philippe et al. ²⁸	BCN15	
	Exon 2	c.1019G > C	p.Arg340Pro	LOVD [§]	BCN29	
	Exon 2	c.1019G > A	p.Arg340His	Raskind et al. ²⁹	MAD01	
	Exon 2	c.1021A > G	p.Arg341Gly	LOVD [§]	BCN26	
	Intron 2	c.1057-3C > G	Unknown	LOVD [§]	MAD02	
	Intron 2	c.1057-2A > C	Unknown	Present study	BCN32	
	Intron 3	c.1164+1G > A	Unknown	Present study	BCN38	
	Exon 4	c.1261A > T	p.Lys421*	Present study	BCN14	
	Exon 6	c.1468delC	p.Leu490Argfs*9	Signori et al. ²³	BCN42	
	Exon 6	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Ahn et al. ⁴	BCN41	
	Exon 8	Deletion exon 8	p.Val545_Glu574del	Jennes et al. ²¹	BCN19	
	Intron 9	c.1883+2T > G	Unknown	Seki et al. ³⁰	BCN05	
	Exon 10	c.1896C > G	p.Tyr632*	Heinritz et al. ³¹	BCN27	
	Exon 10	c.1896C > A	p.Tyr632*	Lonie et al. ³²	BCN37	
	Exon 10	c.2051_2053del3insA	p.Gly684Glufs*10	Present study	BCN03	
	Exon 1-11	Exon 1-11 deletion	Unknown	Jennes et al. ²¹	BCN20/25	
	Exon 2-11	Exon 2-11 deletion	Unknown	Jennes et al. ²¹	BCN06; BCN07	
	<i>EXT2</i>	Exon 2-11	Mosaic deletion	Unknown	Szuhai et al. ²⁴	BCN22 [*]
		Exon 2	c.415_416delGA	p.Asp139Glnfs*2	Present study	BCN17
		Exon 2	c.424_425insT	p.Tyr142Leufs*4	Present study	BCN34
Exon 3		c.540G > A	p.Trp180*	Present study	BCN04	
Exon 3		c.544C > T	p.Arg182*	Dobson-Stone et al. ²⁵	BCN18; BCN33	
Exon 5		c.783_789del7	p.His262Serfs*6	Present study	BCN10	
Exon 6		c.1073G > A	p.Trp358*	LOVD [§]	BCN30	
Exon 8		c.1178G > A	p.Arg393Gln	Present study	BCN29	
Exon 8		c.1278T > A	p.Tyr426*	Present study	BCN13	

In italics: non-pathogenic variants (see text and Figure 1 for details).

[†]Patient with malignant transformation.

[§]<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>.

^{*}A similar mosaic deletion was found in the father of patient BCN06.

age of disease onset or number of osteochondromas. In *EXT1* patients, we compared the group of 6 individuals bearing missense mutations with 18 patients carrying other type of mutations (nonsense and small or large insertions and deletions) in relation to the number of exostoses. As shown in Figure 3B, a significant difference was found (mean number of exostoses for missense =

14.33; SD = 8.24; mean for other = 26.50; SD = 12.66; $p = 0.04$). However, no significant difference in the age of onset of the disease was found between these two groups (not shown). Lumbar densitometry was performed in 18 patients: results showed impairment in 6 cases, which harboured non-missense mutations, 4 in *EXT1* gene and 2 in *EXT2* gene.

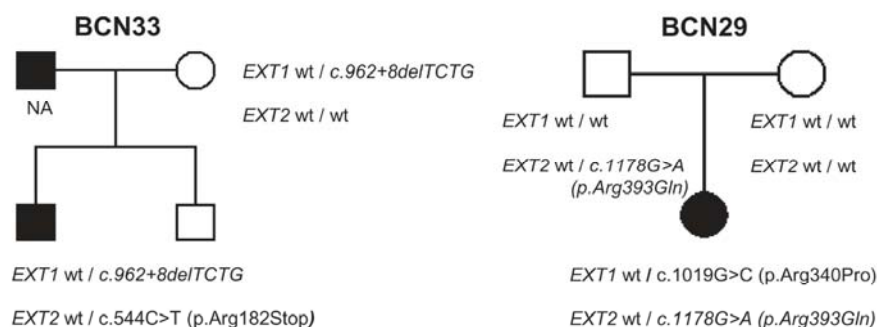


Figure 1 | Segregation analysis in the BCN33 and BCN29 families, in which the probands were found to bear two mutations each, one in *EXT1* and one in *EXT2*. Italics indicate mutations considered non-pathogenic. NA: DNA not available.

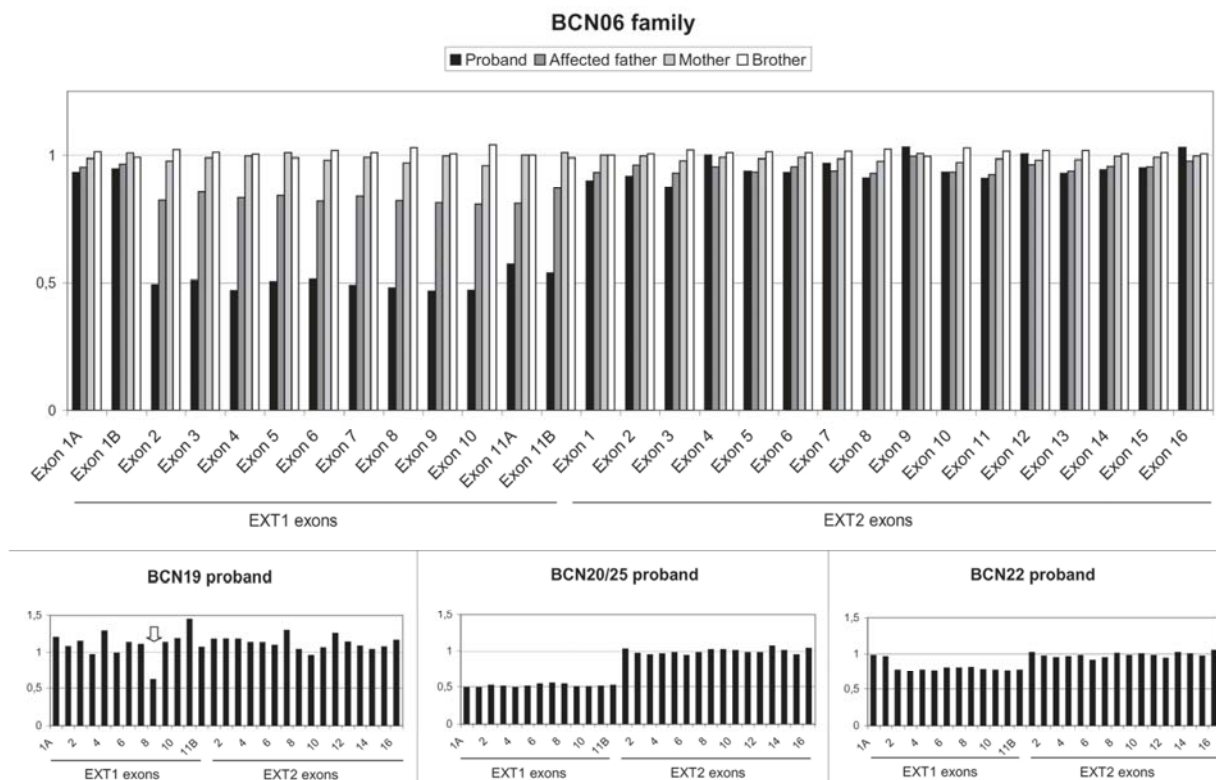


Figure 2 | MLPA results for some of the patients bearing deletions of different size in the *EXT1* gene. In the Y axis, 1 and below 0.6 correspond to full dose (two copies) and half dose (one copy) of the corresponding exons, respectively. For the BCN06 family, results for different members of the family are shown. Arrow in BCN19 proband indicates the deletion of exon 8.

Patients without identified mutations in *EXT1* or *EXT2*. Details of the two unrelated patients (BCN21 and BCN28) with no identified *EXT1* or *EXT2* mutations are included in Table 1. Patient BCN21 was a son of an unaffected couple, while BCN28 inherited the disease from his father. Both presented with a number of exostoses and an onset age that are within the range of the rest of the patients.

Discussion

Thirty-nine Spanish unrelated patients were analyzed and the mutant allele was identified in 37 of them. Twenty-nine patients

(74%) had mutations in *EXT1*, while 8 (21%) had mutations in *EXT2* (Figure 4A). Only two patients remained undiagnosed at the molecular level. Genotype-phenotype correlations were analysed. Patients bearing *EXT1* missense mutations correlated with a lower number of exostoses.

The greater number of *EXT1* mutations is in agreement with most other studies of different populations (Figure 4A)^{10,14,18,21–23}. The proportion of missense mutation (15.4%) agrees with the large study by Pedrini et al.¹⁸. All the missense mutations were in *EXT1* and 5 out of the 6 clustered in residues 337–341, while the novel missense

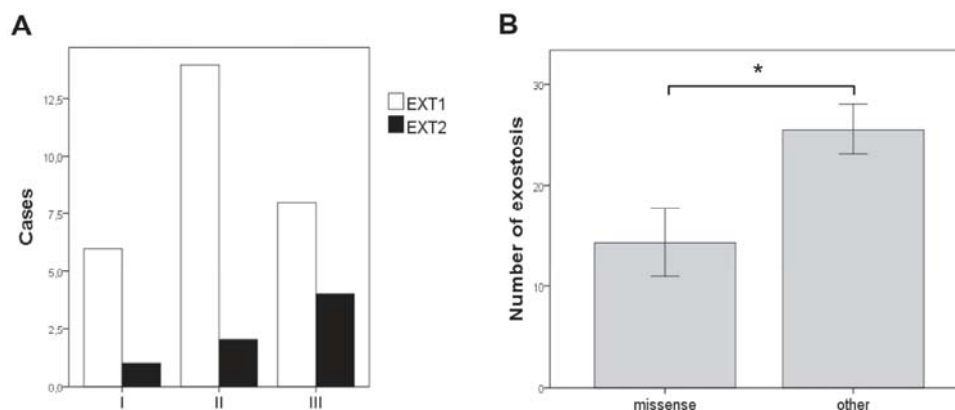


Figure 3 | Genotype-phenotype correlations. (A) Distribution of cases with mutations in *EXT1* or *EXT2* among the three clinical classes. (B) Average number of exostoses among patients bearing missense mutations in *EXT1* (n = 6) or other type of mutations (nonsense and small or large insertions and deletions) in the same gene (n = 18).

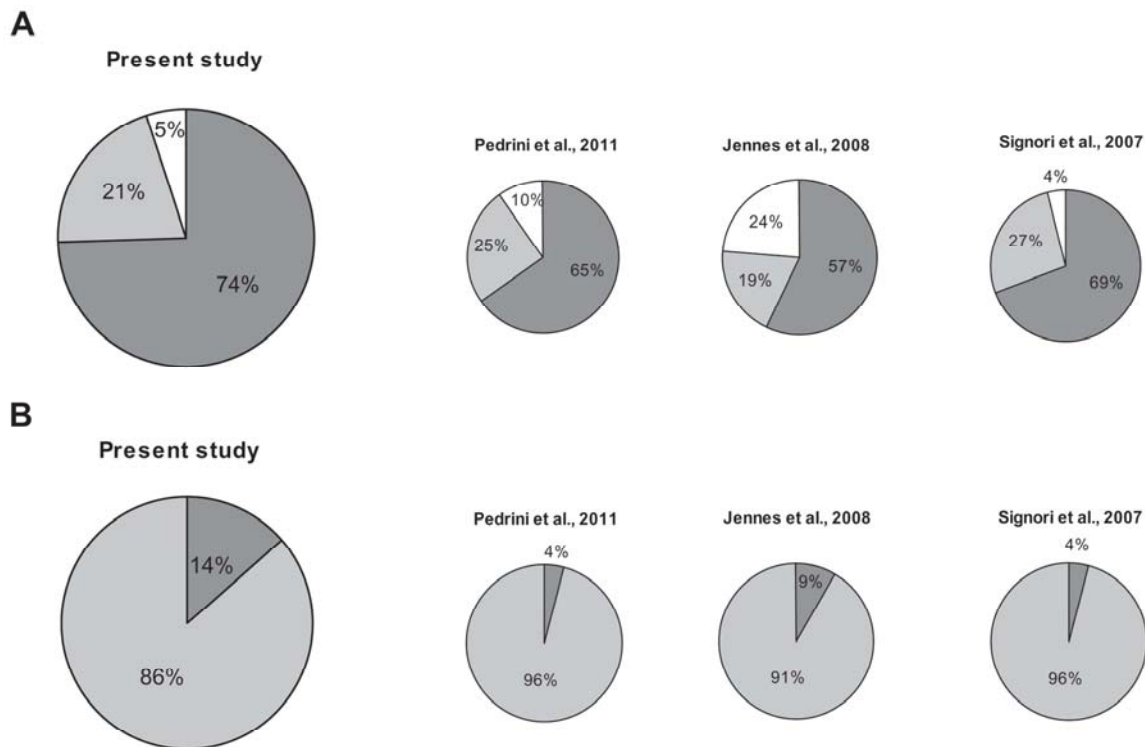


Figure 4 | Comparison of mutation frequencies with previous studies. (A) Proportion of *EXT1* mutation cases (dark grey), *EXT2* mutation cases (light grey) and cases with no mutation identified (white). (B) Among cases with identified mutations, proportion of large rearrangements (at least one exon) are shown in dark grey, while point mutations and small insertions and deletions are shown in light grey.

mutation (p.Asp231Val), lay outside this region. Five probands (14% of the cases) were found to carry partial or whole *EXT1* deletions. This proportion is higher than that found by Jennes et al.²¹ and Signori et al.²³ (Figure 4B). All these deletions had been previously described²¹. However, whether the breakpoints in all cases are the same or not remains to be studied. Only one publication has addressed this issue and found that two cases with deletion of exons 2 to 11 of *EXT1* (and two cases with an exon 8 deletion in *EXT2*) bore different breakpoints²¹.

We found two cases of mosaicism for the exon 2–11 deletion, which deserve further discussion. In one case, the patient (BCN06) bore the deletion, while the father, from whom he had inherited the disease, was discovered to be a mosaic thanks to the previous finding of the son's mutation. The other case (BCN22) showed results that were consistent with a deletion, although the MLPA values for exons 2 to 11 were above the threshold for hemizygoty (see Figure 2). These cases are similar to those described by Szuhai et al.²⁴. Both mosaic cases (BCN06f and BCN22) had an early disease onset (2 years) and neither was affected less than the average (BCN22 belongs to class IIB). This suggests that mosaic mutations play a role in the pathology: it seems that the deletion of one allele (or of a large part of it) in a relatively small number of cells is enough to trigger the phenotype. However, mosaicism was observed in blood cells, while the actual status in bone remains to be studied.

Two patients bore two changes each, one in *EXT1* and one in *EXT2*. In patient BCN33, the *EXT2* nonsense mutation is undoubtedly pathogenic, has been previously described²⁵ and was also found in another patient in our series (BCN18). On the other hand, the pathogenic effect of the donor splice site deletion in intron 1 of *EXT1* is dubious. It was described as a pathogenic mutation by Signori et al.²³, in an Italian MO patient, and was absent in 100 Spanish control chromosomes. However, the splice score was not affected

by the change (data not shown). A novel putative donor site generated by the 4-bp deletion has a very low score, making its use unlikely. Moreover, the patient inherited the disease from his father (Figure 1B) and there are several affected relatives on the paternal side. However, the patient inherited the intron 1 4-bp deletion from his healthy mother (and there are no affected relatives on the mother's side). The best explanation with the available data is that the 4-bp deletion in intron 1 is a rare non-pathogenic variant. Patient BCN29 inherited the *EXT2* c.1178G > A (p.Arg393Gln) from her unaffected father (Figure 1B). Additionally, she presented with a *de novo* *EXT1* mutation: c.1019G > C (p.Arg340Pro). This mutation has been previously described by several authors and reviewed by Jennes et al.¹⁰. That the father had the *EXT2* p.Arg393Gln change and is unaffected and that the other mutation was shown to be pathogenic strongly suggest that the former is a non-pathogenic variant. Protein sequence alignments show that *Drosophila melanogaster* bears a Gln at this position (data not shown). Additionally, the p.Arg393Gln change was found in the Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [June, 2012] with a frequency of 16/13,004 (0.12%).

At the genotype-phenotype level, our data showed that the class with more severe clinical presentations (class III) had a higher proportion of *EXT2* mutations than the other classes. However, it must be noted that this may be due to a relatively small number of patients with *EXT2* mutations in our study, all of whom bore truncating mutations. When the average number of exostoses in patients with different types of mutations was compared, a significant difference ($p < 0.05$) was detected between missense mutations and other types of mutation (nonsense and small or large insertions and deletions). Patients with missense mutations had fewer osteochondromas than the rest. A hypothesis to explain this is that some residual activity of the mutant protein may remain only in the case of mutations of



amino acid change, which may be enough to produce a small amount of heparan sulfate. This is in agreement with the continuum model suggested by Berger et al.²⁶ which states that protein function can be a continuum related to the level of expression or activity of the tumour suppressor genes rather than to discrete step-by-step changes in gene copy number. One patient out of 39 developed a malignant tumour (2.6%). This figure is within the range of 2–5% described by several authors (see, for example, Bovee³; Pedrini et al.¹⁸). There were two other patients in whom no disease-causing mutation could be identified (5.1%). This proportion is lower than that found in most studies, including the large one by Pedrini et al.¹⁸. There are different explanations for the undetected mutations, including a possible third locus, the presence of mosaic point mutations gone undetected or the presence of mutations in unexplored regions such as the promoter, recently characterized by Jennes et al.²⁷, or deep intronic.

Overall, our phenotype-genotype correlation results do not agree with those of Pedrini et al.¹⁸, which consisted of an association of a mild phenotype with female sex, *EXT2* mutations and absence of *EXT1/2* mutations. As stated above, the main limitation of our study was the small sample size. Comparisons between groups had not enough statistical power and we could not detect differences, for example, in the association between sex and the severity of the disease. The main challenge, therefore, will be to collect more cases to further investigate the genotype-phenotype correlation in Spanish patients.

To conclude, this is the first genetic study of MO performed in a Spanish cohort. We described a collection of mutations in *EXT1* and *EXT2* and it was possible to offer diagnosis and genetic counselling to the MO patients and their families. This is an essential first step, in order to gain insight into the bases of the disease and then to develop novel strategies in the search for possible therapies.

Methods

Patients. In this study we investigated patients from 39 Spanish families with MO. Diagnosis, performed at 2 centres (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, n = 35 families, and Hospital Universitario "La Paz", Madrid, n = 4 families), was based on the presence of MO confirmed by physical and/or radiographic examinations. Blood samples were obtained from patients and available relatives for genomic DNA extraction, after informed consent. Samples from patients were obtained in accordance with the Helsinki Declaration, as revised in 2000. The experiments were approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu.

Clinical studies. A clinical diagnosis of MO was achieved after obtaining an accurate medical history and physically examining the patient, including the evaluation of all palpable lesions, height, long bone and trunk deformities, and functional limitations.

Patients were classified in three clinical classes based on the presence of deformities and functional limitations (I: no deformities and no functional limitations; II: deformities and no functional limitations; and III: deformities and functional limitations), as reported elsewhere¹⁸. The subcategories were defined by the number of osteochondromas (A: less than 20; B: more than 20).

Genotyping and mutation analysis. Genomic DNA mutation screening of the *EXT1* and *EXT2* genes was performed for each patient. New primers were designed to amplify all exons and flanking intronic regions of both the *EXT1* and the *EXT2* genes, so that all fragments, except those corresponding to exon 1 of *EXT1*, could be amplified by polymerase chain reaction (PCR) simultaneously. Primers are listed in on-line Supplementary Table S1. Exon 1 of *EXT1* and exon 4 of *EXT2* were split into several overlapping fragments, to obtain amplification products that did not exceed 650 bp. PCR was performed in a 50 µl reaction volume, containing ~100 ng of genomic DNA, 1× PCR buffer, 1–2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each forward and reverse primer and 0.7 U of GoTag[®] Flexi polymerase (Promega, Madison, WI). All PCR programs included an initial denaturation of 4 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at annealing temperature (Ta) and 10 sec at 72°C. Finally, an extension at 72°C was performed for 5 min. Annealing temperature was 60°C for all primer combinations, with the exception of primers for the amplification of overlapping regions of exon 1 of *EXT1*. For these primer combinations, Ta was set at 55°C for ex1.1 and 57°C for ex1.2 and ex1.3. After amplification, the PCR products were purified using a PCR purification kit (GE Healthcare) and then sequenced with BigDye 3.1 (Applied Biosystems; life technologies) in the following PCR programme: denaturation 1 min at 96°C, 25 cycles of 10 sec at 96°C, 5 sec at 55°C and 4 min at 60°C. The sequences were analyzed with an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems life technologies). The presence of all the mutations detected was confirmed by digestion of each PCR product with the corresponding enzyme. None of the novel mutations

were found in 50 control samples. All chromatograms of *EXT1* and *EXT2* exons of negative cases were manually re-analyzed.

The mutations were given the official HGVS nomenclature (www.hgvs.org). As reference sequences, NM_000127.2 for *EXT1* and NM_000401.3 for *EXT2* were used.

MLPA. The number of copies of the *EXT1* and *EXT2* genes present in genomic DNA samples was analyzed by the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique designed by MRC-Holland. We used the commercial kit #P215-B1 and followed the manufacturer's instructions. PCR products were run on an ABI 3730 DNA Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Peaks were analyzed by means of the Coffalyser v9.4 software. The proportion of each peak relative to the height of all peaks was calculated for each sample and then compared to proportions for the corresponding peak averaged for a set of at least ten normal DNA samples. Ratios of 1.0 were treated as normal copy number. Ratios below 0.6 were considered as deletions. Each positive result was confirmed in a second independent MLPA reaction.

Assessment of functionality of missense mutations. Disease causing potential of missense mutations was evaluated using two different bioinformatic tools: *SIFT* and *PolyPhen*^{19,20}.

Statistical analysis. Normal distribution of the data and variance differences were assessed by the Kolmogorov-Smirnov and Lavenne tests, respectively. Assessment of mean differences was performed using ANOVA. A p value <0.05 was considered significant. The statistical analysis used the PASW 18.0 program.

- Schmale, G. A., Conrad, E. U. r. & Raskind, W. H. The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am.* **76**, 986–992 (1994).
- Hennekam, R. C. Hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* **28**, 262–266 (1991).
- Bovee, J. V. Multiple osteochondromas. *Orphanet J Rare Dis.* **3**, 3 (2008).
- Ahn, J., Ludecke, H. J., Lindow, S., Horton, W. A., Lee, B. & Wagner, M. J. et al. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (*EXT1*). *Nat Genet.* **11**, 137–143 (1995).
- Stickens, D., Clines, G., Burbec, D., Ramos, P., Thomas, S. & Hogue, D. et al. The *EXT2* multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet.* **14**, 25–32 (1996).
- Wuyts, W., Van Hul, W., Wauters, J., Nemtsova, M., Reyniers, E. & Van Hul, E. V. et al. Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet.* **5**, 1547–1557 (1996).
- Ludecke, H. J., Ahn, J., Lin, X., Hill, A., Wagner, M. J. & Schomburg, L. et al. Gene organization and promoter structure of the human *EXT1* gene. *Genomics.* **40**, 351–354 (1997).
- Clines, G. A., Ashley, J. A., Shah, S., Lovett, M. The structure of the human multiple exostoses 2 gene and characterization of homologs in mouse and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* **7**, 359–367 (1997).
- Bellaiche, Y., The, I. & Perrimon, N. Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumour suppressor *EXT-1* and is needed for Hh diffusion. *Nature.* **394**, 85–88 (1998).
- Jennes, I., Pedrini, E., Zuntini, M., Mordenti, M., Balkassmi, S. & Asteggiano, C. G. et al. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum Mutat.* **30**, 1620–1627 (2009).
- Bovee, J. V., Cleton-Jansen, A. M., Wuyts, W., Caethoven, G., Taminiou, A. H. & Bakker, E. et al. *EXT*-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas. *Am J Hum Genet.* **65**, 689–698 (1999).
- de Andrea, C. E., Wiweger, M., Prins, F., Bovee, J. V., Romeo, S. & Hogendoorn, P. C. Primary cilia organization reflects polarity in the growth plate and implies loss of polarity and mosaicism in osteochondroma. *Lab Invest.* **90**, 1091–1101 (2010).
- Jones, K. B., Piombo, V., Searby, C., Kurriger, G., Yang, B. & Grabelius, F. et al. A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of *Ext1* in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 2054–2059 (2010).
- Francannet, C., Cohen-Tanugi, A., Le Merrer, M., Munnich, A., Bonaventure, J. & Legeai-Mallet, L. Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* **38**, 430–434 (2001).
- Porter, D. E., Lonie, L., Fraser, M., Dobson-Stone, C., Porter, J. R. & Monaco, A. P. et al. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A genotype-phenotype study. *J Bone Joint Surg Br.* **86**, 1041–1046 (2004).
- Alvarez, C. M., De Vera, M. A., Heslip, T. R. & Casey, B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clin Orthop Relat Res.* **462**, 73–79 (2007).
- Kaput, J., Cotton, R. G., Hardman, L., Watson, M., Al Aqeel, A. I. & Al-Aama, J. Y. et al. Planning the human variome project: the Spain report. *Hum Mutat.* **30**, 496–510 (2009).
- Pedrini, E., Jennes, I., Tremosini, M., Milanese, A., Mordenti, M. & Parra, A. et al. Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors. *J Bone Joint Surg Am.* **93**, 2294–2302 (2011).



19. Ng, P. C. & Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **11**, 863–874 (2001).
20. Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A. & Bork, P. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* **7**, 248–249 (2010).
21. Jennes, I., Entius, M. M., Van Hul, E., Parra, A., Sangiorgi, L. & Wuyts, W. Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteochondromas. *J Mol Diagn.* **10**, 85–92 (2008).
22. Reijnders, C. M., Waaijer, C. J., Hamilton, A., Buddingh, E. P., Dijkstra, S. P., Ham, J. *et al.* No haploinsufficiency but loss of heterozygosity for EXT in multiple osteochondromas. *Am J Pathol.* **177**, 1946–1957 (2010).
23. Signori, E., Massi, E., Matera, M. G., Poscente, M., Gravina, C. & Falcone, G. *et al.* A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. *Genes Chromosomes Cancer.* **46**, 470–477 (2007).
24. Szuhai, K., Jennes, I., de Jong, D., Bovee, J. V., Wiweger, M. & Wuyts, W. *et al.* Tiling resolution array-CGH shows that somatic mosaic deletion of the EXT gene is causative in EXT gene mutation negative multiple osteochondromas patients. *Hum Mutat.* **32**, E2036–2049 (2011).
25. Dobson-Stone, C., Cox, R. D., Lonie, L., Southam, L., Fraser, M. & Wise, C. *et al.* Comparison of fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis and denaturing high-performance liquid chromatography for detection of EXT1 and EXT2 mutations in hereditary multiple exostoses. *Eur J Hum Genet.* **8**, 24–32 (2000).
26. Berger, A. H., Knudson, A. G. & Pandolfi, P. P. A continuum model for tumour suppression. *Nature.* **476**, 163–169 (2011).
27. Jennes, I., Zuntini, M., Mees, K., Palagani, A., Pedrini, E. & De Cock, G. *et al.* Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene.* **492**, 148–159 (2012).
28. Philippe, C., Porter, D. E., Emerton, M. E., Wells, D. E., Simpson, A. H. & Monaco, A. P. Mutation screening of the EXT1 and EXT2 genes in patients with hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.* **61**, 520–528 (1997).
29. Raskind, W. H., Conrad, E. U., 3rd, Matsushita, M., Wijsman, E. M., Wells, D. E. & Chapman, N. *et al.* Evaluation of locus heterogeneity and EXT1 mutations in 34 families with hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat.* **11**, 231–239 (1998).
30. Seki, H., Kubota, T., Ikegawa, S., Haga, N., Fujioka, F. & Ohzeki, S. *et al.* Mutation frequencies of EXT1 and EXT2 in 43 Japanese families with hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet.* **99**, 59–62 (2001).
31. Heinritz, W., Huffmeier, U., Strenge, S., Mitterski, B., Zweier, C. & Leinung, S. *et al.* New Mutations of EXT1 and EXT2 Genes in German Patients with Multiple Osteochondromas. *Ann Hum Genet.* (2009).
32. Lonie, L., Porter, D. E., Fraser, M., Cole, T., Wise, C. & Yates, L. *et al.* Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Hum Mutat.* **27**, 1160 (2006).

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their enthusiastic participation. The authors are also grateful for the support from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), which is an initiative of the ISCIII. This study was funded in part by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-15707, SAF2011-25431 and PIB2010AR-00473) and from the Generalitat de Catalunya (2009SGR 971). PS was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI).

Author contributions

Study design: R.A., J.An., M.A.V., C.G.A., S.B., D.G. Collection of data and samples: P.S., A.S., L.M., J.Ar., F.T., J.N. Performance of experiments: P.S., R.U., A.D., J.N., P.L. Data interpretation and analysis: P.S., R.A., P.L., S.B., D.G. Draft composition: P.S., R.A., D.G., S.B. All authors reviewed the manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

How to cite this article: Sarrión, P. *et al.* Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in Spanish patients with multiple osteochondromas. *Sci. Rep.* **3**, 1346; DOI:10.1038/srep01346 (2013).

ARTÍCULO 2. Una nueva mutación *nonsense* en el gen *EXT1* en un paciente argentino con Exostosis Múltiple Hereditaria.**RESUMEN**

La Exostosis Múltiple Hereditaria (MHE) es una enfermedad esquelética autosómica dominante caracterizada por tumores óseos benignos recubiertos por cartílago (ostecondromas) con una expresión fenotípica heterogénea que incluye deformidades óseas y una desigual longitud de las extremidades. La complicación más severa es la transformación maligna de los ostecondromas a condrosarcomas, lo que ocurre en un 0,5-5% de los casos. La MHE es genéticamente heterogénea y está causada por defectos en los genes *EXT1/EXT2* que codifican las glucosiltransferasas implicadas en la síntesis del heparán sulfato. Mutaciones en dichos genes dan lugar a la formación de exostosis.

Aquí presentamos los aspectos clínicos, radiológicos y moleculares de una mujer de 31 años de edad, que presenta un fenotipo severo y una transformación maligna de un ostecondroma pélvico, estudiado mediante el análisis de medidas anatómicas, valoración funcional y variables de la calidad de vida. El análisis molecular de los genes *EXT1* y *EXT2* descubrió una mutación nueva en el gen *EXT1*: un cambio en el exón 1 (c.848 T>A), que daba lugar a una mutación *nonsense* (p.L283X).

Este estudio apoya la idea de que la evolución de los condrosarcomas se puede predecir usando datos radiológicos, análisis histológicos y el grado de los síntomas clínicos.

En conclusión, nuestro estudio ha identificado una mutación patogénica nueva en una paciente de MHE argentina con un fenotipo severo y una transformación maligna, como parte del primer programa clínico de investigación español/latinoamericano en exostosis múltiple hereditaria.

REFERENCIA

Delgado MA, Sarrión P, Azar N, Zecchini L, Robledo HH, Segura F, Balcells S, Grinberg D, Dodelson de Kremer R, Asteggiano CG. A novel nonsense mutation of the EXT1 gene in an Argentinian patient with multiple hereditary exostoses: a case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Jun 6;94(11):e76. doi: 10.2106/JBJS.J.01920.

A Novel Nonsense Mutation of the *EXT1* Gene in an Argentinian Patient with Multiple Hereditary Exostoses

A Case Report

María Andrea Delgado, BS, Patricia Sarrión, BS, Nydia Azar, MS, Lorena Zecchini, MD, Hector Hugo Robledo, MD, Florencio Segura, MD, PhD, Susana Balcells, PhD, Daniel Grinberg, PhD, Raquel Dodelson de Kremer, MD, PhD, and Carla Gabriela Asteggiano, PhD

Investigation performed at Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina

Multiple hereditary exostoses (MHE), also known as multiple osteochondromatosis, is an autosomal-dominant O-linked glycosylation disorder recently classified as EXT1/EXT2-CDG in the congenital disorder of glycosylation (CDG) nomenclature¹. MHE is characterized by the presence of multiple cartilage-capped tumors, called “osteochondromas,” which usually develop in the juxta-epiphyseal regions of the long bones. The prevalence of MHE is estimated at 1:50,000 in the general population^{2,3}. The Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database classified it as either 133700 or 133701, according to whether the mutations occurred in the *EXT1* or the *EXT2* gene. These genes are located at 8q24 and 11p11-11p12, respectively, and they encode the copolymerases responsible for heparan sulfate biosynthesis. *EXT1* and *EXT2* are tumor suppressor genes of the EXT gene family. The *EXT1* gene contains eleven exons with a coding region of 2238 base pairs (bp), and the *EXT2* gene contains sixteen exons with a coding region of 2154 bp⁴⁻⁷. These genes encode two glycosyltransferases involved in heparan sulfate biosynthesis, exostosin-1 (*EXT1*) (EC2.4.1.224) and exostosin-2 (*EXT2*) (EC2.4.1.225), whose impairment leads to the formation of exostoses^{5,8-10}. Inactivating mutations (nonsense, frameshift, and splice site mutations) in *EXT1* and *EXT2* genes represent the majority of mutations that cause MHE. An overview of the reported variants is provided by the online Multiple Osteochondroma Mutation Database¹¹.

The most important complication of MHE is the malignant transformation of osteochondroma to chondrosarcoma, which is estimated to occur in 0.5% to 5% of patients⁷. Chondrosarcomas arise de novo (primary) or as a result of a preexisting cartilage lesion (secondary). The biological aggressiveness of chondrosarcomas can be predicted by means

of a histological grading system (grade I to grade III), based on three parameters: cellularity, degree of nuclear atypia, and mitotic activity^{12,13}.

In our case report, we investigated the clinical, radiographic, and genetic aspects of a patient with MHE with a severe phenotype and malignant transformation to chondrosarcoma. The patient was informed that data concerning her case would be submitted for publication, and she provided consent.

Case Report

Our patient, a thirty-two-year-old woman with MHE, was first identified with this disorder when she was twenty-six years old in the Orthopedic and Imaging Diagnosis Department of Children’s Hospital of Córdoba, Argentina. She had developed a malignant transformation of a sessile osteochondroma in the left iliopubic region. She was included in the Argentinian Multiple Osteochondromatosis Program, which consisted of studies that had been approved by the Ethics Committee of the Children’s Hospital of Córdoba (CIEIS) Act No. 95/2007. The phenotypic data were based on clinical examinations and radiographic measurements and were analyzed according to variables representing lesion quality: count, morphology, and location. The quality of lesions was classified as: (a) type-I lesions (the size of the lesions correspond to ≤25% of native bone size); (b) type-II lesions (the size of the lesions correspond to 26% to 49% of native bone size); (c) type-III lesions (the size of the lesions correspond to 50% to 74% of native bone size); and (d) type-IV lesions (the size of the lesions correspond to ≥75% of native bone size)¹⁴. The severity of the disease was assessed with five factors: age of onset, number of exostoses, absence or presence of vertebral location, stature, and functional rating (good

Disclosure: One or more of the authors received payments or services, either directly or indirectly (i.e., via his or her institution), from a third party in support of an aspect of this work. None of the authors, or their institution(s), have had any financial relationship, in the thirty-six months prior to submission of this work, with any entity in the biomedical arena that could be perceived to influence or have the potential to influence what is written in this work. Also, no author has had any other relationships, or has engaged in any other activities, that could be perceived to influence or have the potential to influence what is written in this work. The complete **Disclosures of Potential Conflicts of Interest** submitted by authors are always provided with the online version of the article.

TABLE I Clinical and Radiographic Features*

Variable	Clinical and Radiographic Findings
Lesion quality	
No. of lesions	28 osteochondromas
Morphology	
Type of lesions	Type I ($\leq 25\%$ of native bone size), 100%
	Simple lesions, 96.5% (n = 27)
	Complex lesions, 3.5% (n = 1)
Lesion characteristics	
	Sessile osteochondromas, 86% (n = 24)
	Pedunculated osteochondromas, 14% (n = 4)
Location	
	In pelvis, 17% (n = 5)
	In other bones, 83% (n = 23)
Age at onset (more or less than 3 years old)	>3 years old (12 years old)
Severity of the disease†	
No. of exostoses (more or less than 10 osteochondromas)	>10 osteochondromas (n = 28)
Vertebral location of the exostoses (absence or presence)	Presence (9 mm × 5-mm osteochondroma on the fifth cervical vertebra, lateral)
Stature (more or less than 10th percentile)	<3rd percentile
Functional rating (good or fair)	Fair
Degree of severity	Group S (severe) (IVS) with secondary chondrosarcoma in pelvis

*Clinical classification of osteochondromas based on variables published by Boveé⁶. †Evaluation of severity described in Francanet et al.¹⁴.

or fair). The degree of severity was represented in two groups, M (moderate) or S (severe). Group S was classified into four clinical subgroups according to the increasing grade of severity (type IS, type IIS, type IIIS, and type IVS), especially with regard to the lower percentile¹⁴⁻¹⁶. In our patient, we defined the phenotype as severe (type IVS) based on the fair functional rating, the large number of exostoses (>25) and their vertebral locations, and very short stature (below the third percentile)¹⁵. In addition to the phenotype classification,

clinical and radiographic variables were defined for the patient (Table I).

In our patient, multiple osteochondromas were detected by radiographs. A tibiofibular osteochondroma was observed on the proximal side of the right knee (Fig. 1-A). A large chondrosarcoma was detected on the left iliopubic bone (Fig. 1-B). In addition, there were left and right humeral osteochondromas, Madelung deformities in both radii (Fig. 1-C), and multiple tiny phalangeal osteochondromas. A pelvic magnetic

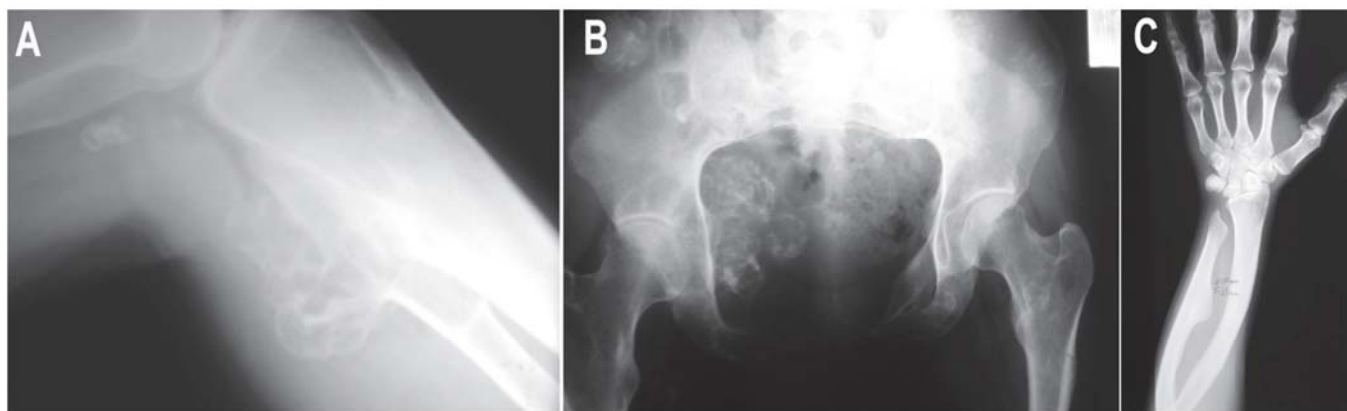


Fig. 1 Radiographs demonstrating multiple osteochondromas at the tibia and fibula: next to the knee (**Fig. 1-A**), at the pelvis and proximal part of the femur (**Fig. 1-B**), and at the radius and ulna (**Fig. 1-C**).

TABLE II Polymerase Chain Reaction Primer Sequences Used for *EXT1* and *EXT2* Genes*

Primers	Reverse	Forward
<i>EXT1</i> gene		
Exon 1.1	5'tgggaaactgggtgattctt 3'	3'gggatcaattggaaaacgaggattc 5'
Exon 1.2	5'ggcttcagtttagggcatcgag 3'	3'tgttccacaagtgagactcttg 5'
Exon 1.3	5'ccagttgtcacctcagatgtgc 3'	3'aacttcacacctggaccaag 5'
Exon 2	5'tgctgaaattcatgcacatgg 3'	3'ggttaacattatcacctctcc 5'
Exon 3	5'tgctgaaattcatgcacatgg 3'	3'ttcactttccaacaaaatctcc 5'
Exon 4	5'ctatatgctagaagccaaatgc 3'	3'gattcctgacttgatatttg 5'
Exon 5	5'tccattactctctctgtcttg 3'	3'gtccatctaacacctgcat 5'
Exon 6	5'cctgtcaggacataagaagc 3'	3'gctcgttacaccttttca 5'
Exon 7	5'tctgccgtttgtctgtctg 3'	3'gcttgtgacctgtgtgat 5'
Exon 8	5'gtgaggatgggagaattgc 3'	3'gttttaatcagcccattcct 5'
Exon 9	5'gaattaatgttccgacacagtc 3'	3'ctgatgtgcaaatgtgtttt 5'
Exon 10	5'catcatcattatcattaccatc 3'	3'ccaaggatgtaaagctctcc 5'
Exon 11	5'ttgctgctgtcatttggc 3'	3'cttagatgagcagaatgacaaa 5'
<i>EXT2</i> gene		
Exon 4.1	5'tgagtgacagagtgaacc 3'	3'caaggtgtatatctatgctctg 5'
Exon 4.2	5'agccgacagtcacctccc 3'	3'cttctgctcttgagttggttt 5'
Exon 5	5'gttgggatttccaggagttgc 3'	3'cctcctgaagatttagaagt 5'
Exon 6	5'ccgagatgctgtataaggc 3'	3'gctgtctaccaagtttctaag 5'
Exon 7	5'tcaagaactgttcccaataag 3'	3'gggtctgtgttctgtgcaa 5'
Exon 8	5'agtattgcttggcgtcaacc 3'	3'gagagtagtacactgtgcta 5'
Exon 9	5'aatggagctgaagagaactc 3'	3'ggttacttctccactagat 5'
Exon 10	5'tggcttgacagcaggagg 3'	3'cctgataaggcagcataatt 5'
Exon 11	5'caccaagcctgcatgtttg 3'	3'catttctgagacagcatgcc 5'
Exon 12	5'accttggattgatgagagc 3'	3'gtgcgtaagagtggtgta 5'
Exon 13	5'tctccagaatccattatgac 3'	3'cacgctcatagtagaaaatag 5'
Exon 14	5'gtcacttgacaaaagcattc 3'	3'ggactagataaacttaagctc 5'
Exon 15	5'cttgtgagttctgcgttgg 3'	3'gaatgctactcactcaattgt 5'
Exon 16	5'acctgtcaaccttttaagaac 3'	3'gttgacctacttgatcttgg 5'

*This table was created based on the methods of Wuys et al.¹⁷

resonance imaging (MRI) study demonstrated an iliac mass in the left iliopubic bone with a heterogeneous signal, with limb and pelvic compromise (Figs. 2-A and 2-B). The tissue had

been resected with indistinct margins three times, but soon recurred. Clinically, the lesion behaved as a chondrosarcoma, and, in all three specimens obtained at the time of surgery, the

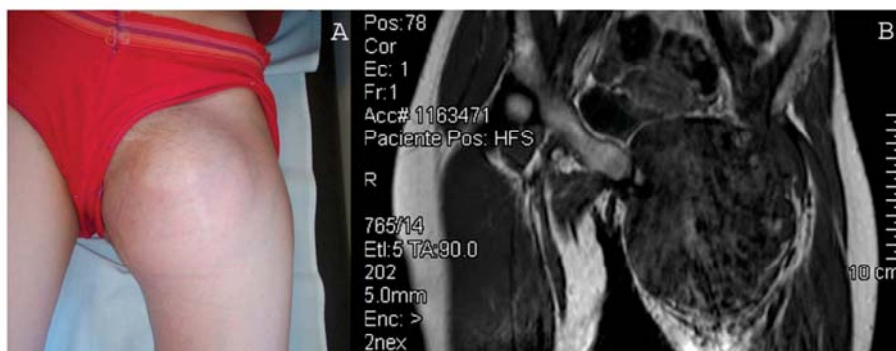


Fig. 2

Figs. 2-A and 2-B Our patient at age thirty-two. **Fig. 2-A** shows a chondrosarcoma in the pelvis and the proximal part of the femur. **Fig. 2-B** The coronal image of the pelvic MRI shows a large iliac mass on the left with a heterogeneous appearance, as well as shell and nodular calcifications growing into the inner pelvis, which produced lower-extremity compromise.

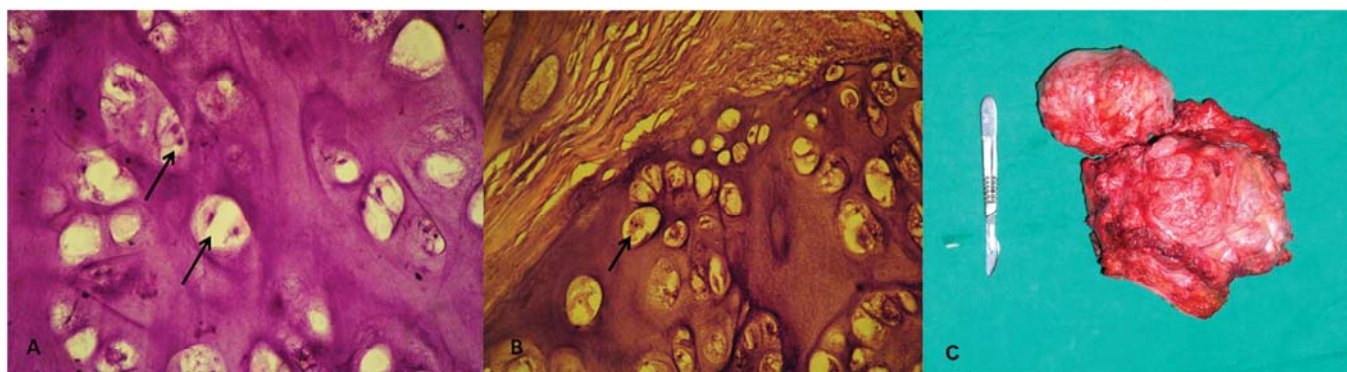


Fig. 3
Figs. 3-A and 3-B Histologic findings (**Fig. 3-A**, hematoxylin and eosin stain, 100× magnification; **Fig. 3-B**, hematoxylin and eosin stain, 40× magnification) of the neoplasm excised from the chondrosarcoma showed a mesenchymal neoplasm with cartilaginous matrix production. The arrows point to nuclear enlargement and occasional binucleation of the atypical chondrocytes. **Fig. 3-C** A photograph of the resected tissue from the first incomplete excision.

histological findings demonstrated a low-grade neoplasia (grade-I chondrosarcoma).

Gross and microscopic evaluation of the pelvic tumor tissue showed a mesenchymal neoplasm with cartilaginous matrix production (Figs. 3-A and 3-B). Infiltration of cartilaginous islands in underlying bone tissue, with a profile of an expansive invasion, was also observed. Tissue that was excised during the first operation is shown in Figure 3-C. The family history revealed that the patient's mother (fifty-three years old) and deceased grandfather both had a similar clinical presentation of MHE but without malignant transformation to chondrosarcoma (Fig. 4-A). The mother had the same clinical and imaging studies as the daughter, and the previously described variables also were analyzed.

We observed the same fair functional rating in the mother as in our patient, but, based on the absence of vertebral locations and her taller stature (below the 10th percentile), the degree of severity was classified as group IIS.

Genetic studies were performed for both our patient and her mother. The DNA taken from the patient's blood and the tumor tissue was studied through direct mutational analysis with use of primer pairs to amplify the coding regions and the flanking intronic sequences of the *EXT1* and *EXT2* genes, modified from the methods of Wuyts et al.¹⁷ (Table II). Polymerase chain reaction products were sequenced on an ABI Prism DNA Analyzer 3700 or 3730 (Applied Biosystems), with use of BigDye Terminator chemistry (Applied Biosystems)¹⁷. Loss of heterozygosity was assessed in the tumor DNA¹⁸.

A novel heterozygous mutation in the genomic DNA of the patient was identified: a substitution in exon 1 of the *EXT1* gene (c.848T>A) changed a leucine codon into a stop codon (p.L283X) in the *EXT1* protein (Fig. 4-B). The patient was also heterozygous for the single nucleotide polymorphism rs11546829 in exon 3 of the *EXT1* gene (Table III). Loss of heterozygosity was not observed in the analysis of DNA in the tumor tissue. The same heterozygous nonsense mutation in exon 1 (c.848T>A; p.L283X) was detected in the patient's mother.

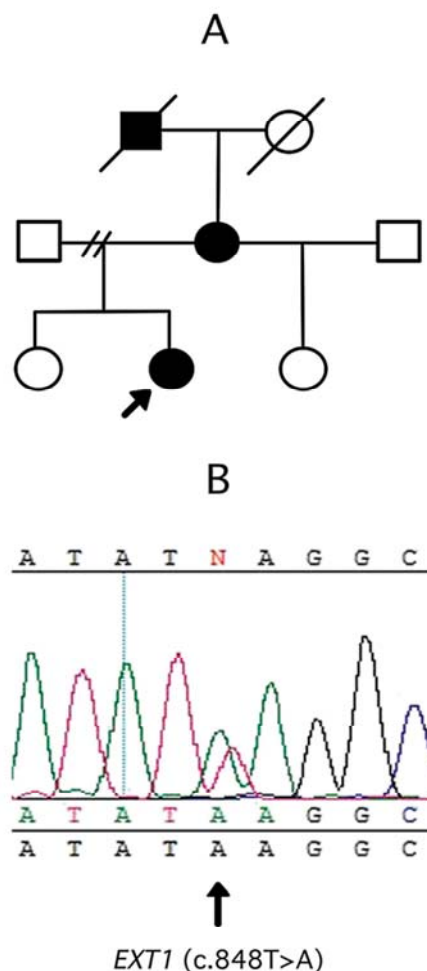


Fig. 4
Figs. 4-A and 4-B Pedigree of the family studied and mutation detection in the *EXT1* gene. **Fig. 4-A** The patient is marked with an arrow, and other affected members are indicated by black squares or circles. **Fig. 4-B** Exon 1 partial sequence of the *EXT1* gene. The arrow indicates the precise mutation in the patient (c.848T>A).

TABLE III *EXT1* Gene Changes Detected in Our Patient by Polymerase Chain Reaction and Direct Sequencing*

Gene	Exon/Intron	DNA Change	Protein Change	Ref SNP_ID†	Patient's Genotype	MAF‡
<i>EXT1</i>	Exon 1	c.848T>A	p.L283X	—	T/A	—
<i>EXT1</i>	Exon 3	c.1035C>T	p.C355C	rs11546829	C/T	0.233
<i>EXT1</i>	Exon 9	c.1761G>A	p.E587E	rs7837891	A/A	0.367

*No changes were found in *EXT2*. †Reference single nucleotide polymorphism. ‡Minor allele frequencies in a CEU population (dbSNP).

Discussion

According to previous reports, the identification of novel and private mutations in a single family or patient support the strong allelic heterogeneity of *EXT1* or *EXT2* genes in patients with MHE¹⁹. To our knowledge, our case represents the first clinical and genetic report in the hereditary multiple osteochondromatosis program in Argentina and other Latin American countries, in collaboration with an interdisciplinary Spanish research group. The patient and her mother presented a heterozygous transversion in exon 1 (c.848T>A), resulting in a nonsense mutation (p.L283X) with loss of function in the amino-terminal region of the protein, which led to a prematurely truncated *EXT1*. The mutated protein only conserves 30.4% of the amino acids compared with the wild-type protein. Most patients with MHE present a wide spectrum of mutations in the *EXT1* gene, most of which are null^{11,15,17,19}.

We observed differences in the grade of severity between the patient and her mother, similar to the intrafamilial variability reported previously in other families with MHE². This finding supports the variation in the expressivity of MHE that is in favor of genetic anticipation in this disease¹⁵.

It has been shown that hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas are associated with a second mutational hit in the *EXT1* gene^{20,21}. In our patient, we did not observe loss of heterozygosity as indicative of a somatic deletion in the DNA of the tumor. This situation rules out a complete deletion of the second *EXT1* allele. A screening with a combined multiplex ligation-dependent probe amplification protocol could be performed to assess the presence of genetic rearrangements affecting other parts of the *EXT1* gene²².

Although a basic molecular defect is known in most patients with MHE (a heterozygous mutation in either *EXT1* or *EXT2*), the pathogenic mechanism is still unclear. Despite the

fact that heparan sulfate proteoglycans have many roles in cell physiology and in different tissues, the loss of their specific function in chondrocytes and their deregulation in bone growth plate seem to be the principal cause of this pathology. ■

María Andrea Delgado, BS
Nydia Azar, MS
Raquel Dodelson de Kremer, MD, PhD
Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Ferroviarios 1250,
CP: X5014AKN Córdoba, Argentina.

Carla Gabriela Asteggiano, PhD
Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),
Universidad Nacional de Córdoba/Cátedra de Química Biológica,
Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba,
Ferroviarios 1250, CP: X5014AKN Córdoba, Argentina.
E-mail address: asteggianocarla@hotmail.com

Patricia Sarrión, BS
Susana Balcells, PhD
Daniel Grinberg, PhD
Departament de Genètica, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645,
CP: 08028 Barcelona, Spain

Lorena Zecchini, MD
Hector Hugo Robledo, MD
Florencio Segura, MD, PhD
Servicio de Traumatología (L.Z. and F.S.),
Servicio de Bioimágenes (H.H.R.),
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Ferroviarios 1250,
CP: X5014AKN Córdoba, Argentina

References

1. Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:825-6.
2. Schmale GA, Conrad EU 3rd, Raskind WH. The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:986-92.
3. Sandell LJ. Multiple hereditary exostosis, EXT genes, and skeletal development. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Jul;91 Suppl 4:58-62.
4. Ahn J, Lüdecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, Wells DE. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet*. 1995;11:137-43.
5. Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, Hecht JT, Lovett M, Evans GA. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet*. 1996;14:25-32.
6. Lüdecke HJ, Ahn J, Lin X, Hill A, Wagner MJ, Schomburg L, Horsthemke B, Wells DE, Lüdecke HJ, Ahn J, Lin X, Hill A, Wagner MJ, Schomburg L, Horsthemke B, Wells DE. *Genomics*. 1997;40:351-4.
7. Bovée JV. Multiple osteochondromas. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:3.
8. McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Mattison K, Esford LE, Dyer AP, Tufaro F. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet*. 1998;19:158-61.
9. Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1998;273:26265-8.
10. Simmons AD, Musy MM, Lopes CS, Hwang LY, Yang YP, Lovett M. A direct interaction between EXT proteins and glycosyltransferases is

defective in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet.* 1999;8:2155-64.

11. Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, Casey B, Bakker B, Sangiorgi L, Wuyts W. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (M0db). *Hum Mutat.* 2009;30:1620-7.

12. Hasegawa T, Seki K, Yang P, Hirose T, Hizawa K, Wada T, Wakabayashi J. Differentiation and proliferative activity in benign and malignant cartilage tumors of bone. *Hum Pathol.* 1995;26:838-45.

13. Kivioja A, Ervasti H, Kinnunen J, Kaitila I, Wolf M, Böhlting T. Chondrosarcoma in a family with multiple hereditary exostoses. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82:261-6.

14. Alvarez C, Tredwell S, De Vera M, Hayden M. The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clin Genet.* 2006;70:122-30.

15. Francannet C, Cohen-Tanugi A, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J, Legeai-Mallet L. Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* 2001;38:430-4.

16. Alvarez CM, De Vera MA, Heslip TR, Casey B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;462:73-9.

17. Wuyts W, Van Hul W, De Boule K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Lüdecke HJ, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, Willems PJ. Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.* 1998;62:346-54.

18. Raskind WH, Conrad EU, Chansky H, Matsushita M. Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. *Am J Hum Genet.* 1995;56:1132-9.

19. Pedrini E, De Luca A, Valente EM, Maini V, Capponcelli S, Mordenti M, Mingarelli R, Sangiorgi L, Dallapiccola B. Novel *EXT1* and *EXT2* mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas. *Hum Mutat.* 2005;26:280.

20. Bovée JV. EXTra hit for mouse osteochondroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1813-4.

21. Hecht JT, Hogue D, Wang Y, Blanton SH, Wagner M, Strong LC, Raskind W, Hansen MF, Wells D. Hereditary multiple exostoses (EXT): mutational studies of familial *EXT1* cases and *EXT*-associated malignancies. *Am J Hum Genet.* 1997;60:80-6.

22. White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B, Breuning MH, den Dunnen JT. Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat.* 2004;24:86-92.

ARTÍCULO 3. Amplio espectro de cambios genómicos en pacientes EXT1/EXT2-CDG latinoamericanos con CDG por EXT1/EXT2 que presentan un fenotipo severo de osteocondromatosis múltiple**RESUMEN**

La osteocondromatosis múltiple (MO, EXT1/EXT2-CDG) es una enfermedad autosómica dominante de O-glucosilación caracterizada por la formación de múltiples tumores recubiertos por cartílago (osteocondromas). Los dos genes responsables de la MO, *EXT1* (8q24) y *EXT2* (11p11-13), son genes supresores de tumores que codifican glucosiltransferasas implicadas en la elongación de la cadena de heparán sulfato. Presentamos el análisis clínico y molecular de 33 pacientes latinoamericanos no relacionados que sufren osteocondromatosis [26 múltiple (MO) y 7 solitarios (SO)]. El objetivo fue analizar el espectro de cambios moleculares y su asociación con el fenotipo. El 83% de los pacientes de MO presentaban un fenotipo severo, incluyendo dos pacientes con transformación maligna a condrosarcoma (11%). Encontramos el alelo mutado en 17 casos de MO y un paciente de SO, que después de un examen más profundo fue diagnosticado con una MO muy leve. Ocho de las trece mutaciones en *EXT1* eran nuevas (p.Leu251*, p.Arg346Thr, p.Lys126Asnfs*62, p.Val78Glyfs*111, p.Lys306*, p.Leu264Pro, p.Gln407* y la delección del exón 1). En relación al gen *EXT2*, encontramos 5 mutaciones, 4 de ellas nuevas (p.Trp394*, p.Asp307Valfs*45, p.Asp539Glnfs*5, y exon6-16del). Como al 31% de los pacientes de MO no se les ha encontrado la mutación causal se ha hipotetizado sobre un putativo tercer locus *EXT3* o lugares reguladores de la transcripción de los genes *EXT1/2*. Mediante *western blot* analizamos la expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 en tejidos de osteocondromas y observamos que los niveles de ambas proteínas estaban reducidos o ausentes independientemente del gen mutado, tanto en pacientes MO como SO en comparación con muestras normales. Este estudio es el primer programa de investigación latinoamericana en CDG causada por EXT1/EXT2.

REFERENCIA

Delgado M.A., Martinez-Domenech G., Sarrión P., Urreizti R., Zecchini L., Robledo H.H., Segura F., Dodelson de Kremer R., Balcells S., Grinberg D., Asteggiano C.G. A broad spectrum of genomic changes in *ext1/ext2*-cdg latin american patients with a severe phenotype of multiple osteochondromatosis. [*Manuscrito en preparación*].

A BROAD SPECTRUM OF GENOMIC CHANGES IN *EXT1/EXT2*-CDG LATIN AMERICAN PATIENTS WITH A SEVERE PHENOTYPE OF MULTIPLE OSTEochondromatosis

Delgado M.A.¹; Martinez-Domenech G.¹, Sarrión P.²; Urreizti R.²; Zecchini L.³,
Robledo H.H.⁴; Segura F.⁵; Dodelson de Kremer R.¹; Balcells S.²; Grinberg D.²; Asteggiano
C.G.^{1,6,7*}

(1) Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina.

(2) Universitat de Barcelona, IBUB, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Departament de Genética, Facultat de Biologia., Barcelona, España.

(3) Servicio de Traumatología, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina.

(4) Servicio de Bioimágenes, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina.

(5) II^{da} Cátedra de Ortopedia y Traumatología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

(6) Cátedra de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba, Argentina

(7) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Grant sponsors: CONICET; FONCyT PICT 2006-2350; FONCyT Contrato de Prestamo BID N° 2437/ OC-AR PICT 2824 and Catholic University of Cordoba Grant 2010/2011. Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-15707, SAF2011-25431 and PIB2010AR-00473) and Generalitat de Catalunya (2009SGR 971).

KEY WORDS: *O*-linked glycosylation - *EXT1/EXT2*-CDG - heparan sulfate proteoglycans–glycosyltransferases - multiple osteochondromatosis.

Abbreviations

O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase (OGT)

Glycosaminoglycans (GAGs)

N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)

N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc)

Glucuronic acid β 1-4 (GlcUA β 1-4)

N-acetylglucosamine α 1-4 (GlcNAc α 1-4)

Glucuronic acid (GlcUA)

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs)

Heparan sulfate (HS)

Fibroblast growth factor (FGF)

Wingless (Wg)

Hedgehog (Hh)

Multiple osteochondromatosis (MO)

Multiple Hereditary Exostoses (MHE)

Congenital Disorder of Glycosylation (CDG)

Exostosin-1 gene (*EXT1*)

Exostosin-2 gene (*EXT2*)

Exostoses (multiple)-like 1 gene (*EXTL1*)

Exostoses (multiple)-like 2 gene (*EXTL2*)

Exostoses (multiple)-like 3 gene (*EXTL3*)

Exostosin 1 protein (Ext1)

Exostosin 2 protein (Ext2)

Loss of Heterocigosity (LOH)

Indian hedgehog (Ihh)

Hedgehog-interacting protein (Hip)

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)

Dysplasia epiphysealis hemimelica (DEH)

Metachondromatosis (MC)

Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

ABSTRACT

Multiple osteochondromatosis (EXT1/EXT2-CDG) is an autosomal dominant *O*-linked glycosylation disorder characterized by the formation of multiple cartilage-capped tumors (osteochondromas). The two genes responsible for MO, *EXT1* (8q24) and *EXT2* (11p11-p13), are tumor suppressor genes that encode glycosyltransferases involved in heparan sulphate chain elongation. We present the clinical and molecular analysis of 33 unrelated Latin American patients suffering osteochondromatosis [26 multiple (MO) and 7 solitary (SO)]. The objectives were to analyze the spectrum of molecular changes and their association with the phenotype. Eighty-three percent of MO patients presented a severe phenotype, including two patients with malignant transformation to chondrosarcoma (11%). We found the mutant allele in 17 MO cases and 1 SO patient, who upon deeper examination was diagnosed as very mild MO. Eight out of thirteen mutations in *EXT1* were novel (p.Leu251*, p.Arg346Thr, p.Lys126Asnfs*62, p.Val78Glyfs*111, p.Lys306*, p.Leu264Pro, p.Gln407* and the deletion of exon 1). Regarding the *EXT2* gene, we found five mutations, four of them novel (p.Trp394*, p.Asp307Valfs*45, p.Asp539Glnfs*5, and exon6-16del). As 31% of the disease causing mutations in MO patients remain unknown it is wise to hypothesize about a putative *EXT3* locus or unknown transcriptional regulatory sites of the *EXT1/2* genes. We analyzed the exostosin1 and exostosin2 protein expression in osteochondroma tissues by Western blot and we observed that both protein levels were reduced or absent independently of the mutated gene, both in MO and SO patients when compared with normal samples. This study represents the first Latin American research program in *EXT1/EXT2*-CDG.

INTRODUCTION

Multiple osteochondromatosis (MO; MIM# 133700, 133701), also known as *EXT1/EXT2*-CDG in the congenital disorder of glycosylation (CDG) nomenclature (Martinez-

Duncker et al. 2012; Jaeken 2010) is a genetically heterogeneous disease. Around 90% of MO patients present mutations in one of the two genes: *EXT1* (MIM 608177), mapped in chromosome 8 (8q24.11-q24.13), or *EXT2* (MIM 608210), mapped in chromosome 11 (11p12-p11). Both are ubiquitously expressed tumor-suppressor genes of the *EXT* gene family, characterized by their homology in the carboxyl-terminal region and the presence of a signal peptide at the amino end region (Busse et al. 2007; Jennes et al. 2009; B. T. Kim et al. 2001). All members of this gene family have been cloned and identified and they encode glycosyltransferases involved in the adhesion and/or polymerization of heparan sulfate chains (HS) at heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (Busse et al. 2007; Kim et al. 2003; Nadanaka & Kitagawa 2008; Wise et al. 1997). In particular, *EXT1* and *EXT2* encode exostosin 1 and 2, respectively, the two subunits of the major polymerase in heparan sulfate synthesis.

HSPGs are ubiquitously expressed at cell surfaces and in extra-cellular matrices. They are composed of a core protein and one or more HS glycosaminoglycan chains (linear polysaccharides formed by alternating N-acetylated or N-sulfated glucosamine units and glucuronic acid) that interact with numerous proteins, including growth factors, morphogens and extracellular matrix proteins (Gallagher and Lyon 1986). Each HS chain binds to a serine unit of a proteoglycan core protein by an *O*-linked-xylosylation (Carlsson et al. 2008; Gallagher and Lyon, 1986; Shi and Zaia, 2009; Zak et al. 2002). In patients lacking exostosin activity, the truncated HS chains of HSPGs disturb specific growth factors binding in chondrocytes, resulting in abnormal signaling and altered endochondral ossification leading to MO (De Andrea et al. 2012).

MO is characterized by the formation of multiple cartilaginous tumors, named osteochondromas that mainly affect the metaphyses of long bones or the surface of flat bones (Alvarez et al. 2007; Bovée 2008; Francannet et al. 2001; Hameetman et al. 2004; Jennes et al. 2009). Complications may involve bone and surrounding tissue deformities, fractures or

mechanical joint problems, vascular compression, arterial thrombosis, aneurysm, pseudoaneurysm formation and venous thrombosis. Pain, acute ischemia, and signs of phlebitis or nerve compression may also occur within the most severe complication, the malignant transformation of osteochondroma to secondary peripheral chondrosarcoma, which is estimated to occur in 0.5-5% of patients (Alvarez et al. 2007; Delgado et al. 2012; Francannet et al. 2001; Kitsoulis et al. 2008). Solitary osteochondroma (SO) is a much more common, non-hereditary condition, with similar clinical findings limited to a single osteochondroma.

In search for MO causative mutations, *EXT1* and *EXT2* have been widely analyzed by different techniques. To date, more than 689 different *EXT1* and 345 *EXT2* mutations have been found worldwide and an update on all reported mutations is deposited at <http://medgen.ua.ac.be/LOVD> (Jennes et al. 2009; Pedrini et al. 2011). While most of the mutations are single nucleotide variants (SNVs) affecting the coding region or splicing signals, intragenic deletions involving single or multiple exons of the *EXT1* or *EXT2* genes have also been detected at a frequency of about 10% (Jennes et al. 2008, Vink et al. 2005 Lonie et al. 2006; Pedrini et al. 2005; White and Sterrenburg 2003; Wuyts et al. 1998). The presence of an additional MO causing gene has been proposed to explain the absence of an *EXT1* or *EXT2* mutation in a small percentage of MO patients (15-30%) (De Andrea and Hogendoorn 2012; Jennes et al. 2009; 2012).

This study represents the first Latin American research program in MO. The aims were to characterize at the molecular level the MO patients; to establish genotype-phenotype correlations, when possible; to assess whether some SO patients were, in fact, mild MO cases; and to characterize available osteochondromas at protein level. A broad spectrum of genomic changes, including novel pathogenic mutations, were identified in *EXT1/EXT2*-CDG patients. Eighteen mutant alleles, all different, were found in the *EXT1* or *EXT2* genes in 26 MO

patients, including two patients with malignant transformation to chondrosarcoma. One SO case was redefined as mild MO and exostosis defects were observed in all five osteochondromas analyzed.

MATERIAL AND METHODS

Patients and samples

Thirty-three patients (18 males and 15 females), from unrelated pedigrees with osteochondromatosis from Chile and Argentina (originally, 26 MO and 7 SO), were included in the mutation analyses. Diagnosis for inclusion was performed on the basis of clinical manifestations and confirmed by physical and/or radiographic examinations at the Orthopedic and Imaging Departments, Children's Hospital of Córdoba, National University of Córdoba, Argentina. DNA and tissue samples from patients and their relatives were obtained together with their informed consent in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2000. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital (CIEIS) Act N° 95/2007. Patient genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes using the Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, Madison, WI). DNA was extracted according to the manufacturer's instructions. DNA samples from peripheral blood leukocytes of 9 healthy subjects were also obtained to be used in the promoter studies. Osteochondromas from 3 MO and 2 SO patients, obtained by surgery and otherwise discarded, were available for DNA and protein analysis. Cartilage samples were also available from 3 healthy subjects, who underwent surgery for any other reason.

Clinical studies and phenotypic data

Clinical variables were analyzed according to a scale established by the Musculoskeletal Tumoral Society with some modifications (Francannet et al., 2001). It includes the evaluation

of all palpable lesions, patient's height and deformities and functional limitations. Lesion quality and the severity of the disease was assessed using different factors: age of onset (before/after 3 years), number of exostoses (more/less than 10 osteochondromas), vertebral location of the exostoses (absence/presence), stature (above/below 10th percentile), and functional rating (good/fair). The degree of severity was classified in two groups: mild (M) and severe (S). Four subcategories were defined in patients with severe phenotype (types IS to IVS) (Alvarez et al., 2006; 2007; Francannet et al., 2001).

Genotyping and mutation analysis

For mutation screening, the 11 *EXT1* and 14 *EXT2* coding exons and their intronic flanking regions were amplified by PCR from genomic DNA. Primer sequences and PCR conditions are described in Sarrión et al. (2013). All fragments, except those corresponding to exon 1 of *EXT1*, could be amplified by PCR simultaneously (Table 1). Exon 1 of *EXT1* and exon 4 of *EXT2* were split into several overlapping fragments, to obtain amplification products that did not exceed 650 bp. PCR was performed in a 50 µl reaction volume, containing ~100 ng of genomic DNA, 1-2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each forward and reverse primer and 0.7 U of GoTaqR Flexi polymerase (Promega, Madison, WI). All PCR programs included an initial denaturation of 4 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at annealing temperature (Ta) and 1 min. at 72°C. Finally, an extension at 72°C was performed for 5 min. Annealing temperature was 60°C for all primer combinations, with the exception of primers for the amplification of overlapping regions of exon 1 of *EXT1*. For these primer combinations, Ta was set at 55°C for ex1.1 and 57° C for ex1.2 and ex1.3. The *EXT1* promoter region (-1285_-851) was also analyzed by sequencing. Primers are available on demand. The PCR reaction was performed as described above with a Ta 55°C. All the PCR products were purified using PCR purification kit (GE Healthcare) and

sequenced with BigDye 3.1 (Applied Biosystems; life technologies). The sequences were analyzed with an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems life technologies).

The presence of all the mutations detected was confirmed by digestion with the appropriate restriction enzyme. Novel mutations were confirmed by analyzing 50 control samples. The mutations were given the official HGVS nomenclature (www.hgvs.org). As reference sequences, NM_000127 for *EXT1* and NM_000401 for *EXT2* were used.

MLPA

EXT1 and *EXT2* exon copy number in the patients' genomic DNA was analyzed by the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique designed by MRC-Holland, using the commercial kit #P215-B1 and following the manufacturer's instructions. PCR products were run on an ABI 3730 DNA Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Peaks were analyzed with Coffalyser v9.4 software (MRC-Holland *Vs 05; 30-08-2007*). The proportion of each peak relative to the height of all peaks was calculated for each sample and then compared to proportions for the corresponding peak averaged for a set of at least ten normal DNA samples. Ratios of 1 were treated as normal copy number. Ratios below 0.6 were considered as deletions. Each positive result was confirmed in a second independent MLPA reaction.

Assessment of functionality of missense mutations

In order to assess the possible pathogenic effect of the new missense mutations, the changes were analyzed by the bioinformatic tool PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Western blot for exostosin 1 and exostosin 2 protein detection

The cartilage samples were processed mechanically with a PRO 200 PKG3 homogenizer in a radio immune-precipitation assay (RIPA) lysis buffer, with protease inhibitors. The lysates were centrifuged at 2500 rpm for 10 min, and the supernatants obtained were spun down at 13000 rpm for 20 minutes. Total protein present in the soluble supernatants was quantified by the Lowry method and 20 µg protein were resolved by SDS-PAGE (acrilamide 10%), transferred onto Polyvinylidene Difluoride (PVDF) membranes and immunoblotted by standard immunostaining using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and chemiluminescence detection (ECL) (Bernard et al., 2001; Trebicz-Geffen et al., 2008). Rabbit primary polyclonal antibodies raised against full-length human EXT1 and EXT2 proteins (H00002131-D01P and H00002132-D01P Abnova) were used at 1:500 dilution and the anti-rabbit secondary antibody at 1:2500 dilution (Bernard et al., 2001; Trebicz-Geffen et al., 2008). Quantification analyses of EXT1 and EXT2 protein expression were performed using Image J Software (NIH).

RESULTS

Phenotypic characterization

We recruited a cohort of 33 Latin American ostochondromatosis patients, ranging from 3 to 55 years at diagnosis, including 26 MO and 7 SO cases. Orthopedic deformities of forearm, shortening of limbs, ankle, varus or valgus of knee, brachymetacarpus, scoliosis, synostosis, arthritis, vessel or nerve compression were observed as common manifestations in MO. The lesions were located in the femur (58%), tibia (45%), humerus (45%), fibula (39%), radius (33%) and pelvis (20%), a frequent localization of malignant transformation to chondrosarcoma (patients P06 and P38) (Table 1). The grade of severity was determined according to the clinical variables described in material and methods (Francannet et al. 2001). Phenotypic data were available for 69% (18 out of 26) of the MO patients and the most

relevant characteristics are summarized in Table 1. A severe phenotype ranging from grade IS to IVS was observed in most of the MO patients. Seventy-seven percent of them presented age of onset below 5 years and 50% (13 out of 26) manifested a familiar inheritance (Table 1). Two patients (P06, a 32 year-old female reported by Delgado et al. (2012) and P38, a 42 year-old male with a type IIS severe phenotype) developed a malignant chondrosarcoma. This gives a frequency of malignant transformation of 11%, (2 of 18 MO) considering only patients with clinical data, or 8% (2 of 26), considering all MO cases. Both patients presented a large chondrosarcoma on the pelvis that led to a severe vascular compression (Table 1).

Gene sequence and dose analyses of *EXT1* and *EXT2* exons

Exons and flanking regions of *EXT1* and *EXT2* were sequenced from the genomic DNA of the 33 patients. Negative cases were subsequently analyzed by MLPA of all *EXT1* and *EXT2* exons. The mutant allele was found in 17 of 26 (65%) MO patients and in one of the SO cases. This case was re-analyzed and found to be a mild MO case. We identified 18 pathogenic mutations (5 nonsense, 6 frame-shift, 3 missense, 1 splice site mutation and 3 large deletions identified by MLPA), 13 of them in *EXT1* and 5 in *EXT2*, which are listed in Table 2. Seven of the *EXT1* mutations were novel (p.Leu251*, p.Arg346Thr, p.Lys126Asnfs*62, p.Val78Glyfs*111, p.Lys306*, p.Leu264Pro, p.Gln407*) as were four of the *EXT2* mutant alleles (p.Trp394*, p.Asp307Valfs*45, p.Asp539Glnfs*5 and a deletion of exon 6 to 16). Bioinformatic predictions for *EXT1* missense mutations suggested a pathogenic role for them [PolyPhen, probably_damaging (0.986, 0.997 and 1)]. All mutations were included at the international multiple osteochondroma mutation database (<http://medgen.ua.ac.be>).

Analysis of the *EXT1* promoter

The *EXT1* sequence corresponding to the core promoter region was reported to map at approximately 917 bp upstream of the *EXT1* start codon, within a 123 bp region (Jennes et al. 2012). We sequenced 435 bp, including this 123-bp region in the 33 patient and 9 control samples, and no mutation was detected. For the two previously reported SNPs within this region (rs7001641 and rs34016643) (Jennes et al. 2012), we only detected that four patients were heterozygous carriers for the C-allele of rs34016643 (P18, P21, P34 and P41), as was also one of the control individuals. The MAF was thus 0.06, both in patients and controls. For three of these four patients, no pathogenic mutation in *EXT1* or *EXT2* was identified. Only patient P41, who carried the C-allele of the rs34016643 SNP, bore a nonsense mutation (c.1219C>T, p.Gln407*) in exon 4 of the *EXT1* gene (Table 1).

After coding sequence, MLPA, and promoter analyses, fifteen cases remained with no mutation identified. Nine of them were MO patients and six were SO. Most of these patients did not have a positive family history of osteochondromatosis and in the case of P39, this information was not available (Table 1).

DNA analysis of cartilage tissue from some available osteochondromas

Loss of heterozygosity (LOH) was analyzed by PCR and MLPA in available cartilage samples, obtained from five patients who underwent surgeries (P02, P06, P07, P26 and P31). No LOH was detected in any of these tissues (listed in figure 1).

Protein analysis of exostosin 1 and 2 of cartilage tissue from some available osteochondromas

We analyzed exostosin 1 (EXT1) and exostosin 2 (EXT2) protein expression in osteochondroma samples from 5 patients (3 MO: P02, P06 and P26; and two SO: P07 and P31) and in cartilage samples from 3 control subjects. Both EXT1 and EXT2 proteins were

expressed in tissues from controls as shown by the corresponding 74-kDa and 73-kDa bands (Figures 1A and B). Reduced or null expression of at least one protein was observed in all patients' samples. Patients P26 and P31, were positive for EXT1 and negative for EXT2, while patients P02 and P07 showed an opposite expression pattern, although EXT2 levels were clearly reduced. Patient 06 was negative for both proteins.

DISCUSSION

This work represents the first clinical, biochemical and molecular research for the study of multiple hereditary osteochondromatosis (EXT1/EXT2-CDG) in Latin American patients. Analyzing the genomic DNA of thirty-three unrelated patients, the mutant allele was detected in the *EXT1* or *EXT2* gene in 65% of the MO patients and in one of the 7 SO cases who, upon careful reexamination, was diagnosed as MO with very mild symptoms. Taken together, 18 different mutations were identified in 27 MO patients and none in 6 SO patients. No mutation was found in the promoter sequences of any of the patients. All five available osteochondromas showed a deficiency of either exostosin 1 or exostosin 2 or both.

Recent studies reported that *EXT1* is responsible for ~65-75% of the MO patients (Pedrini et al. 2011). In agreement with this observed that *EXT1* mutations (72%) were more common than *EXT2* mutations (28%) in our series. Rearrangements detected by MLPA analysis accounted for 17% of the mutant alleles, a frequency similar to that found in Spanish patients by Sarrion et al. (2013), and somewhat higher than those reported by others.

Seven of the 13 *EXT1* mutations (p.Leu251*, p.Arg346Thr, p.Lys126Asnfs*62, p.Val78Glyfs*111, p.Lys306*, p.Leu264Pro, p.Gln407*) and 4 of the 5 *EXT2* mutant alleles (p.Trp394*, p.Asp307Valfs*45, p.Asp539Glnfs*5, and ex6-16del) were novel. Although some mutation hotspots were reported (Jennes et al 2009)

(<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>), we did not observe *EXT1* or *EXT2* recurrent mutations in the patients of this study. However, we detected two mutations in *EXT1* gene that were reported many times before. The missense mutation c.1018C>T (p.Arg340Cys) observed in P40, was reported 22 times and the exon 6 deletion c.1469delT (p.Leu490Argfs*9), found in P02, 37 times. These mutations were shown to cause the impairment of heparan sulfate synthesis [McCormick et al. 1998; Jennes et al. 2009].

We did not look for mutations either in the 5' and 3' UTRs or in deep intronic regions. However, the promoter region was genotyped and no mutation was detected. A recent study described a regulatory role for the G/C SNP (rs3401643) located at position -1158 bp, within a USF1 transcription factor binding site (Jennes et al. 2012). The authors observed that the presence of the C-allele resulted in a ~56% increase in *EXT1* promoter activity. The possible effect of this allele in the four patients of the present study, who are heterozygous for it, will require further studies.

We had 9 MO patients for who remained undiagnosed at the molecular level. Transcriptional regulation may be a contribution factor to help explain the high number of patients without molecular definition of the disease and methylation of cytosine residues in promoter regions is a known mechanism leading to transcriptional gene repression in tumor suppressor genes. Nevertheless, in osteochondromas or in chondrosarcomes it seems not to be the case (Ropero et al., 2004, Hameetman et al 2007). A putative *EXT3* gene, located in the short arm of chromosome 19 has been proposed to explain the absence of an *EXT1* or *EXT2* mutation in a small percentage of MO patients (30 – 15 %). Nevertheless, the existence of this third locus is not clear so far (Ahn et al., 1995; Wuyts et al., 1996). A possible additional explanation for this apparent lack of mutation is the presence of mosaicism as reported by Szuhai et al. (2011) and Sarrion et al. (2013). This mosaicism could be responsible for a non-detection of the mutation in lymphocyte DNA.

We could analyze the tissue expression of exostosin 1 and 2 in five patients (Figure 1). Scanning densitometry of Western blots showed that EXT1 and EXT2 protein levels tended to be null or lower in patients compared with control samples and they did not correlate with the affected gene, the degree of severity or the clinical presentation (MO or SO). In two patients (P02 and P06) carrying an *EXT1* mutation, we could not detect the EXT1 protein according to the nonsense or frameshift mutations in these patients, but it could not explain the loss of ext2 protein observed. These findings suggest that *EXT1* mutations probably interfere with the function of exostosin's complexes in Golgi, probably inactivating holoenzyme activity, degrading the whole protein, or interfering in some other function in the Golgi (Bernard et al., 2001).

Several studies have suggested that MO patients present a more severe phenotype when they bear *EXT1* mutations compared to *EXT2* mutations (C. M. Alvarez et al., 2007; C. Alvarez et al., 2006; Francannet et al., 2001), while other studies could not confirm this observation (Jennes et al., 2008; Signori et al., 2007). Recently Pedrini et al., (2012) performed a genotype-phenotype correlation study in two large cohorts of more than 500 MO patients, in which they found that *EXT1* mutations conferred an OR of 6.8 for a severe phenotype, according to a new clinical classification system defined by them. In our cohort, we classified the phenotype of the patients according to Francannet et al. (2001). We assigned a severe phenotype in 83% of MO patients (7% type IS, 53% type IIS, 13% type IIIS and 27% type IVS) and the remaining 17 % were classified as moderate (Figure 2). Although our patients with *EXT2* gene mutation showed a smaller number of affected bones (data not shown), which is in accordance with a recent study (Stancheva-Ivanova et al., 2011), all of them were classified as severe (Figure 2). Thus, we cannot evidence differences between the grade of severity in the phenotype in patients with *EXT1* or *EXT2* mutations.

We observed that the grade of severity differed between the proband and other affected members in the family, in agreement with the intra-familial variability reported previously (Hennekam, 1991). No family history for MO was reported in 42% of MO patients. The skeletal deformations most observed in our patients were shortening of limbs, varus, valgo, brachymetacarpus, scoliosis, shortened stature and synostosis. In one *EXT2* patient (P01) with a nonsense mutation (c.1182G>A; p.Trp393X), high severity in the phenotype was observed due to vertebral localization of osteochondromas. In summary, (Figure 2).

Two patients suffer a malignant transformation to chondrosarcoma (~10%). This is the most important complication in MO, estimated to occur in 0.5-5% of patients (Bové, 2008). Due to there is no etiological treatments, the individuals have at least one or multiple operative procedures (Bové, 2008). Eight of our patients had undergone surgical excision of one or more osteochondroma. In adults, an indication for excision is suggested only by malignant transformation (Clement, Ng, & Porter, 2011).

It has been shown that hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas are associated with a second mutational hit in *EXTs* genes (Bové, 2010; Hecht et al., 1997). In these sense, we analyzed DNA from resected osteochondroma tissue in P6. We did not observe a somatic mutation by PCR or MPLA in both genes. This could contribute to rules out a complete deletion or the presence of genetic rearrangements as the second mutational *EXT1* hit in this patient with a malignant transformation in a pelvis osteochondroma.

Regarding the two patients with malignant chondrosarcoma, patient P06 bore the pathogenic mutation c.848T>A (p.Leu283*) in the first exon of the *EXT1* gene (Delgado et al. 2012), while in P38 no mutation was detected, neither in *EXT1* nor *EXT2* (Table 1).

In conclusion, despite several reports estimated the prevalence of MO at 1:50,000 in the western population, the epidemiological data available at present allow no conclusion regarding the genotypes in any region of the world (Hennekam, 1991). The phenotype

prevailing in Latin America countries emphasizes the complexity of the disease in a broad and ethnically heterogeneous region. In summary, we have found the molecular bases in 83% of MO patients and the patients without the specific mutation detected were included in a group whereas more questions concerning the pathogenesis of the disease are hypothesized. The most important topic is how the disruption of a ubiquitously expressed gene causes this cartilage-specific disease and according to the clinical manifestation, the query is how the clinical intra-familial variation can be explained. It led us to investigate into new interesting candidates for mutation screening. This could be the putative *EXT3* locus or novel genes related to this pathology, in this sense the new exome sequencing studies will soon become a diagnostic tool for this identification.

REFERENCES

- Ahn, J., Lindow, S., Horton, W. A. W., Lüdecke, H. J., Lee, B., Wagner, M. J., Horsthemke, B., et al. (1995). Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nature genetics*, *11*(2), 137- 143. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.nature.com/ng/journal/v11/n2/abs/ng1095-137.html>
- Alvarez, C. M., De Vera, M. a, Heslip, T. R., & Casey, B. (2007). Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clinical orthopaedics and related research*, *462*(462), 73-9. doi:10.1097/BLO.0b013e3181334b51
- Alvarez, C., Tredwell, S., De Vera, M., & Hayden, M. (2006). The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clinical genetics*, *70*(2), 122-30. doi:10.1111/j.1399-0004.2006.00653.x
- Bernard, M. a, Hall, C. E., Hogue, D. a, Cole, W. G., Scott, a, Snuggs, M. B., Clines, G. a, et al. (2001). Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins EXT1 and EXT2 in exostosis chondrocytes. *Cell motility and the cytoskeleton*, *48*(2), 149-62. doi:10.1002/1097-0169(200102)48:2<149::AID-CM1005>3.0.CO;2-3
- Bovée, J. V. M. G. (2008). Multiple osteochondromas. *Orphanet journal of rare diseases*, *3*, 3. doi:10.1186/1750-1172-3-3
- Bovée, J. V. M. G. (2010). EXTra hit for mouse osteochondroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 1813-4. doi:10.1073/pnas.0914431107
- Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilén, M., Grønning, M., Kjellén, L., & Kusche-Gullberg, M. (2007). Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *The Journal of biological chemistry*, *282*(45), 32802-10. doi:10.1074/jbc.M703560200
- Carlsson, P., Presto, J., Spillmann, D., Lindahl, U., & Kjellén, L. (2008). Heparin/heparan sulfate biosynthesis: processive formation of N-sulfated domains. *The Journal of biological chemistry*, *283*(29), 20008-14. doi:10.1074/jbc.M801652200
- Clement, N. D., Ng, C. E., & Porter, D. E. (2011). Shoulder exostoses in hereditary multiple exostoses: probability of surgery and malignant change. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et al.]*, *20*(2), 290-4. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jse.2010.07.020
- De Andrea, C. E. D., & Hogendoorn, P. C. W. (2012). Epiphyseal growth plate and secondary peripheral chondrosarcoma : the neighbours matter, (Figure 1), 219-228. doi:10.1002/path.3003
- Delgado, A., Sarri, P., Segura, F., Balcels, S., Grinberg, D., & Kremer, R. D. D. (2012). A Novel Nonsense Mutation of the EXT1 Gene in an Argentinian Patient with Multiple Hereditary Exostoses, *76*(1), 1-6.

- Francannet, C., Merrer, M. L., Munnich, A., & Bonaventure, J. (2001). Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *Journal of medical genetics*, *38*, 430 - 434. doi:10.1136/jmg.38.7.430
- Gallagher, J., & Lyon, M. (1986). Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochemical Journal*, *236*, 313-325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1146843/>
- Hameetman, L., Bovée, J. V., Taminiau, A. H., Kroon, H. M., & Hogendoorn, P. C. (2004). Multiple osteochondromas: clinicopathological and genetic spectrum and suggestions for clinical management. *Hereditary cancer in clinical practice*, *2*(4), 161-73. doi:10.1186/1897-4287-2-4-161
- Hameetman, L., Szuhai, K., Yavas, A., Knijnenburg, J., Duin, M. V., Dekken, H. V., Taminiau, A. H. M., et al. (2007). The Role of EXT1 in Nonhereditary Osteochondroma : Identification of Homozygous Deletions, *99*(5). doi:10.1093/jnci/djk067
- Hecht, J. T., Hogue, D., Wang, Y., Blanton, S. H., Wagner, M., Strong, L. C., Raskind, W., et al. (1997). Hereditary multiple exostoses (EXT): mutational studies of familial EXT1 cases and EXT-associated malignancies. *American journal of human genetics*, *60*(1), 80-6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1712567&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Hennekam, R. C. M. (1991). Hereditary multiple. *Radiography*, 262-266.
- I Martinez-Duncker, Asteggiano, C., & Freeze, H. H. (2012). Congenital Disorders of Glycosylation, 59-81.
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1214*, 190-198. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05840.x
- Jennes, I., Entius, M. M., Van Hul, E., Parra, A., Sangiorgi, L., & Wuyts, W. (2008). Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteoc. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, *10*(1), 85-92. doi:10.2353/jmoldx.2008.070086
- Jennes, I., Pedrini, E., Zuntini, M., Mordenti, M., Balkassmi, S., Asteggiano, C. G., Casey, B., et al. (2009). Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MObd). *Human mutation*, *30*(12), 1620-7. doi:10.1002/humu.21123
- Jennes, I., Zuntini, M., Mees, K., Palagani, A., Pedrini, E., De Cock, G., Fransen, E., et al. (2012). Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene*, *492*(1), 148-59. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.gene.2011.10.034

- Kim, B. T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., & Sugahara, K. (2001). Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7176-81. doi:10.1073/pnas.131188498
- Kim, B.-T. B. T., Kitagawa, H., Tanaka, J., Tamura, J.-ichi, & Sugahara, K. (2003). In vitro heparan sulfate polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41618-23. ASBMB. doi:10.1074/jbc.M304831200
- Kitsoulis, P., Galani, V., Stefanaki, K., Paraskevas, G., Karatzias, G., Agnantis, N. J., & Bai, M. (2008). Osteochondromas: review of the clinical, radiological and pathological features. *In vivo (Athens, Greece)*, 22(5), 633-46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853760>
- Lonie, L., Porter, D. E., Fraser, M., Cole, T., Wise, C., Yates, L., Wakeling, E., et al. (2006). Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Human mutation*, 27(11), 1160. doi:10.1002/humu.9467
- Nadanaka, S., & Kitagawa, H. (2008). Heparan sulphate biosynthesis and disease. *Journal of biochemistry*, 144(1), 7-14. doi:10.1093/jb/mvn040
- Pedrini, E. (2011). Genotype-Phenotype Correlation Study in 529, 2294-2302.
- Pedrini, E., De Luca, A., Valente, E. M., Maini, V., Capponcelli, S., Mordenti, M., Mingarelli, R., et al. (2005). Novel EXT1 and EXT2 mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas. *Human mutation*, 26(3), 280. doi:10.1002/humu.9359
- Ropero, S., Setien, F., Espada, J., Fraga, M. F., Herranz, M., Asp, J., Benassi, M. S., et al. (2004). Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Human molecular genetics*, 13(22), 2753-65. doi:10.1093/hmg/ddh298
- Shi, X., & Zaia, J. (2009). Organ-specific heparan sulfate structural phenotypes. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), 11806-14. doi:10.1074/jbc.M809637200
- Signori, E., Massi, E., Matera, M. G. M. G., Poscente, M., Gravina, C., Falcone, G., Rosa, M. A. M. A., et al. (2007). A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 46(5), 470-477. Wiley Online Library. doi:10.1002/gcc
- Stancheva-Ivanova, M. K., Wuyts, W., van Hul, E., Radeva, B. I., Vazharova, R. V., Sokolov, T. P., Vladimirov, B. Y., et al. (2011). Clinical and molecular studies of EXT1/EXT2 in Bulgaria. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), 917-21. doi:10.1007/s10545-011-9314-8
- Szuhai, K., Jennes, I., de Jong, D., Bovee, J.V., Wiweger, M., Hogendoorn PC. (2011). Tiling resolution array-CGH shows that somatic mosaic deletion of the EXT gene is causative

- in EXT gene mutation negative multiple osteochondromas patients. *Human Mutation* 32, e2036-49.
- Trebicz-Geffen, M., Robinson, D., Evron, Z., Glaser, T., Fridkin, M., Kollander, Y., Vlodayky, I., et al. (2008). The molecular and cellular basis of exostosis formation in hereditary multiple exostoses. *International journal of experimental pathology*, 89(5), 321-31. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00589.x
- Vink, G. R., White, S. J., Gabelic, S., Hogendoorn, P. C. W., Breuning, M. H., & Bakker, E. (2005). Mutation screening of EXT1 and EXT2 by direct sequence analysis and MLPA in patients with multiple osteochondromas: splice site mutations and exonic deletions account for more than half of the mutations. *European journal of human genetics : EJHG*, 13(4), 470-4. doi:10.1038/sj.ejhg.5201343
- White, S., & Sterrenburg, E. (2003). An alternative to FISH: detecting deletion and duplication carriers within 24 hours. *Journal of medical*, 15-18. Retrieved from <http://jmg.highwire.org/content/40/10/e113.extract>
- Wise, C. a, Clines, G. a, Massa, H., Trask, B. J., & Lovett, M. (1997). Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Research*, 7(1), 10-16. doi:10.1101/gr.7.1.10
- Wuyts, W., Van Hul, W., De Boule, K., Hendrickx, J., Bakker, E., Vanhoenacker, F., Mollica, F., et al. (1998). Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *American journal of human genetics*, 62(2), 346-54. doi:10.1086/301726
- Wuyts, W., Van Hul, W., Wauters, J., Nemtsova, M., Reyniers, E., Van Hul, E. V., De Boule, K., et al. (1996). Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Human molecular genetics*, 5(10), 1547-57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894688>
- Zak, B. M., Crawford, B. E., & Esko, J. D. (2002). Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochimica et biophysica acta*, 1573(3), 346-55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417417>

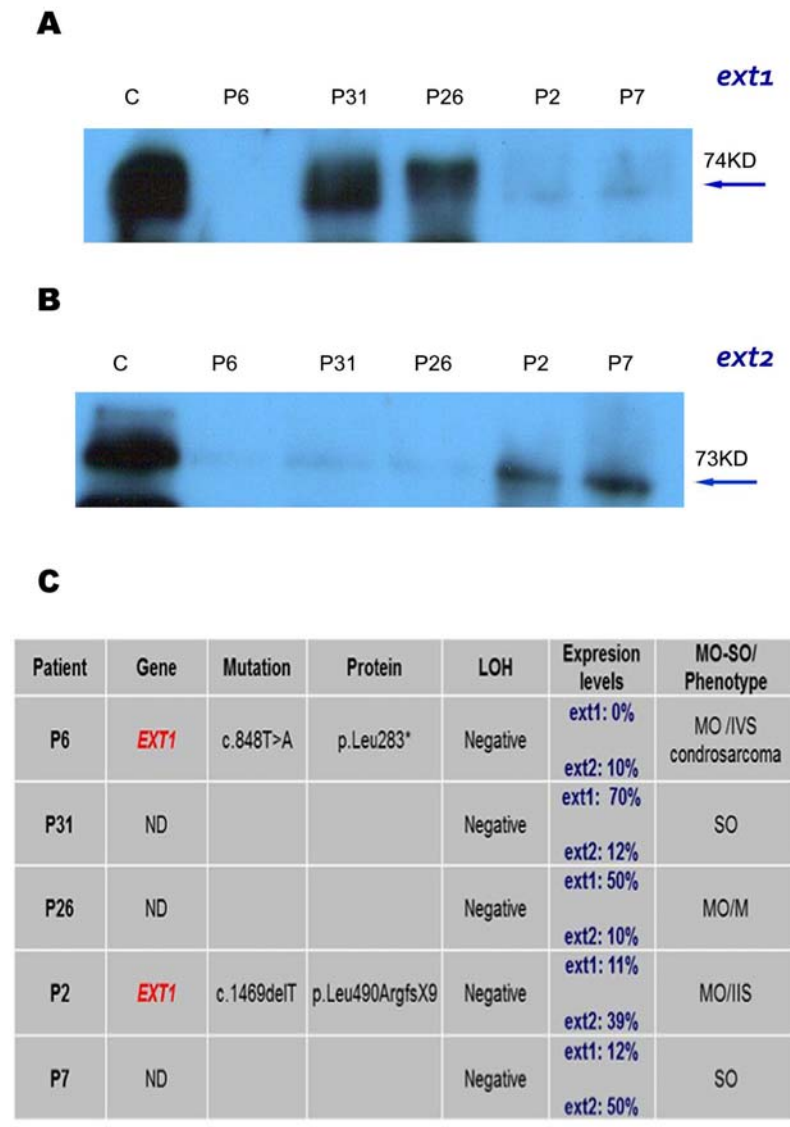


Figure 1: Analyses of *ext1* and *ext2* protein expression in osteochondroma tissues. Protein levels were measured in cartilage from excised tissues in MO (P6, P26 and P2), solitary exostosis (P31 and P7) and normal subjects (c). The tissues were homogenized mechanically, lysed, centrifuged twice and 20 ug total protein was analysed by SDS-PAGE followed by Western blot immunodetection with anti-*ext1* and anti *ext-2* respectively. **(A)** We observed a specific band that migrated at 74 kDa for *ext1* and **(B)** at 73 kDa for *ext2* protein. **(C)** Table shows *EXT1* germline mutations in MO (P06 and P02) with different grade of severity in the phenotype. (ND) Patients without mutations detected in *EXT1* or *EXT2* genes are P26, P31 and P7. LOH was studied by sequence and MLPA. Densitometric analysis performed by Image J software of the detected bands showed decrease or null expressions of both proteins in patients.

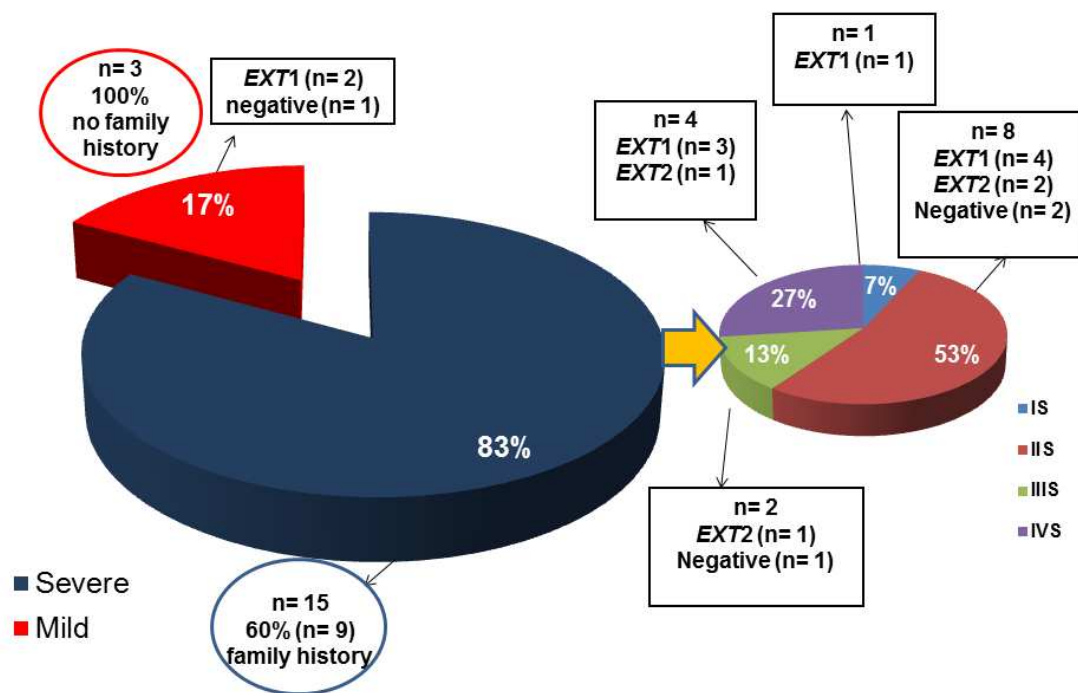


Figure 2: Genotype- phenotype correlations in 33 patients studied. Proportion of Severe phenotype (blue), and mild (red), with the different spectrum of severe phenotype (IS light blue, IIS light red, IIIS green, and IVS violet). Distribution of *EXT1* and *EXT2* mutations and patients without mutations identified, according to the grade of severity in the phenotype.

Table 1: Overview of *EXT1* and *EXT2* mutations and the phenotype found in this cohort

Patient	Sex	Gene	DNA	Deduced protein change	<i>EXT1</i> /SNP rs34016643	MLPA	Family History	Phenotype	Age of onset	Other clinical features
P01	male	<i>EXT2</i>	c.1182G>A	p.Trp394*	wt	NA	No	MO/IIIS	1,5 y-o	Vertebral location
P02	fem	<i>EXT1</i>	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	wt	NA	No	MO/IIIS	5 y-o	Surgery/Sinostoses
P03	fem	ND	wt	Normal	No	SO	5 y-o	Exostoses in humerus
P04	male	<i>EXT2</i>	ex 8 del	Unknown	wt	<i>Abnormal</i>	No	MO/IIIS	5 m	Shortening of limbs
P05	male	<i>EXT1</i>	c.752delT	p.Leu251*	wt	NA	Yes	MO/IVS	4 y-o	Surgery/Axis deviations (cubito and radious)
P06 ¹	fem	<i>EXT1</i>	c.848T>A	p.Leu283*	wt	Normal	Yes	MO/IVS	12 y-o	Chondrosarcoma Surgery
P07	fem	ND	wt	Normal	No	SO	6 y-o	Surgery
P08	fem	<i>EXT1</i>	c.1037G>C	p.Arg346Thr	wt	NA	No	MO/IIIS	3 y-o	Scoliosis
P12	male	<i>EXT2</i>	ex6-16del	Unknown	wt	<i>Abnormal</i>	Yes	MO/IVS	2m	Surgery/Scapular and ribs location. Abnormal karyotype (18q deletion)
P13	male	<i>EXT2</i>	c.920_929del10ins10	p.Asp307Valfs*45	wt	NA	Yes	MO/IIIS	2 m	Scapular osteochondromas
P14	fem	<i>EXT1</i>	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	wt	Normal	Yes	MO/IS	1 y-o	Deformity of the heel
P15	male	<i>EXT1</i>	c.232insG	p.Val78Glyfs*111	wt	NA	No	MOM	8 y-o	Decreased bone density
P16	male	<i>EXT1</i>	c.916A>T	p.Lys306*	wt	NA	No	MOM	4 y-o	Restricted joint motion
P17	male	<i>EXT1</i>	c.791T>C	p.Leu264Pro	wt	NA	Yes	MO/IIIS	1 m	Ribs location
P18	male	ND	G/C	Normal	No	SO	14 y-o	NA
P19	male	ND	wt	Normal	Yes	MONA	8 y-o	Ribs location
P21	male	ND	G/C	Normal	No	MONA	9 y-o	Surgery
P24	male	ND	wt	Normal	No	MO/IIIS	2 y-o	Surgery/Shortening and deformities of limbs
P25	fem	ND	wt	Normal	Yes	MO/IIIS	5 y-o	Vertebral location
P26	fem	ND	wt	Normal	No	MOM	11 y-o	Surgery/Scoliosis
P27	fem	<i>EXT2</i>	c.1616_1623del8ins10	p.Asp539Glnfs*5	wt	Normal	No	MONA	2 m	Deformity of the hip
P28	male	ND	wt	Normal	Yes	MONA	10 m	Valgus
P29	fem	<i>EXT1</i>	c.1722+1G>A	p.Gln574*	wt	Normal	No	MO/IVS	1 m	Scoliosis
P30	fem	ND	wt	Normal	No	SO	4 y-o	Restricted Joint motion

P31	male	ND	wt	Normal	No	SO	8 y-o	Surgery/Bilateral valgus
P32	fem	ND	wt	Normal	No	SO	9 y-o	NA
P34	fem	ND	G/C	Normal	SI	MONA	3 y-o	Bilateral valgus
P36	fem	EXT1	ex 1del	Unknown	wt	<i>Abnormal</i>	No	SO-MO*	10 y-o	NA
P37	male	EXT1	c.248_249insA	p.Gln84Alafs*105	wt	NA	No	MONA	5 m	Distrophy in ribs
P38 ¹	male	ND	wt	Normal	Yes	MO/IS	10 y-o	Chondrosarcoma Severe vascular compression/ phlebitis
P39	fem	ND	wt	Normal	NA	MONA	12 y-o	Deformity of ankles
P40	male	EXT1	c.1018C>T	p.Arg340Cys	wt	NA	Yes	MO/IS	2 m	Scapular osteochondromas
P41	male	EXT1	c.1219C>T	p.Gln407*	G/C	NA	Yes	MONA	1 y-o	Scapular Osteochondromas

Novel mutations are indicated in bold.

¹Patient with malignant transformations to chondrosarcoma.

(ND) No mutation detected by sequencing and MLPA analysis; (NA) Not Available; (S) Severe phenotype; (M) Mild phenotype; (MO) Multiple osteochondromas; (SO) Solitary osteochondroma. * Patient documented as SO but detected as MO with a very mild symptoms.

Table2: List of mutations in *EXT1* or *EXT2* gene

Gene	Exon-Intron	Patient	DNA	Deduced protein change	Mutation Type	Publication
EXT1	Ex 1	P37	c.248_249insA,	p.Gln84Alafs*105	Frameshift	Francannet, et al 2001
EXT1	Ex 1	P15	c.232insG	p.Val78Glyfs*111	Frameshift	This study
EXT1	Ex 1	P14	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	Frameshift	LOVD ₁
EXT1	Ex 1	P05	c.752delT	p.Leu251*	Nonsense	This study
EXT1	Ex 1	P17	c.791T>C	p.Leu264Pro	Missense	This study
EXT1	Ex 1	P06	c.848T>A	p.Leu283*	Nonsense	Delgado, et al, 2012
EXT1	Ex 1	P16	c.916A>T	p.Lys306*	Nonsense	This study
EXT1	Ex 1	P36	ex1 del	Unknown	Deletion	This study
EXT1	Ex 2	P40	c.1018C>T	p.Arg340Cys	Missense	Philippe, et al, 1997
EXT1	Ex 2	P08	c.1037G>C	p.Arg346Thr	Missense	This study
EXT1	Ex 4	P41	c.1219C>T	p.Gln407*	Nonsense	LOVD ₁
EXT1	Ex 6	P02	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Frameshift	Anh, 1995
EXT1	In 8-9	P29	c.1722+1G>A	p.Gln574*	Splice site	Jennes I et al, 2008
EXT2	Ex 7	P10	c.920_929del10ins1G	p.Asp307Valfs*45	Frameshift	This study
EXT2	Ex 8	P04	ex8 del	Unknown	Deletion	Leube, et al, 2008
EXT2	Ex 10	P01	c.1182G>A	p.Trp394*	Nonsense	This study
EXT2	Ex 12	P27	c.1616_1623del8ins10	p.Asp539Glnfs*5	Frameshift	This study
EXT2	Ex6-16	P12	ex6-16del	Unknown	Deletion	This study

Novel mutations are indicated in bold.
 LOVD₁: <http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>

CAPÍTULO 2. ALTA MASA ÓSEA

ARTÍCULO 4. Una aproximación genómica y transcripcional al fenotipo de Alta Masa Ósea: evidencias de heterogeneidad y del efecto aditivo de *TWIST1*, *IL6R*, *DLX3* y *PPARG*

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron establecer la prevalencia del fenotipo de alta masa ósea (*high bone mass*, HBM) en una cohorte de mujeres postmenopáusicas españolas (BARCOS); determinar la contribución al fenotipo de HBM de mutaciones de *LRP5* y *DKK1* y de variaciones comunes implicadas en la densidad mineral ósea (DMO); y caracterizar la expresión de 88 genes específicos de osteoblastos y de la vía de Wnt en osteoblastos primarios de 2 casos de HBM. El 0,6% de los individuos (10/1600) tenían valores dentro del rango de HBM (la suma de los *Z-scores* > 4). No se encontraron mutaciones en los exones relevantes de *LRP5* y en una mujer se encontró un cambio raro *missense* (p.Y74F) en *DKK1*. En los casos HBM se genotiparon los 55 SNPs relacionados con DMO descritos por Estrada *et al* [NatGenet 44:491-501,2012] para obtener un valor de riesgo para cada individuo. Observamos que los *Z-scores* correlacionaban negativamente con los valores de riesgo, con una única excepción que se podría explicar por una variante genética rara y penetrante. El análisis de expresión en osteoblastos primarios de 2 casos HBM y 5 controles mostró que *IL6R*, *DLX3*, *TWIST1* y *PPARG* se relacionaban negativamente con el *Z-score*. Uno de los casos HBM presentó niveles altos de *RUNX2*, mientras que el otro mostró niveles de *SOX6* muy bajos. En conclusión, proporcionamos evidencias de heterogeneidad y del efecto aditivo de varios genes para el fenotipo HBM.

REFERENCIA

Patricia Sarrión, Leonardo Mellibovsky, Roser Urreizti, Sergi Civit, Neus Cols, Natàlia García-Giralt, Guy Yoskovitz, Alvaro Aranguren, Jorge Malouf, Silvana Di Gregorio, Luís Del Río, Roberto Güerri, Xavier Nogués, Adolfo Díez-Pérez, Daniel Grinberg and Susana Balcells. A Genomic and Transcriptomic Approach to the High Bone Mass Phenotype: Evidence of Heterogeneity and Additive Effects of *TWIST1*, *IL6R*, *DLX3* and *PPARG*. [*Manuscrito en preparación*].

A Genomic and Transcriptomic Approach to the High Bone Mass Phenotype: Evidence of Heterogeneity and Additive Effects of *TWIST1*, *IL6R*, *DLX3* and *PPARG*

Patricia Sarrión,^{1†} Leonardo Mellibovsky,^{2†} Roser Urreizti,¹ Sergi Civit,³ Neus Cols,¹ Natàlia García-Giralt,² Guy Yoskovitz,² Alvaro Aranguren,¹ Jorge Malouf,⁴ Silvana Di Gregorio,⁵ Luís Del Río,⁵ Roberto Güerri,² Xavier Nogués,² Adolfo Díez-Pérez,² Daniel Grinberg^{1‡} and Susana Balcells^{1*‡}

¹ *Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, IBUB, CIBERER, Barcelona, Spain;* ² *URFOA, IMIM, Hospital del Mar, RETICEF, Barcelona, Spain;* ³ *Departament de Estadística, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain;* ⁴ *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain;* ⁵ *CETIR Medical Imaging Centre, RETICEF, Barcelona, Spain*

† These two authors contributed equally to this work.

‡ These two authors contributed equally to this work.

Disclosures

All authors state that they have no conflicts of interest.

ABSTRACT

The aims of the study were to establish the prevalence of the high bone mass (HBM) phenotype in a cohort of Spanish postmenopausal women (BARCOS); to determine the contribution of *LRP5* and *DKK1* mutations and of common bone mineral density (BMD) variants to the HBM phenotype; and to characterize the expression of 88 osteoblast-specific and Wnt-pathway genes in primary osteoblasts from two HBM cases. 0.6% of individuals (10/1600) displayed Z-scores in the HBM range (sum Z-score > 4). No mutations in the relevant exons of *LRP5* were found and a rare missense change in *DKK1* was found in one woman (p.Y74F). Fifty-five BMD SNPs from Estrada *et al* [NatGenet 44:491-501,2012] were genotyped in the HBM cases to obtain risk scores for each individual. Z-scores were negatively correlated with these risk scores, with a single exception, which may be explained by a rare penetrant genetic variant. The expression analysis in primary osteoblasts from two HBM cases and five controls showed that *IL6R*, *DLX3*, *TWIST1* and *PPARG* were negatively related to Z-score. One HBM case presented with high levels of *RUNX2*, while the other displayed very low *SOX6*. In conclusion, we provide evidence of heterogeneity and the additive effects of several genes for the HBM phenotype.

KEY WORDS: HIGH BONE MASS; OSTEOPOROSIS; BMD; LRP5; DKK1; IL6R; TWIST1; DLX3; PPARG; RUNX2; SOX6

INTRODUCTION

Osteoporosis has a complex genetic background. Bone mineral density (BMD) is a highly heritable intermediate phenotype that correlates well with fracture risk.⁽¹⁻⁶⁾ BMD is distributed as a Gaussian curve in the general population, with two small groups having extremely low or extremely high BMD values at both ends. These individuals with extreme phenotypes may bear infrequent and highly penetrant alleles at a few specific loci. Alternatively, the extreme phenotypes may depend on the presence of a high number of common variants with low penetrance and additive effects.

A few individuals with high bone mass (HBM, MIM#601884), as defined by a sum Z-score > 4 (total lumbar spine Z-score + total femoral neck Z-score), have been reported to bear highly penetrant missense alleles at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*, MIM#603506) locus that are transmitted in an autosomal dominant way. More than 10 years ago, two different groups found that *LRP5* regulated bone mass.^(7,8) While inactivating mutations in *LRP5* were shown to cause osteoporosis-pseudoglioma syndrome,⁽⁷⁾ gain-of-function mutations caused a high bone mass (HBM) phenotype.⁽⁸⁾ This phenotype has been associated with the *LRP5*-G171V mutation in two independent pedigrees.^(8,9) Six additional missense mutations (D111Y, G171R, A214T, A214V, A242T and T253I), all in the first β -propeller domain of *LRP5*, were identified in patients who also showed an increased bone density.⁽¹⁰⁾ The affected individuals had elevated bone synthesis assessed by serum markers, but normal bone resorption, bone architecture and serum calcium, phosphate, PTH and vitamin D levels.^(8,9) Significant phenotypic heterogeneity was reported, and some affected family members also had a torus palatinus.

LRP5 acts as a co-receptor with members of the Frizzled family to activate the canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway, which is crucial for bone formation.⁽¹¹⁾ This pathway is activated by the binding of the appropriate Wnt protein to *LRP5* and is blocked by

the binding of inhibitors such as Dickkopf-related protein 1 (encoded by *DKK1*, MIM#605189) and Sclerostin (encoded by *SOST*). The HBM-causing mutation prevents the binding of these two inhibitors. Mutations in *SOST* are the cause of van Buchem disease⁽¹²⁾ and sclerostosis,⁽¹³⁾ two pathologies with an abnormally high bone density. On the other hand, *Dkk1*^{+/-} mice showed a marked increase in bone mass.⁽¹⁴⁾

The prevalence of HBM in the general population has been estimated as 0.2-1%,^(8,15,16) but the genetic architecture of this extreme phenotype remains poorly understood. However, recent genome-wide association (GWA) analyses and meta-analyses have established a number of genomic loci that explain differences in BMD across the general population. In particular, Estrada et al.⁽¹⁷⁾ identified 56 such genomic loci and showed how they can be used to calculate risk scores to predict BMD.

In order to explore the genetic constitution of the high bone mass phenotype, our aims were, first, to establish the prevalence of HBM in the BARCOS cohort of postmenopausal Spanish women; second, to determine whether any of the HMB cases carried *LRP5* or *DKK1* mutations that could explain the phenotype; third, to assess whether the HBM cases were carriers of a low number of risk alleles of 55 autosomal GWA-identified BMD loci; and fourth, to characterize the osteoblast RNA samples from two HBM cases in terms of 88 osteoblast-specific and/or Wnt-pathway genes.

MATERIALS AND METHODS

Study Cohort

The study population included the HBM cases in the BARCOS cohort (n=10). This cohort of postmenopausal women from the Barcelona area has been described elsewhere.^(18,19) Four additional HBM cases were recruited from CETIR, Barcelona (a private medical

services centre specializing in nuclear medicine and other imaging modalities). Blood samples and written informed consent were obtained in accordance with the regulations of the Hospital del Mar Human Investigation Review Committee for Genetic Procedures. A total of 1600 dual-energy X-ray absorptiometry scans (DXA; QDR 4500 SL; Hologic, Waltham, MA, USA) of the women from this cohort were analysed in order to pinpoint those HBM cases in which the sum Z-score (hip plus lumbar spine) was equal to or greater than four.⁽⁸⁾ All DXA measurements were performed prior to any treatment that could increase bone mass. Pathologic phenotypes such as osteopetrosis or any other sclerosing bone disorders were ruled out based on the absence of radiologic alterations in the skull and long bones, the absence of any fragility fracture and the absence of any underlying disease.

Sequencing of *LRP5* and *DKK1*

The genomic DNA of each participant was isolated from peripheral blood leukocytes using conventional methods. In all probands, *LRP5* exons 2 to 4 and 9 to 16, and their intronic flanking regions, and the four exons and flanking regions of *DKK1* were amplified and sequenced using specific primers. Mutation screening was performed by direct sequencing using the BigDye v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Primers and PCR conditions are available on demand. Nomenclature for DNA variants followed these reference sequences: NM_002335.2 for *LRP5* and NM_012242.2 for *DKK1*.

SNP Selection and Genotyping

Out of the 64 SNPs identified by Estrada et al.,⁽¹⁷⁾ we chose 55, one for each autosomal locus (listed in Supplementary Table 1). Genotyping of the 13 available HBM cases was carried out with a KASPar v4.0 genotyping system at the Kbioscience facilities (Kbioscience,

Herts, UK) using the Kraken allele-calling algorithm. The genotypes of 1001 BARCOS participants for the same SNPs were already available, since this cohort was included in the replication phase of the study by Estrada et al.⁽¹⁷⁾ One of the SNPs (rs3905706) gave conflicting results and was eliminated from the analyses. Quality control was carried out by resequencing 6.28% of the samples. The readings showed full concordance between the two techniques.

Genetic Risk Allele Analysis

The analysis of the 54 SNPs associated with BMD was similar to the one carried out by Estrada et al.⁽¹⁷⁾ Briefly, the genotype of each SNP was transformed into a risk score by taking into account the effects estimated by the authors and listed in their Supplementary Table 9. The scores for homozygotes for the risk allele were 2x the effect size; scores for heterozygotes were 1x the effect size; and the scores for homozygotes for the alternative allele were zero. For each individual, the risk scores of all SNPs were summed up to obtain a global risk score, which was then normalized by dividing it by the mean effect size of BARCOS. Normalized global risk scores were sorted into five bins, as described in Estrada et al.⁽¹⁷⁾ Missing genotypes within BARCOS cohort individuals and also within HBM probands were solved by replacing them by the mean of the corresponding SNP scores in BARCOS. This strategy would attenuate the variance of the overall group.⁽²⁰⁾

Primary Osteoblast Isolation and Cell Culture

Primary osteoblast (hOB) cells of postmenopausal women were available from bone specimens extracted from knee samples that would otherwise have been discarded at the time of orthopaedic surgery. Both informed consent and BMD values were obtained from the donors. One of them was patient HBM10. Five donors had sum Z-score values of 2.4, 1.2,

0.4, -0.7 and -2.2, and were used as controls. One additional donor had a sum Z-score value of 5.3 and was used as a second HBM case for the transcriptomic analysis, since she fulfilled all HBM criteria. hOB cells were obtained from bone specimens, as described previously.^(21,22) Briefly, the trabecular bone was separated and cut into small fragments, washed in phosphate buffered solution (PBS) to remove non-adherent cells, and placed on a petri dish. Samples were incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco; Invitrogen, Paisley, UK), supplemented with sodium pyruvate (1 mM), L-glutamine (1 mM), 1% penicillin/streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS), 0.4% fungizone and 1% ascorbic acid. Cells were subcultured twice, prior to harvesting and total RNA extraction.

RNA Extraction, cDNA Synthesis and Real-time PCR

Total cell RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using random primers of the High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) in accordance with the manufacturer's instructions. The real-time PCR (qPCR) reactions were performed in a final volume of 10 µl using 20 ng of each cDNA, which was used as template for each well in the RealTime ready Custom Panel 384 (Roche). This custom panel included 88 genes selected by us (Table 2). All qPCR reactions for each sample were performed in triplicate with the LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim, Germany). *B2M* was chosen as the reference gene because of its minimum coefficient of variation between samples.

Validation of the 11 genes with positive results in the expression analysis described previously was performed with new assays designed using the online ProbeFinder software (Roche). *GAPDH* and *18S* were tested as possible reference genes, and *GAPDH* was selected. For this validation step, samples from three additional control individuals were included in

the analysis. Again, all qPCR reactions for each sample were performed in triplicate with the LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim, Germany).

Statistical Analysis

Statistical significance of differences in gene expression between two HBM and five control individuals was determined by the Mann-Whitney *U* test. The correlation between the expression levels and Z-scores was analysed by linear regression. Calculations were performed with SPSS v11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

HBM Prevalence in the BARCOS Cohort and Features of the HBM Cases

In total, 1600 DXA scans were analysed across the BARCOS cohort. Those cases in which the sum Z-score was equal to or greater than four were considered HBM cases and further analysed. Pathologic phenotypes were ruled out based on a more in-depth examination of the medical history, a physical examination and a radiologic study. In the BARCOS cohort, 10 cases (0.63% of individuals) fulfilled this HBM criterion. Five additional HBM cases were recruited elsewhere (see Materials and Methods). The main features of all HBM cases are listed in Table 1.

Search for Mutations in *LRP5* and *DKK1*

Exons 2 to 4 of *LRP5*, which encode the first beta-propeller of the protein, and in which HBM mutations have previously been described, were sequenced in the 13 HBM cases with available DNA sample. Next, exons 9 to 16 were analysed, since they encode beta-propellers 3 and 4, which have been described as binding regions for the *LRP5* inhibitor *DKK1*. No

private and probably causing mutations were found in any of these exons. The missense *LRP5* polymorphisms p.V667M (rs4988321) and p.A1330V (rs3736228), associated with BMD in GWA studies, together with other silent exonic variants found in the HBM individuals, are shown in Table 1. Their frequencies in HBM cases were similar to those found in the general population (dbSNP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Regarding *DKK1*, the four exons and flanking regions were amplified and sequenced in the 13 HBM cases. One previously undescribed heterozygous missense change (p.Y74F) and an exonic silent polymorphism were found in different individuals (Table 1). The p.Y74F was not present in the 1000 genomes database, while the tyrosine 74 and adjacent residues were found to be conserved in the *Dkk1* sequences of primates, rodents and cows (but not in *C. lupus* or *D. rerio*). PolyPhen and SIFT scores for this missense change were as follows: 0.068 (benign) and 0.38 (tolerated).

Analysis of 55 Bone Mineral Density *Loci*

Fifty-five SNPs previously described to be associated with BMD at GWA significance⁽¹⁷⁾ were genotyped in the 13 HBM cases and the genetic risk score for each individual was then calculated by taking into account both the number of risk alleles and the relative effect of each SNP on BMD (see Methods). This calculation was also performed for 1001 individuals in the BARCOS cohort with available SNP genotype and LS-BMD data. Figure 1A shows the distribution of the BARCOS individuals into the different score bins (bars) and the mean LS-BMD value for each bin (triangles). As expected, a decrease in BMD values was observed as the genetic risk score increased. Figure 1B shows a similar graph for the 11 HBM individuals for which genotyping was successful (two of the HBM cases -HBM8 and HBM14- had to be discarded because of sub-optimal genotyping results). The frequency distribution shows a shift towards the lower genetic risk score bins. Again, BMD values

(measured as Z-scores) decreased as genetic risk scores increased, with the exception of one individual (HBM9), who presented the maximum BMD value (Z-score = 7) and the largest genetic risk score.

Expression Analysis of 88 Bone-development and/or Wnt-pathway Genes

A transcriptomic analysis by qPCR was carried out in primary osteoblast samples from two HBM and five control individuals that were obtained after knee-replacement orthopaedic surgery. In a first step, 88 bone-development and/or Wnt-pathway genes (Table 2) were analysed in samples from the two HBM cases and two control individuals. Differences above or below 2 fold in expression level between HBM and control individuals were observed for 11 genes (underlined in Table 2). These genes were validated and re-analysed using new probes and samples from three additional control individuals. A borderline significant difference ($p=0.053$, Mann-Whitney U test) between mean ranks of HBM and control individuals was detected for three of these genes, *TWIST1*, *FZD3* and *IL6R*. Additionally, a correlation analysis between expression levels and Z-scores was performed for the 11 genes. Significant negative correlation was observed for *TWIST1* ($p=0.023$, Fig. 2A), *IL6R* ($p=0.006$, Fig. 2B), *DLX3* ($p=0.006$, Fig. 2C) and a trend, without reaching significance, was observed for *PPAR- γ* ($p=0.093$, Fig. 2D). For *SOX6* and *RUNX2*, one of the HBM samples (but not the other) presented an expression level that was 5-fold decreased or increased, respectively, compared with controls (Fig. 2F and 2G).

DISCUSSION

In this study we established that the prevalence of the HBM phenotype in a Spanish cohort of postmenopausal women is 0.63%. None of the HBM individuals had mutations in the relevant exons of the *LRP5* gene that could explain their phenotype. One individual had a

rare missense change in *DKK1* (p.Y74F). The results of the analysis of 55 osteoporosis-predisposing SNPs pointed to an inverse correlation between risk alleles and BMD in this group of HBM women, with the exception of one case with the highest BMD value and the highest risk score. Finally, the results of an expression analysis in primary osteoblasts showed a significant negative correlation between Z-scores and mRNA levels of *TWIST1*, *IL6R*, *DLX3* and *PPAR-γ*, and a possible role of elevated *RUNX2* or reduced *SOX6* levels in HBM.

There are few studies that describe the prevalence of HBM in the general population. In a recent one,⁽¹⁵⁾ the authors studied a UK DXA-scanned population in which the prevalence of HBM was 0.2% of individuals. The lower prevalence (0.2% versus our 0.6%) may be due to differences in the study design, including the definition of HBM, which was stricter in their study. All HBM-related *LRP5* mutations identified to date are located in the first beta-propeller of the protein,⁽¹⁰⁾ while the mutations that cause osteoporosis-pseudoglioma syndrome and exudative vitreoretinopathy are found all over the gene.⁽²³⁾ In our mutational analysis of exons coding for the first beta-propeller (and for the third and fourth, which have been described as binding regions for *DKK1*,⁽²⁴⁾) no mutations were detected in the 13 HBM individuals analysed. Our results are in agreement with those published by Duncan et al.,⁽²⁵⁾ who pointed out that < 2% of their HBM cases were due to mutations on exons 2-4 and intron/exon boundaries of the *LRP5* gene, after analysing 98 patients.

We also analysed the *DKK1* gene under the hypothesis that loss-of-function mutations in this gene could have the same effect as gain-of-function mutations in *LRP5*. In this regard, it has been shown that bone mass was inversely proportional to *Dkk1* levels in mice.⁽²⁶⁾ We found a missense change (p.Y74F) in one HBM individual. In humans, the only report on *DKK1* mutations is by Korvala et al.,⁽²⁷⁾ who recently suggested that a mutation in *DKK1* may predispose individuals to primary osteoporosis. No mutations were found in the HGMD Professional 2012.4 database (released 14 December 2012), and a limited number of very rare

missense changes (18) were found in the 1000 genomes database (released 12 May 2012); seven of these are predicted to be deleterious by SIFT and probably damaging by PolyPhen. Whether these changes, or the p.Y74F described in this paper, are associated with an HBM phenotype remains an interesting open question.

To test whether the HBM phenotype could be explained by a polygenic additive effect of susceptibility loci, we chose to genotype the GWA-discovered BMD loci defined by Estrada et al. [2012]. We were able to use the BARCOS cohort information for these same loci as a framework for comparison. We would expect HBM individuals to bear a high number of protective alleles or a low number of risk alleles. Indeed, the distribution of genetic risk scores for the HBM cases shifted towards lower risk, with the mode bin set at 44-48 instead of 48-52 and the mean of scores being 48.08 instead of 50, although we did find HBM cases in all of the bins (Fig. 1). However, we note that the only HBM individual falling into the highest risk score bin (HBM9) was the one with the highest Z-score and such a contradictory fact might indicate the existence of a highly penetrant and probably rare protective allele counterbalancing the additive effect of the risk alleles. The HBM phenotype of this individual might be a Mendelian trait due to an as-yet unidentified gene. In this respect, the HBM phenotype in the family of HBM9 seems to segregate as a discrete trait: the mother is also an HBM individual (sum Z-score = 4.4), while her eldest brother is not (Fig. 1C). Altogether, these results are consistent with the coexistence of both polygenic and Mendelian cases of HBM, which would then be a heterogeneous trait.

To gain further insight into specific genes that might be involved in the HBM phenotype, we undertook a transcriptomic study of two HBM cases for which we had access to primary osteoblast cultures. We selected 88 genes to set up a Roche Custom Panel 384 assay, which extensively covered both Wnt-pathway and bone biology genes. For this selection, we took into account the sites recently highlighted by GWA analyses, in particular

those in Estrada et al.⁽¹⁷⁾ and Duncan et al.⁽²⁸⁾ When expression levels were compared between the HBM cases and five controls, only six genes displayed differences. Three of them presented mRNA levels that negatively correlated with BMD (*TWIST1*, *IL6R* and *DLX3*), and a fourth, *PPAR- γ* , showed a trend without reaching significance. The other two genes had one of the two HBM samples with outlier mRNA levels: *RUNX2* was 6-fold elevated in one HBM sample, while *SOX6* was 5-fold reduced in the other HBM sample. These six genes may play a role in the HBM phenotype and may act in an additive way. For instance, the addition of *TWIST1*, *IL6R*, and *DLX3* yields a coefficient of determination of 0.91 ($p=0.001$; Fig. 2E), which means that as much as 91% of the Z-score value may be explained by the expression levels of these three genes. Interestingly, only two of the six genes (*RUNX2* and *SOX6*) correspond to GWA-significant BMD loci.

As for their functions, none of them belong to the Wnt pathway and all except *IL6-R* play roles in skeletal development. *RUNX2*, *TWIST1* and *PPAR- γ* are involved at the stage of mesenchymal stem cell (MSC) differentiation. At this stage, several transcription factors, including *PPAR- γ* , determine adipogenesis, while *Runx2* and *SP7* are necessary for osteoblastogenesis. Firstly, *PPAR- γ* favours adipogenesis and suppresses osteoblastogenesis, partly through inhibiting *RUNX2*, which results in a reduced number of osteoblasts in the bone marrow. Later, *PPAR- γ* stimulates osteoclastogenesis by enhancing *c-fos* expression in osteoclast precursor cells.⁽²⁹⁾ Regarding *TWIST1*, it is an inhibitory partner of *RUNX2*. The relief of this inhibition leads to the onset of osteoblast differentiation.⁽³⁰⁾ Moreover, loss of function mutations in *TWIST1* result in Saethre-Chotzen Syndrome, an autosomal dominant condition characterized by craniosynostoses, limb anomalies and tooth agenesis.⁽³¹⁾ Association of *TWIST1* with BMD in postmenopausal women has been reported.⁽³²⁾

The transcription factor *Sox6* plays a central role in endochondral skeletal development by promoting cartilage matrix formation. *Sox6* ensures proper spatial and temporal

maturation of chondrocytes in cartilage growth plates.⁽³³⁾ It has been reported that a disruption of the *SOX6* gene, which likely results in haploinsufficiency, can cause craniosynostosis.⁽³⁴⁾ *DLX3* is developmentally expressed during osteoblast growth and differentiation and promotes development of the osteoblast phenotype.⁽³⁵⁾ *DLX3* also plays a regulatory role in the development of the ventral forebrain and may play a role in craniofacial patterning and morphogenesis.⁽³⁶⁾ Mutations of loss of function and haploinsufficiency of *DLX3* cause tricho-dento-osseous syndrome,⁽³⁷⁾ an autosomal dominant disorder characterized by increased density and/or bone thickness.⁽³⁸⁾ Human and animal experiments have implicated pro-inflammatory cytokines as primary mediators of accelerated bone loss in menopause, including interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6. Increased production of pro-inflammatory cytokines is associated with osteoclastic bone resorption in a number of disease states, including rheumatoid arthritis, periodontitis and multiple myeloma; oestrogen withdrawal is associated with increased production of pro-inflammatory cytokines, and exposure of bone cultures to supernatants from activated leukocytes is associated with increased bone resorption.⁽³⁹⁾ Interleukin-6 (IL-6) is a proinflammatory cytokine that leads to multilineage differentiation of hematopoietic cells and acts through IL-6R. IL-6R-induced osteoclast activation is well documented⁽⁴⁰⁾ and appears to require IL-1, another important proosteoclastogenic cytokine.⁽⁴¹⁾ Axman et al.⁽⁴²⁾ demonstrated that blockade of IL-6R through neutralizing antibodies specifically blocks inflammatory osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo*.

In summary, these six genes act through four distinct pathways: MSC differentiation (*RUNX2*, *TWIST1*, *PPARG*); chondrogenesis (*SOX6*); skeletal formation (*DLX3*); and inflammation/osteoclastogenesis (*IL6R*). Concomitant optimization of these distinct pathways that influence BMD at different developmental and physiological stages may be a way to reach the HBM phenotype. IL6R has been targeted by a monoclonal antibody (tocilizumab)

and phase III clinical trials in patients with rheumatoid arthritis are encouraging.^(43,44) Given the inverse correlation of BMD and IL6R osteoblast mRNA observed here, it is tempting to speculate that this same strategy might serve as a treatment for improving BMD.

It is evident that the expression analysis presented here was limited and did not cover all of the genes in the human genome. Additionally, the number of individuals analysed was modest because of the difficulties in finding primary human osteoblasts. These represent limitations of the study. Additional genes may also be relevant for HBM. To further exploit the transcriptomic analysis in terms of both genes and samples, it may be necessary to turn to easier sources of mRNA such as lymphocytes.

In conclusion, to our knowledge, this genomic and transcriptomic analysis of HBM is the first report of its kind. By combining both strategies, it was possible to gain a deeper insight into the genetic makeup of the HBM phenotype, consisting on evidences of additive effects, genetic heterogeneity and a possibly monogenic case not caused by *LRP5* or *DKK1*. Furthermore, the transcriptomic approach in primary osteoblasts helped identify specific relevant genes, some of which might be therapeutic targets for osteoporosis.

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their enthusiastic participation. The authors are also grateful for the support from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) and from the Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad (RETICEF), which are initiatives of the ISCIII. This study was funded in part by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-15707, SAF2011-25431 and PIB2010AR-00473). PS was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI). SC was supported by BFU2012-34157.

Authors'roles: Conception and design: PS, LM, RU, SC, XN, AD-P, DG, SB. Acquisition of data: PS, LM, RU, SC, NC, NG-G, GY, AA, JM, SDG, LDR, RG. Analysis and interpretation of data: PS, LM, SC, DG, SB. Drafting of the manuscript: PS, LM, DG, SB. Critical revision of the manuscript: all authors. Approval of final version: all authors. DG and SB take responsibility for the integrity of the data analysis.

References

1. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC, Jr. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest.* 1973;52:2800-8.
2. Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, Vogt TM. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet.* 1993;341:72-5.
3. Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Wahner HW, Riggs BL. Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. *J Bone Miner Res.* 1993;8:1227-33.
4. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res.* 1995;10:2017-22.
5. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996;312:1254-9.
6. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M, Christian JC, Sorbel J, Hui SL, Johnston CC. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporos Int.* 1996;6:178-82.
7. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107:513-23.
8. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002;70:11-9.

9. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002;346:1513-21.
10. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet.* 2003;72:763-71.
11. Baron R, Rawadi G. Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep.* 2007;5:73-80.
12. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, Dioszegi M, Dikkers FG, Hildering P, Willems PJ, Verheij JB, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet.* 2002;39:91-7.
13. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepfer BW, Kovacevich BR, Prohl S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet.* 2001;68:577-89.
14. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res.* 2006;21:934-45.
15. Gregson CL, Steel SA, O'Rourke KP, Allan K, Ayuk J, Bhalla A, Clunie G, Crabtree N, Fogelman I, Goodby A, Langman CM, Linton S, Marriott E, McCloskey E, Moss KE, Palferman T, Panthakalam S, Poole KE, Stone MD, Turton J, Wallis D, Warburton S, Wass J, Duncan EL, Brown MA, Davey-Smith G, Tobias JH. 'Sink or swim': an evaluation of the clinical characteristics of individuals with high bone mass. *Osteoporos Int.* 2012;23:643-54.
16. Gregson CL, Sayers A, Lazar V, Steel S, Dennison EM, Cooper C, Smith GD, Rittweger J, Tobias JH. The high bone mass phenotype is characterised by a combined cortical and trabecular bone phenotype: Findings from a pQCT case-control study. *Bone.* 2013;52:380-8.
17. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, Oei L, Albagha OM, Amin N, Kemp JP, Koller DL, Li G, Liu CT, Minster RL, Moayyeri A, Vandenput L, Willner D, Xiao SM, Yerges-Armstrong LM, Zheng HF, Alonso N, Eriksson J, Kammerer CM, Kaptoge SK, Leo PJ, Thorleifsson G, Wilson SG, Wilson JF, Aalto V, Alen M, Aragaki AK, Aspelund T, Center JR, Dailiana Z, Duggan DJ, Garcia M, Garcia-Giralt N, Giroux S, Hallmans G, Hocking LJ, Husted LB, Jameson KA, Khusainova R, Kim GS, Kooperberg C, Koromila T, Kruk M, Laaksonen M, Lacroix AZ, Lee SH, Leung PC, Lewis JR, Masi L, Mencej-Bedrac S, Nguyen TV, Nogues X, Patel MS, Prezelj J, Rose LM, Scollen S, Siggeirsdottir K, Smith AV, Svensson O, Trompet S, Trummer O, van Schoor NM, Woo J, Zhu K, Balcells S, Brandi ML, Buckley BM, Cheng S, Christiansen C, Cooper C, Dedoussis G, Ford I, Frost M, Goltzman D, Gonzalez-Macias J, Kahonen M, Karlsson M, Khusnutdinova E, Koh JM, Kollia P, Langdahl BL, Leslie WD, Lips P, Ljunggren O, Lorenc RS, Marc J, Mellstrom D, Obermayer-Pietsch B, Olmos JM, Pettersson-Kymmer U, Reid DM, Riancho JA, Ridker PM, Rousseau F, Slagboom PE, Tang NL, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44:491-501.

18. Bustamante M, Nogues X, Mellibovsky L, Agueda L, Jurado S, Caceres E, Blanch J, Carreras R, Diez-Perez A, Grinberg D, Balcells S. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with bone mineral density and body mass index in Spanish postmenopausal women. *Eur J Endocrinol.* 2007;157:677-84.
19. Bustamante M, Nogues X, Agueda L, Jurado S, Wesselius A, Caceres E, Carreras R, Ciria M, Mellibovsky L, Balcells S, Diez-Perez A, Grinberg D 2007 Promoter 2 -1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck bmd in Spanish postmenopausal women *Calcif Tissue Int*, 2007/09/20 ed., vol. 81, pp 327-32.
20. Little RJA, Rubin DB 1987 Statistical analysis with missing data. John Wiley & Sons, New York.
21. Garcia-Moreno C, Mendez-Davila C, de La Piedra C, Castro-Errecaborde NA, Traba ML. Human prostatic carcinoma cells produce an increase in the synthesis of interleukin-6 by human osteoblasts. *Prostate.* 2002;50:241-6.
22. Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, Perez-Castrillon JL, Perez-Aguilar MD, Perez-Nunez MI, Sanudo C, Hernandez-Elena J, Calvo I, Ortiz F, Gonzalez-Macias J, Riancho JA. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporos Int.* 2010;21:109-18.
23. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004;131:1663-77.
24. Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, Li Z, Zheng J, Li L, Harris S, Wu D. The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. *Mol Cell Biol.* 2004;24:4677-84.
25. Duncan EL, Gregson CL, Addison K, Brugmans M, Pointon JJ, Appleton LH, Tobias JH, Brown MA. Mutations in LRP5 and SOST are a rare cause of high bone mass in the general population. *Bone.* 2009;44:S340-S341.
26. MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, Sharma P, Goldstein SA, He X, Hauschka PV. Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone.* 2007;41:331-9.
27. Korvala J, Loija M, Makitie O, Sochett E, Juppner H, Schnabel D, Mora S, Cole WG, Ala-Kokko L, Mannikko M. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet.* 2012;55:515-9.
28. Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, Eastell R, Prince RL, Eisman JA, Jones G, Sambrook PN, Reid IR, Dennison EM, Wark J, Richards JB, Uitterlinden AG, Spector TD, Esapa C, Cox RD, Brown SD, Thakker RV, Addison KA, Bradbury LA, Center JR, Cooper C, Cremin C, Estrada K, Felsenberg D, Gluer CC, Hadler J, Henry MJ, Hofman A, Kotowicz MA, Makovey J, Nguyen SC, Nguyen TV, Pasco JA, Pryce K, Reid DM, Rivadeneira F, Roux C, Stefansson K, Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Tichawangana R, Evans DM, Brown MA. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet.* 2011;7:e1001372.
29. Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ. Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5:365-72.
30. Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell.* 2004;6:423-35.
31. Reardon W, Winter RM. Saethre-Chotzen syndrome. *J Med Genet.* 1994;31:393-6.
32. Hwang JY, Kim SY, Lee SH, Kim GS, Go MJ, Kim SE, Kim HC, Shin HD, Park BL, Kim TH, Hong JM, Park EK, Kim HL, Lee JY, Koh JM. Association of TWIST1 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2010;21:757-64.

33. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*. 2001;1:277-90.
34. Tagariello A, Heller R, Greven A, Kalscheuer VM, Molter T, Rauch A, Kress W, Winterpacht A. Balanced translocation in a patient with craniosynostosis disrupts the SOX6 gene and an evolutionarily conserved non-transcribed region. *J Med Genet*. 2006;43:534-40.
35. Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL, Lian JB. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*. 2004;24:9248-61.
36. Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet*. 1998;7:563-9.
37. Nieminen P, Lukinmaa PL, Alapulli H, Methuen M, Suojarvi T, Kivirikko S, Peltola J, Asikainen M, Alaluusua S. DLX3 homeodomain mutations cause tricho-dento-osseous syndrome with novel phenotypes. *Cells Tissues Organs*. 2011;194:49-59.
38. Haldeman RJ, Cooper LF, Hart TC, Phillips C, Boyd C, Lester GE, Wright JT. Increased bone density associated with DLX3 mutation in the tricho-dento-osseous syndrome. *Bone*. 2004;35:988-97.
39. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev*. 2007;65:S147-51.
40. Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:15-24.
41. Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman GD. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res*. 1998;13:393-9.
42. Axmann R, Bohm C, Kronke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2747-56.
43. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, Woodworth T, Alten R. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*. 2008;371:987-97.
44. Yokota S, Tanaka T, Kishimoto T. Efficacy, safety and tolerability of tocilizumab in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012;4:387-97.

Table 1. Phenotypes and genotypes at *LRP5* and *DKK1*

Probands	Phenotypes				<i>LRP5</i> exonic SNPs					<i>DKK1</i> exonic changes	
	Sum Z-score	FN-BMD (g/cm ²)	LS-BMD (g/cm ²)	Age	Cohort	p.V667M ¹	p.A1330V ¹	p.V1119V ¹	Others ¹	p.A106A ¹	Variant
HBM1 ²	6.1	1.033	1.337	51	BARCOS	NA	NA	NA	NA	NA	NA
HBM2	4.6	0.868	1.278	57	BARCOS	-	-	Het.	p.E644E	Het.	-
HBM3	4.9	1.004	1.159	55	BARCOS	-	-	Het.	p.N705N	Homo.	-
HBM4	4.5	1.020	1.200	62	BARCOS	-	Het.	Het.	p.N740N	Het.	-
HBM5	4.5	0.911	1.174	66	BARCOS	-	-	Het.	p.E644E	-	-
HBM6	5.1	0.893	1.203	52	BARCOS	-	-	-	-	Homo.	-
HBM7	4.6	0.936	1.176	61	BARCOS	-	-	Het.	p.N740N	-	-
HBM8	7.9	1.156	1.360	55	BARCOS	-	-	NA	NA	NA	NA
HBM9	7.0	0.971	1.348	66	BARCOS	-	Het.	Het.	-	Het.	-
HBM10	5.1	1.004	1.092	75	BARCOS	-	-	Het.	-	-	-
HBM12	6.4	1.182	1.437	59	CETIR	-	-	Het.	-	-	-
HBM13	5.2	1.198	1.315	67	CETIR	Het.	Het.	Het.	p.E644E	Het.	-
HBM14	6.0	1.126	1.397	64	CETIR	-	Het.	Het.	p.N740N	Het.	-
HBM15	4.5	1.136	1.374	54	CETIR	-	-	Het.	p.N740N	Het.	-

¹ Corresponding reference sequences, rs-numbers and MAFs are: *LRP5* (NM_002335.2): p.E644E (rs227268, 0.06); p.V667 (rs4988321, 0.03); p.N705N (rs145456776,

<0.01); p.N740N (rs2306862, 0.15); p.V1119V (rs556442, 0.28); p.A1330V (rs3736228, 0.13). *DKK1* (NM_012242.2): p.A106A (rs2241529, 0.46). All *LRP5* variants listed under "Others", as well as the *DKK1* p.Y74F, were found in heterozygous state.

² Deceased during the course of the study.

³ A novel missense change is indicated in bold.

Het.: heterozygous for the variant; Homo.: homozygous for the minor allele; NA: not available; -: homozygous for the reference allele.

Table 2. Genes included in the RealTime Custom Panel

Wnt-pathway genes		Bone biology genes		
<i>AES</i>	<i>WNT2</i>	<i>AKAP11</i>	<i>DLX5</i>	<u>RUNX2</u>
<i>APC</i>	<i>WNT2B</i>	<i>ALPL</i>	<i>FGF23</i>	<i>SHH</i>
<i>AXIN1</i>	<i>WNT3</i>	<i>ARHGAP1</i>	<i>GALNT3</i>	<i>SMAD1</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>WNT3A</i>	<i>BGLAP</i>	<i>GPR177</i>	<i>SMAD2</i>
<i>DKK1</i>	<i>WNT4</i>	<i>BMP1</i>	<i>HDAC5</i>	<i>SMAD3</i>
<i>DMP1</i>	<i>WNT5A</i>	<i>BMP2</i>	<i>IHH</i>	<i>SMAD4</i>
<i>FZD1</i>	<i>WNT5B</i>	<i>BMP3</i>	<u>IL6R</u>	<i>SOX4</i>
<u>FZD3</u>	<i>WNT7A</i>	<u>BMP4</u>	<i>JAG1</i>	<u>SOX6</u>
<i>FZD4</i>	<i>WNT7B</i>	<i>BMP5</i>	<i>MEF2C</i>	<i>SOX9</i>
<i>FZD5</i>	<i>WNT9A</i>	<i>BMP7</i>	<i>MEPE</i>	<u>SP7 (OSX)</u>
<i>FZD6</i>	<i>WNT10A</i>	<i>c18orf19</i>	<i>MMP2</i>	<i>STARD3NL</i>
<i>FZD9</i>	<i>WNT10B</i>	<i>CIZ/NMP4</i>	<i>MMP9</i>	<i>TGFB1</i>
<i>LEF1</i>	<i>WNT11</i>	<i>CLCN7</i>	<i>MSX2</i>	<i>TNFRSF11A (RANK)</i>
<i>LRP5</i>	<i>WNT16</i>	<i>CNOT7</i>	<i>NFATc1</i>	<i>TNFRSF11B (OPG)</i>
<i>LRP6</i>		<u>COL10A1</u>	<i>NFAT5</i>	<i>TNFSF11 (RANKL)</i>
<i>SFRP1</i>		<i>COL1A1</i>	<i>NFKB1</i>	<u>TWIST1</u>
<i>SFRP4</i>		<i>COL1A2</i>	<i>NPY1-R</i>	<i>ZBTB40</i>
<u>SOST</u>		<i>CYP19A1</i>	<u>PPARG</u>	
<i>WNT1</i>		<u>DLX3</u>	<i>PTH</i>	

Genes with a positive result in the first comparison (two HBM and two controls) are underlined. Genes with significant (or borderline) results in the validation stage (two HBM vs. five controls) are shown in bold.

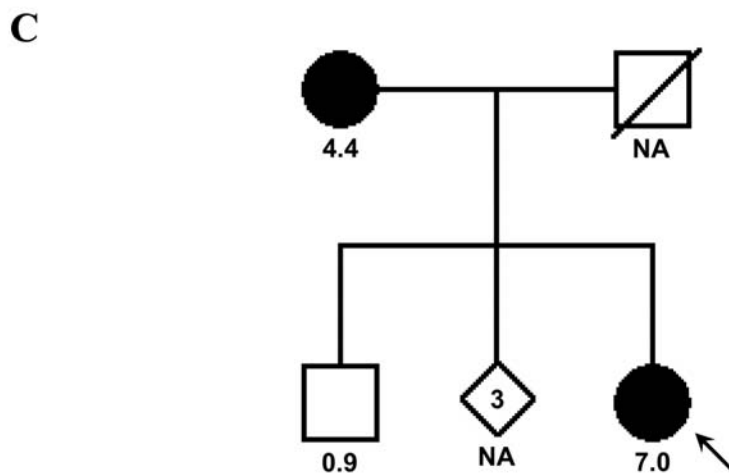
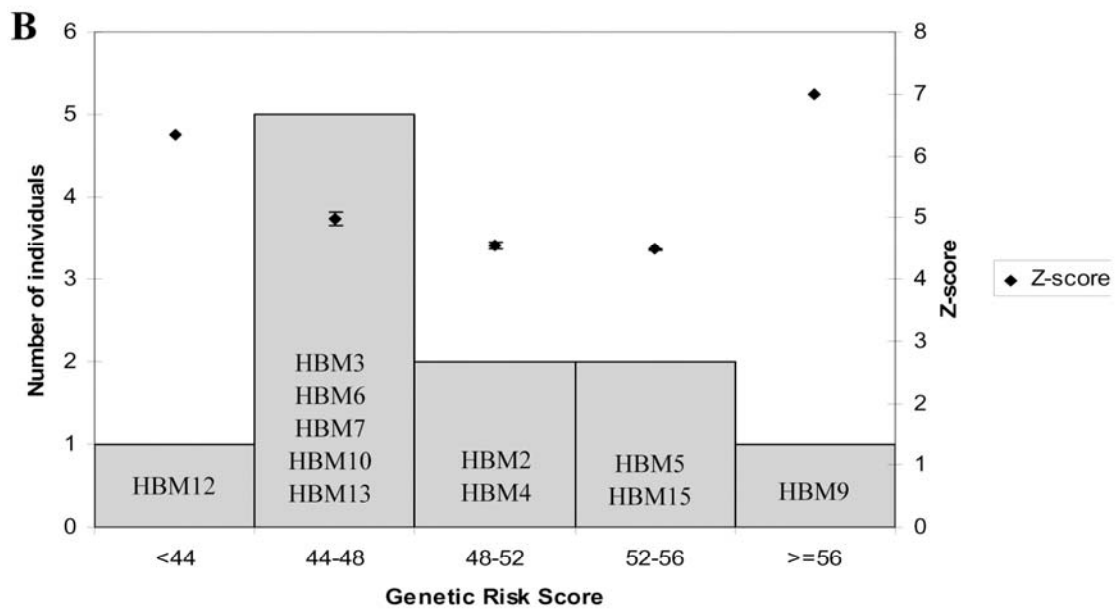
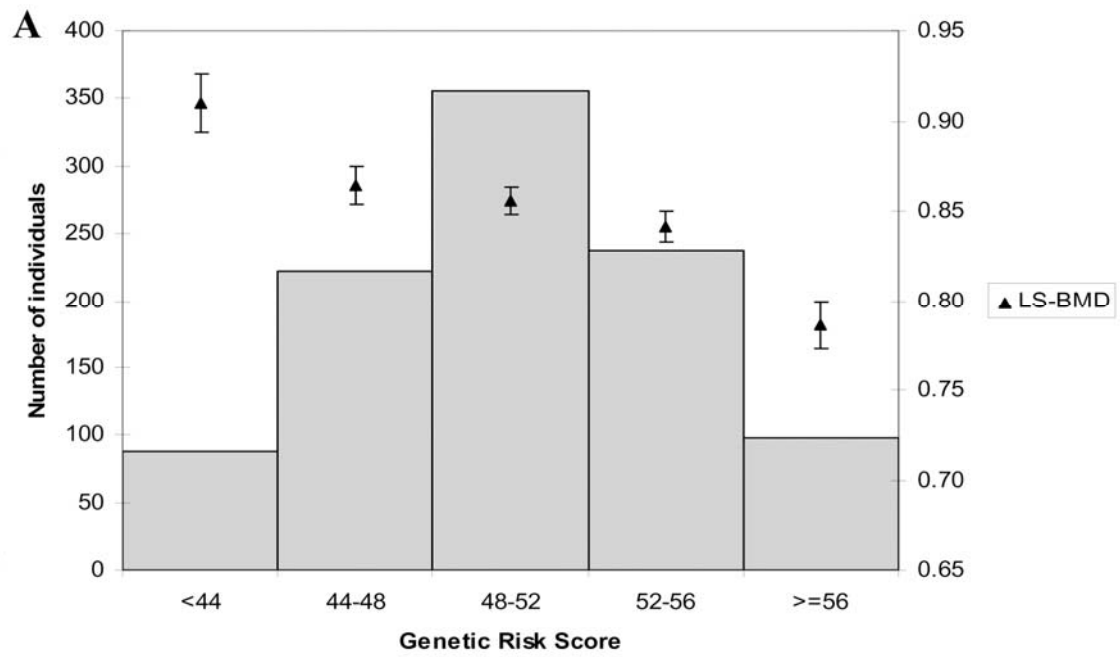


Figure 1. Distributions of genetic risk scores among 1001 BARCOS individuals (A) and 11 HBM probands (B), and their relationships with BMD or Z-score values, respectively. Histograms describe counts of individuals in each genetic score category (left axis scale); (A) Triangles (right axis scale) represent LS-BMD means and vertical bars depict their standard errors; (B) Diamonds represent mean Z-score values. (C) Pedigree of family HBM9. Arrow indicates the proband HBM9; filled symbols represent presence of the HBM phenotype; numbers below symbols denote sum Z-scores; NA: not available.

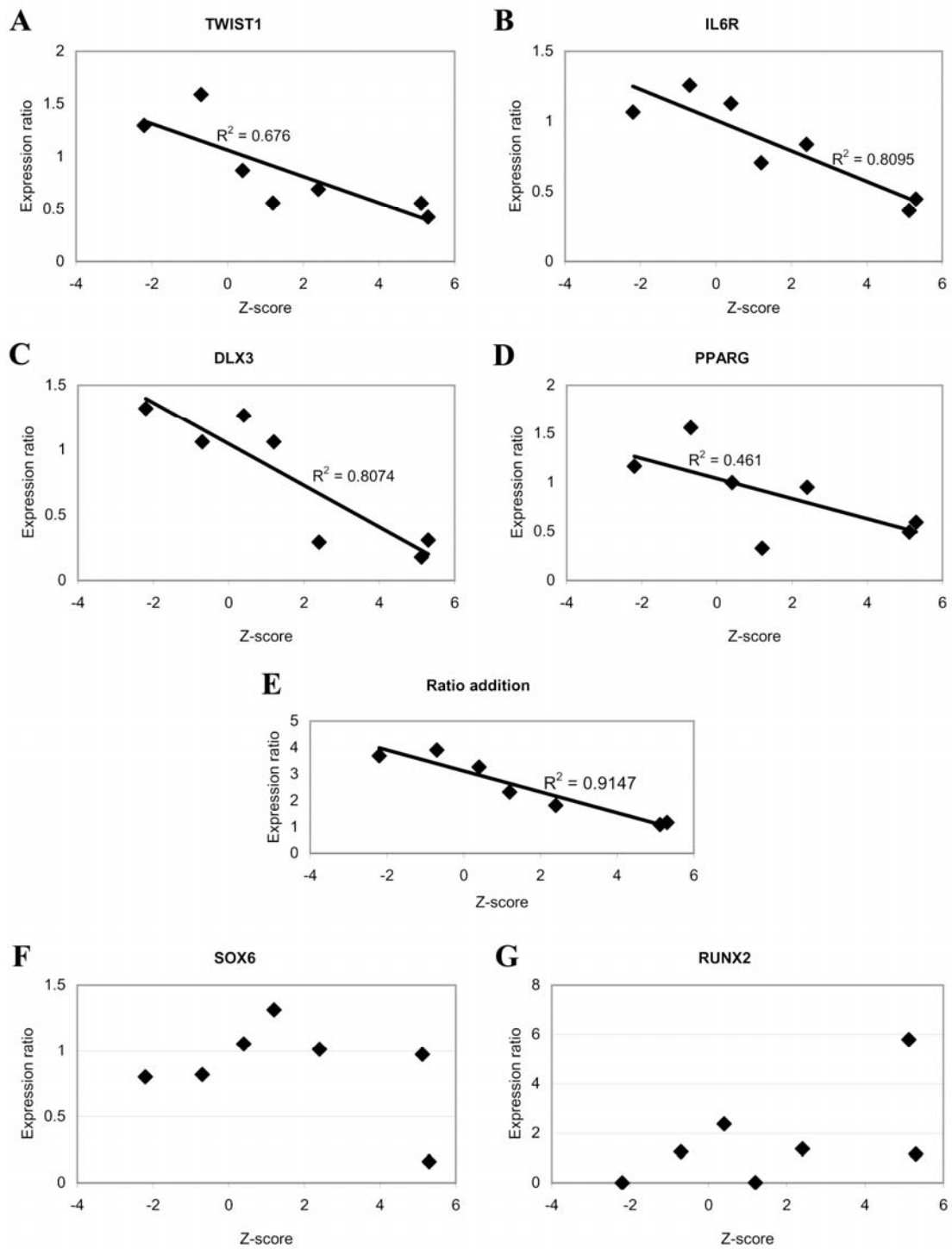


Figure 2. Analysis of mRNA levels of several candidate genes in relation to BMD levels. (A-E) Correlation analysis of Z-score values and gene expression levels of (A) *TWIST1*, (B) *IL6R*, (C) *DLX3*, (D) *PPARG* and (E) the addition of *TWIST1*, *IL6R* and *DLX3*; R^2 is the coefficient of determination. (F) One of the HBM samples presented an expression level of *SOX6* 5-fold decreased in relation to the mean of five control

individuals. (G) The other HBM sample presented an expression level of *RUNX2* that was 6-fold increased.

DISCUSIÓN

I. ANÁLISIS MUTACIONAL Y TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Los resultados presentados en esta tesis constituyen una aportación al estudio de las bases genéticas de dos fenotipos óseos, la osteocondromatosis múltiple y la alta masa ósea. Para ello se ha realizado el análisis mutacional en muestras de individuos que presentan estos fenotipos. Este análisis es uno de los primeros pasos que se deben dar al realizar un estudio genético molecular, ya que por un lado nos permitirá establecer el diagnóstico molecular y por otro posibilita el realizar correlaciones genotipo-fenotipo. El diagnóstico molecular aporta un refuerzo al diagnóstico clínico, permite ofrecer el realizar el diagnóstico molecular a los familiares de los probandos y además el hecho de estimar la progresión del fenotipo y saber cuál será el fenotipo esperado puede orientar sobre cómo tratar la enfermedad. En el caso de patologías como la MO heterogéneas fenotípica y genéticamente, establecer estas relaciones genotipo-fenotipo es complicado. En nuestro estudio hemos tratado de establecer estas correlaciones con el fin de mejorar el diagnóstico y la estima de la progresión de la patología en los pacientes. En el caso de rasgos como la HBM en los que hay un porcentaje más alto de individuos afectados en los que no se conocen todos los factores genéticos implicados, el realizar un análisis mutacional de genes candidatos, que permita determinar la causa genética y su correlación con el fenotipo, posibilita el avance en el conocimiento y caracterización de estos rasgos.

Otro de los puntos importantes de los análisis mutacionales es que permite informar y ayudar a los pacientes a entender su enfermedad. El poder informarles de la mutación que tienen y del mecanismo de acción de ésta si se conoce, les brinda el consuelo que transmite el conocimiento. Además, en las familias en que se haya identificado la mutación causal, se puede ofrecer la posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal si fuera oportuno o un diagnóstico de portadores.

Las técnicas de diagnóstico molecular utilizadas para realizar el análisis mutacional en la MO y la HBM han sido la amplificación y secuenciación automática de ADN (basada en la técnica de Sanger), además de la técnica de MLPA (del inglés *multiplex ligation-dependent probe amplification*; amplificación múltiple dependiente de la ligación de sondas) para detectar diferencias de dosis génica en el caso de la MO. La técnica de secuenciación de Sanger es el método de secuenciación que se ha utilizado de forma generalizada en los últimos 20 años. En su versión automática actual permite secuenciar 96 o 384 muestras a la vez, de unas mil bases de longitud cada una aunque su preparación sigue siendo un procedimiento manual, se usa gran cantidad de reactivos. En los últimos años se han desarrollado técnicas de secuenciación de alto rendimiento (*high-throughput*) capaces de generar cientos de miles de reacciones de secuencia en paralelo, gracias a la inmovilización de las reacciones en una superficie sólida, y de esta forma minimizar la cantidad de reactivos necesarios y la mano de obra. Otra de las ventajas de las técnicas de nueva generación es que con el desarrollo de la tecnología se están reduciendo los costes, aumentando la longitud de las secuencias leídas y algunos de los últimos avances (*third generation sequencing technologies*) están enfocados en la secuenciación directa de una única molécula larga de ADN (o ARN), en algún caso sin necesidad de reacciones de síntesis. Se está trabajando en la mejora de su efectividad y su validación como técnica de diagnóstico, pudiéndose llegar a usar de rutina como técnica molecular en el diagnóstico genético. También se están realizando técnicas de secuenciación de exoma o de regiones concretas del genoma como método diagnóstico más rápido y barato que la secuenciación de todo el ARN. Los principales inconvenientes de estas nuevas tecnologías es que se necesitan potentes herramientas informáticas para el análisis de los resultados debido a la enorme cantidad de información que se obtiene con la secuenciación masiva y que el tiempo necesario para procesar una muestra puede llegar a los 7 días según la técnica, pero con el avance tecnológico esto dejará de ser un problema. Cuando se comenzó el estudio molecular presentado en esta tesis,

las técnicas de secuenciación de alto rendimiento todavía estaban en desarrollo y tenían un alto coste, por tanto se eligió la secuenciación clásica de Sanger como método para realizar el análisis mutacional tanto en la MO, como en la HBM. Por otro lado, en el caso del diagnóstico molecular de la MO que en un principio se basa en el análisis de genes concretos y más bien cortos, se sigue utilizando el método de Sanger para su secuenciación.

La secuenciación Sanger nos permite detectar mutaciones puntuales, además de pequeñas inserciones y deleciones, que son los tipos de mutaciones predominantes. Sin embargo, las grandes deleciones, que tienen cierta frecuencia en la MO, no se pueden descubrir mediante esta técnica. Alternativamente, se dispone de la técnica de MLPA que permite que en una misma reacción se pueda detectar un número anormal de copias de hasta 50 secuencias genómicas distintas. Brevemente, la técnica de MLPA se basa en una primera reacción de unión-ligación de sondas a la zona homóloga de interés; sólo las sondas que se hayan hibridado podrán ser ligadas, y posteriormente amplificadas por PCR. Mediante un análisis cuantitativo de fragmentos y aprovechando las diferencias de tamaño entre cada una de las sondas, se podrán identificar aberraciones en el número de copias genómicas.

Se eligió la técnica de la MLPA por sus ventajas frente a otras técnicas para la detección del número de copias genómicas. La técnica de *Southern blot* permite identificar y diagnosticar grandes reorganizaciones pero no siempre detecta pequeñas deleciones y además es una técnica más laboriosa y requiere una gran cantidad de ADN genómico, de alrededor de 3 órdenes de magnitud más que la MLPA. La ventaja de la MLPA frente a la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es que además de ser una técnica múltiplex, también permite identificar aberraciones pequeñas (50-70 nt) que no serían detectadas por la hibridación *in situ*. Comparada con la hibridación genómica comparada sobre *array* (*array CGH*, del inglés *microarray-based comparative genomic hybridisation*), la MLPA es una técnica de bajo coste, que requiere poco equipamiento y es sencilla de realizar. Además, la MLPA tiene

un alto rendimiento ya que requiere muy poco ADN y se pueden analizar hasta 96 muestras simultáneamente. Asimismo, en el caso concreto de la MO, existe un kit comercial que permite el análisis simultáneo de todos los exones de los dos genes causantes de la enfermedad, lo que acelera el análisis del número de copias y proporciona una gran reproducibilidad a la técnica.

II. OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE

Aunque la osteocondromatosis múltiple se conoce desde hace mucho tiempo y se han realizado numerosos estudios, todavía quedan bastantes preguntas sin resolver. En esta tesis se presentan los resultados del análisis genético realizado tanto en pacientes latinoamericanos como en españoles. Es el primer paso que hay que dar a la hora de investigar la MO en estas poblaciones, ya que en ninguna de ellas se habían caracterizado antes las mutaciones de pacientes con esta enfermedad.

1. FRECUENCIAS MUTACIONALES DE *EXT1* Y *EXT2*

Los datos obtenidos en el estudio genético realizado en los pacientes españoles y latinoamericanos en cuanto a la proporción de mutaciones encontradas en *EXT1* frente a las encontradas en *EXT2* están en consonancia con lo publicado anteriormente. De los 37 pacientes españoles a los que se les encontró la mutación causal, en el 78% ésta se encontraba en *EXT1*, mientras que en el 22% restante estaba en *EXT2*. Un resultado similar al de los pacientes latinoamericanos, de los que el 72% de las mutaciones identificadas se encontraban en *EXT1*, y el 28% en el gen *EXT2*. En el mayor estudio de pacientes de MO publicado hasta la fecha (Pedrini et al., 2011), el 72% de las mutaciones detectadas se encontraban en *EXT1* y el 28% en *EXT2*, al igual que en el de Signori et al. (2007). En otras poblaciones caucásicas estudiadas, e incluso en la población japonesa, la frecuencia mutacional es similar, el 75% de las mutaciones encontradas están en *EXT1* y el 25% en *EXT2* (Francannet et al., 2001; Seki et al., 2001; Jennes et al., 2008; Stancheva-Ivanova et al., 2011), con la excepción de las poblaciones inglesa y alemana en las que ambos genes están mutados en la misma proporción (Lonie et al., 2006; Heinritz et al., 2009), y a diferencia de la población china, en la que la mayoría de los pacientes de MO tienen mutado el gen *EXT2* (Xu et al., 1999; Kang et al., 2012). Estas diferencias en la proporción de mutaciones entre ambos genes podrían

deberse, en algún caso, a un tamaño muestral pequeño. Por ejemplo, los trabajos de Xu et al. (1999) y Kang et al. (2012) en la población china describen mutaciones en 17 y 9 pacientes respectivamente. Convendría analizar mayor número de pacientes para obtener datos más fiables.

En cuanto al tipo de mutaciones que dan lugar a la MO, los datos obtenidos tanto en pacientes españoles como latinoamericanos coinciden con los publicados hasta la fecha. Independientemente de la población que se analice, la gran mayoría de las mutaciones (alrededor del 80%) en *EXT1* y *EXT2* son de pérdida de función, es decir, mutaciones *nonsense*, *frameshift* y de *splicing*, y sólo una pequeña proporción son mutaciones *missense* (Xu et al., 1999; Wuyts y Van Hul, 2000; Francannet et al., 2001; Seki et al., 2001; Lonie et al., 2006; Signori et al., 2007; Jennes et al., 2008; Heinritz et al., 2009; Pedrini et al., 2011; Stancheva-Ivanova et al., 2011).

Todas las mutaciones *missense* encontradas en los pacientes españoles y latinoamericanos se encuentran en el gen *EXT1*. A pesar de la gran heterogeneidad mutacional, la mayoría de estas mutaciones *missense* se localizan alrededor del aminoácido Arg340, un *hot spot* mutacional de dicho gen. Se ha confirmado que este aminoácido, es crucial para el correcto funcionamiento de la proteína exostosina 1, ya que mutaciones en el codón 340 dan lugar a la pérdida de función en la síntesis del HS (Jennes et al., 2009). Otro *hot spot* en *EXT1* para mutaciones de tipo *frameshift* es el codón Leu490. Mutaciones en este codón son la causa de la MO en el 7% de los pacientes con mutaciones en *EXT1*, a nivel mundial. Estos datos coinciden con los presentados en esta tesis, ya que tres (7,3%) de nuestros pacientes españoles y latinoamericanos con *EXT1* mutado tienen deleciones en c.1468 y c.1469, que afectan al aminoácido Leu490. Estos nucleótidos se encuentran localizados después de una secuencia de polipirimidinas que ya se sabe que son *hot spots* mutacionales (Jennes et al., 2009).

En cuanto a la distribución de las mutaciones en los genes, en los pacientes españoles se encuentran a lo largo de todo *EXT1* y hasta el exón 8 de *EXT2*. En los pacientes latinoamericanos las mutaciones de *EXT1* se circunscriben en los primeros 8 exones, mientras que en el gen *EXT2* las mutaciones puntuales se localizan en los primeros 10 exones y hay un caso con una deleción grande que abarca del exón 4 hasta el final del gen por lo menos. La distribución de las mutaciones tanto en *EXT1* como en *EXT2* coincide con estudios previos (Jennes et al., 2009). Las mutaciones en *EXT2* tienden a acumularse en la primera región del gen correspondiente a la región N-terminal de la proteína. Como se ha dicho anteriormente, esto no parece lógico puesto que la parte C-terminal de la proteína exostosina 2 es la que está altamente conservada, por lo que se supone que esta región tiene una importancia funcional mayor (Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996). En el proyecto 1000 genomas se describen cambios a lo largo de todo el gen *EXT2* incluyendo los últimos exones. La densidad de cambios en la región que incluye a los últimos 3 exones del gen es menor que en el resto del gen y en general son SNP intrónicos y/o con una frecuencia del alelo minoritario muy pequeña. Una posible explicación es que la mayoría de las mutaciones en la región 3' del gen *EXT2* sean deletéreas y por eso no las encontramos en los pacientes de MO ni en la población general. En relación a la nueva deleción encontrada en un paciente latinoamericano y el hecho de que no se hayan descrito otras mutaciones como ésta puede deberse a que para detectarlas hay que realizar un análisis de MLPA y esta técnica se ha empezado a utilizar de forma rutinaria en los últimos años.

En cuanto a las grandes deleciones en *EXT1* y *EXT2*, ya sean de todo el gen o de algún exón, son la causa de la MO en el 14% y el 17% de los pacientes españoles y latinoamericanos respectivamente, que tienen caracterizada la mutación causal. El porcentaje es un poco más alto que lo descrito anteriormente (Signori et al., 2007; Jennes et al., 2008; Pedrini et al., 2011; Stancheva-Ivanova et al., 2011). Esto puede deberse a las mejoras en la técnica

empleada (MLPA), ya que en un principio se usaba la MLPA de dos colores (usaba 2 fluorocromos distintos) en la que había que diseñarse las sondas específicas para cada exón (Signori et al., 2007) y en los últimos años se usa un kit comercial de MLPA, más estandarizado (Jennes et al., 2008; Stancheva-Ivanova et al., 2011). Por otro lado, el uso de esta técnica ha permitido mejorar la eficiencia en la detección de mutaciones, reduciendo el número de pacientes a los que no se les había detectado la mutación, pasando de una media aproximada de 28% (Xu et al., 1999; Francannet et al., 2001; Seki et al., 2001; Lonie et al., 2006; Heinritz et al., 2009) con un mínimo de 4,3% (Heinritz et al., 2009) y un máximo de 52,8% (Xu et al., 1999), a una media alrededor del 11% (Signori et al., 2007; Jennes et al., 2008; Pedrini et al., 2011; Stancheva-Ivanova et al., 2011) con un mínimo de 4% (Signori et al., 2007) a un máximo de 24% (Jennes et al., 2008). Por tanto, la cantidad de pacientes a los que no se les ha identificado la mutación causal se ve reducida más de la mitad al incorporar la técnica de MLPA.

Recopilando lo dicho anteriormente, la mayoría de las mutaciones causantes de MO son de pérdida de función y la mayoría de las mutaciones *missense* aquí descritas afectan a la funcionalidad de la proteína exostosina 1. Esto parece indicar que los pacientes sólo tienen media dosis de proteína activa en comparación con los individuos sanos y por tanto el mecanismo patogénico sería de haploinsuficiencia. Esta hipótesis se vería reforzada por el hecho de que pacientes mosaico también desarrollan la enfermedad, a pesar de que algunas de sus células tienen las dos copias de la proteína, ciertas células sólo tienen media dosis de la proteína y aún así desarrollan MO.

2. CORRELACIONES FENOTIPO-GENOTIPO

Para realizar una correlación fenotipo-genotipo útil hay que tener una buena clasificación fenotípica y un correcto genotipado. Lo primero es complicado ya que, como se ha mencionado anteriormente, la MO manifiesta

una gran heterogeneidad en el fenotipo, incluso dentro de una misma familia, así como una enorme heterogeneidad alélica, siendo la mayoría de las mutaciones particulares de un individuo o pedigrí. La variabilidad fenotípica incluye la estatura, el número, tamaño y localización de los osteocondromas, el número de huesos afectados y el grado de severidad de las deformaciones y las limitaciones funcionales. El hecho de que haya tantas mutaciones distintas supone una mayor dificultad para encontrar grupos de pacientes con la misma mutación para poder establecer relaciones con el fenotipo. Todo esto hace que éste sea un punto especialmente conflictivo.

Distintos autores usan diversas clasificaciones fenotípicas (Francannet et al., 2001; Porter et al., 2004; Alvarez et al., 2006; Jennes et al., 2008; Pedrini et al., 2011), por tanto es difícil sacar conclusiones sobre el fenotipo general con el que se manifiesta la MO y dificulta las comparaciones entre los distintos estudios publicados (Tabla 2). De todas ellas, la clasificación más sencilla y más estándar es la de Pedrini (2011) y por eso nos hemos basado en ella para realizar nuestro estudio fenotípico en los pacientes españoles.

Tabla 2. Resumen de las características fenotípicas a tener en cuenta según distintos autores.

	Francannet, 2001	Porter, 2004	Alvarez, 2006	Jennes, 2008	Pedrini, 2011
Dolor	X				
Deformidad de las extremidades	X	X	X	X	X
Longitud de las extremidades			X		
Edad de aparición de la MO	X				
Nº de exostosis	X	X	X		X
Tamaño de las exostosis			X		
Localización vertebral	X				
Estatura	X	X		X	
Nº de operaciones		X			
Funcionalidad		X			X
Pedunculada/ Sésil			X		
Proximal/ Distal			X		

Nº de lugares afectados	X
Complicaciones secundarias	X

Además de todo esto, hay que tener en cuenta que los casos menos graves que no cursan con dolor o limitaciones funcionales, serán asintomáticos y por tanto no estarán incluidos en los estudios, así que estaremos "perdiendo" aquellos pacientes que corresponderían a los niveles menos graves en la clasificación fenotípica. Si esto fuera así, la correlación fenotipo-genotipo estaría incompleta, ya que nos faltarían datos, tanto fenotípicos como genéticos, de los afectos más leves. Este hecho podría justificar que algunos autores describan un mayor ratio de varones afectos que de mujeres (Krooth et al., 1961; Wicklund et al., 1995; Legeai-Mallet et al., 1997; Francannet et al., 2001; Faiyaz-Ul-Haque et al., 2004), si la razón fuera que las mujeres tienen una mayor tolerancia al dolor y por tanto sólo se registrarán los casos más severos. Otra hipótesis que se baraja como explicación a estas diferencias en el ratio entre mujeres y hombres es que en las mujeres la penetrancia es menor debido a que las hormonas sexuales, factores modificadores relacionados con el cromosoma X y los factores de crecimiento tengan un efecto protector en la modulación del mecanismo molecular de la MO en las mujeres (Legeai-Mallet et al., 1997; Faiyaz-Ul-Haque et al., 2004; Stancheva-Ivanova et al., 2011) dando un fenotipo más suave y más fácil de pasar por alto.

Los datos de nuestro estudio muestran que la proporción de hombres es mayor que la de mujeres tanto en pacientes latinoamericanos (59% y 41% respectivamente) como en pacientes españoles (62% y 38% respectivamente). Estos resultados concuerdan con el mayor ratio de varones afectos que de mujeres, expuesto anteriormente. En cuanto a la correlación fenotipo-genotipo según el gen mutado, en los pacientes latinoamericanos no se encontraron diferencias en el grado de severidad. En cuanto a los pacientes españoles, entre los que tenían mutado *EXT2* había una mayor proporción de

pacientes con una clínica más grave (clase III) mientras que los que tenían el gen *EXT1* mutado pertenecían mayoritariamente a las clases I y II. Ambas poblaciones tienen menor número de pacientes con mutaciones en *EXT2* que en *EXT1* y ninguna de las de *EXT2* son mutaciones *missense*. Por tanto dada la similitud en el porcentaje de pacientes con mutaciones en uno u otro gen, estas diferencias en la correlación podrían deberse a la clasificación fenotípica usada en cada población. Para caracterizar el fenotipo de los pacientes latinoamericanos se usó la clasificación de Francanet (2001), mientras que los pacientes españoles se empezaron a catalogar más tarde y había aparecido una nueva escala que nos pareció más adecuada y por tanto se usó la clasificación propuesta por Pedrini (2011) (Tabla 2). En relación al tipo de mutación, en los pacientes españoles también se ha detectado que los que tienen mutaciones *missense* tienen significativamente menos osteocondromas que los que tienen otro tipo de mutaciones. Esta menor gravedad podría explicarse si en el caso de las proteínas mutadas por un cambio de aminoácido quedara algo de actividad residual que produjera una pequeña cantidad de HS. Esto está en consonancia con el modelo sugerido por Berger et al. (2001) en relación a los supresores tumorales, según el cual la función del producto génico puede mostrar un rango continuo de valores y no niveles discretos (0, 50%, 100%), relacionados con el número de copias (Berger et al., 2011).

Otra característica que hemos detectado tanto en pacientes españoles como en latinoamericanos es la anticipación. Éste es un aspecto de la variabilidad intrafamiliar que existe en la MO, ya que dentro de una misma familia, cuyos miembros tienen la misma mutación causal, los padres tienen un fenotipo menos severo que sus hijos. Esto coincide con lo expuesto por Francanet (2001) y Pedrini (2011). Este último estudio además apunta que los hijos varones tienen un fenotipo más severo que sus progenitores, especialmente cuando heredan la enfermedad de la madre, en contraposición las hijas que heredan la MO del padre tienen una clínica menos severa. En

nuestro estudio este punto no se pudo comprobar ya que el tamaño muestral era reducido y los distintos subgrupos eran pequeños. De momento no hay datos para explicar la variabilidad fenotípica dentro de una familia o causada por la misma mutación, pero podría deberse al efecto de polimorfismos, a genes modificadores o a factores hormonales. Está claro que hay factores ambientales o genéticos, adicionales a las mutaciones en los genes *EXT*, que contribuyen al fenotipo final y que dan lugar a las diferencias en las manifestaciones fenotípicas dentro de una misma familia.

3. CASOS EN LOS QUE NO SE HA ENCONTRADO LA MUTACIÓN CAUSAL

Ya hemos mencionado con anterioridad que en todos los estudios de exostosis queda un cierto porcentaje de pacientes cuya mutación no ha sido identificada, lo que da lugar a que se planteen varias hipótesis al respecto y es una pregunta que aún queda por resolver. Entre las diferentes explicaciones está la posible existencia de un tercer locus *EXT3*, que en un principio se creyó que podría estar localizado en el cromosoma 19p según unos estudios de ligamiento, pero que ahora se cree que se trata de un resultado falso positivo (Jennes et al., 2009). Otras posibles opciones para este tercer locus son genes candidatos funcionales como *EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3*, *SDC2*, *SDC3*, y *PTHR1*. Sin embargo, fueron analizados por Lonie et al. (2006) en la población británica sin que se encontraran mutaciones en ninguno de ellos y fueron descartados como genes causales de la MO, al menos en dicha población.

Otra posible explicación es que las mutaciones realmente estén en los genes *EXT1* y *EXT2* y que no seamos capaces de detectarlas o bien porque sean mutaciones puntuales en mosaico, o que se encuentren en las regiones no analizadas como las zonas profundas de los intrones, las regiones 5'UTR y 3'UTR o las regiones promotoras. Sin embargo un estudio sugiere que ni las regiones 5'UTR y 3'UTR ni las promotoras son una causa frecuente de MO ya

que no se encontraron mutaciones en dichas zonas de *EXT1* ni de *EXT2* en los pacientes analizados (Lonie et al., 2006). Por otro lado, los métodos que se usan para detectar mutaciones no revelan cambios que afectarían a la estructura del gen sin cambiar su secuencia o dosis, como los cambios epigenéticos y las translocaciones. Para detectar este tipo de mutaciones se deberían usar otras técnicas más apropiadas como el cariotipado, el pintado cromosómico o el *array* CGH. Un estudio reciente ha revelado un nuevo mecanismo causal de la MO debido a un rearrreglo complejo consistente en la inserción de una región duplicada en un intrón de *EXT1* parcialmente deletado detectada mediante *array* CGH (Waaijer et al., 2013). Además de lo dicho anteriormente en relación a los pacientes con MO a los que no se les ha identificado la mutación causal, existe la posibilidad de que el mecanismo de inactivación de los genes *EXT* sea epigenético, postraduccional, o mediante un micro- o pequeño-ARN que regule negativamente su expresión (Jones, 2011).

Para dar respuesta a estas incógnitas y para ampliar el conocimiento sobre la MO y el desarrollo de los osteocondromas, se debería hacer un análisis más exhaustivo, en los pacientes sin mutación conocida en *EXT1* o *EXT2*, analizando sus regiones promotoras y UTRs, realizando un análisis cuantitativo de su ARN mediante la PCR de tiempo real, comprobando que no tengan regiones de *splicing* anormales secuenciando el ARN de los genes *EXT* y buscando mutaciones en otros genes candidatos como los *EXTL* o los genes que codifican proteínas de la vía de Hh. También mediante un estudio completo de las células de los osteocondromas, de cualquier paciente de MO, cuantificando el HS y comparando estos datos entre pacientes con distintas mutaciones, pacientes sin mutación y muestras control, realizando *western blots* de las proteínas exostosina 1 y 2, analizando su expresión, su perfil de micro- y pequeños-ARNs y comparando estos valores con células cartilagosas normales.

4. MODELO CELULAR DE OSTEOCONDROMATOSIS MÚLTIPLE

Uno de los siguientes posibles pasos en la investigación de la MO, una vez realizado el estudio genético a los pacientes, sería la creación de un modelo celular. El modelo nos permitiría representar *in vitro* los aspectos fisiológicos o patológicos de la condrogénesis, y aportaría nueva información para comprender el funcionamiento normal o anormal de los genes *EXT* y a través de qué mecanismos celulares causan finalmente el fenotipo de MO. Conocer el mecanismo molecular que va de la síntesis del HS a la formación de osteocondromas permitiría dar respuesta a algunas de las preguntas sobre la MO que aún quedan por resolver.

Teniendo esto en cuenta, en nuestro grupo abordamos el desarrollo de un modelo celular condrocítico en el que la expresión de *EXT1* fuera nula o estuviera reducida al 50% y compararlo con condrocitos normales y valorar su respectiva capacidad de síntesis del HS. De esta forma pretendíamos analizar cómo afectaba la pérdida de un alelo a la concentración de HS así como el efecto de la alteración de la concentración de HS a la condrogénesis, estudiar la estructura y tamaño de la cadena de HS en el modelo en el que la mitad de las células tuvieran inhibida su síntesis, además de investigar la expresión de genes de la familia *EXT*, su ARN y expresión proteica en las distintas condiciones de HS. Otro aspecto que se quería estudiar era la expresión de distintas proteínas implicadas en la vía de síntesis del HS, la vía de señalización mediada por el HS, la vía de Hedgehog, y estudiar las enzimas implicadas en la regulación y degradación del HS.

Para ello, se disponía de la línea celular osteoblástica hFOB 1.19 (del inglés *human fetal osteoblast*, osteoblastos fetales humanos) (ATCC, Manassas, VA, USA). Esta línea, procedente de osteoblastos fetales inmortalizados, conserva ciertas capacidades de pluripotencia, lo que, según un estudio, le permite diferenciarse tanto a osteoblastos como a condrocitos y adipocitos en las

condiciones adecuadas (Yen et al., 2007). Se pretendía inhibir la expresión de *EXT1* en un grupo de células totalmente y en otro al 50% para luego diferenciarlas y obtener así un modelo condrocítico con la expresión de *EXT1* alterada. El primer paso en este proyecto era lograr una buena diferenciación de esta línea a condrocitos. Lamentablemente después de una serie de pruebas las células no se consiguieron diferenciar a condrocitos. Por otro lado, sólo un grupo ha descrito la capacidad de las células hFOB de diferenciarse a condrocitos (Yen et al., 2007). Debido al tiempo limitado del que se disponía para la realización de la presente tesis doctoral, la creación del modelo celular de MO no se ha podido desarrollar como parte de esta tesis. Se reevaluó este objetivo, planteando la búsqueda de un modelo alternativo más adecuado. En este sentido, nuestro grupo está actualmente estableciendo varios modelos celulares mediante el uso de células iPSS, lo que supone una mejor alternativa. Esperamos retomar este objetivo en un futuro próximo.

III. ALTA MASA ÓSEA

1. EL ESTUDIO DE LA ALTA MASA ÓSEA PARA AVANZAR EN EL ESTUDIO DE LA OSTEOPOROSIS

La osteoporosis es la enfermedad esquelética más común. Es una enfermedad generalizada del esqueleto caracterizada por una masa ósea baja, alteraciones en la microarquitectura del hueso y un aumento de su fragilidad que deriva en un mayor riesgo de sufrir fracturas (WHO, 2003). La resistencia a la fractura está determinada en gran medida por la resistencia ósea y su calidad. La resistencia ósea se puede medir a través de la DMO, siendo el principal factor de predicción de fracturas osteoporóticas. La etiología de la osteoporosis es multifactorial, debida tanto a factores genéticos como ambientales, aunque existen algunas formas de herencia mendeliana simple, como la debida a mutaciones en los genes *ESR1* y *LRP5* (Janssens y Van Hul, 2002; Ioannidis et al., 2004). El gen *LRP5*, como ya se ha dicho, es un buen ejemplo por un lado de la etiología monogénica de la osteoporosis, debido a que determinadas mutaciones que provocan la pérdida de su función pueden causar el síndrome de osteoporosis pseudoglioma (Gong et al., 2001). Por otro lado, *LRP5* también está implicado en el carácter complejo de la osteoporosis, ya que se ha visto que variaciones comunes en este gen están asociadas con la osteoporosis y el riesgo de fractura (Agueda et al., 2008; van Meurs et al., 2008; Estrada et al., 2012).

De acuerdo con esto, la osteoporosis y la HBM son dos fenotipos opuestos, situados en los extremos de la distribución normal de la DMO en la población general. A pesar de ello, ambos tienen varias cosas en común: están determinados por la DMO y en ambos casos existen formas monogénicas y formas complejas del fenotipo. El estudio de las bases genéticas del fenotipo de HBM puede ser una buena estrategia para identificar nuevos genes implicados en el metabolismo y homeostasis ósea. A su vez, estos nuevos

descubrimientos podrían apuntar hacia nuevas terapias contra la osteoporosis.

2. ALTA MASA ÓSEA ¿MONOGÉNICA, COMPLEJA O AMBAS?

En un principio la alta masa ósea se ha definido como un carácter monogénico autosómico dominante, sin embargo los resultados presentados en esta tesis apoyan la idea de que en algunos casos pueda ser multifactorial, similar a lo que ocurre en la mayoría de casos de osteoporosis. Mientras en algunos individuos presenta una forma monogénica, debida principalmente a mutaciones en el gen *LRP5* en otros pacientes parece tener una etiología compleja determinada por varios factores.

Al estudiar la prevalencia de la HBM en la población general se ha observado que ésta es del 0,6% en la población española (cohorte BARCOS), y de 0,2% en la población de Reino Unido (Gregson et al., 2012). Estas variaciones pueden deberse a las diferencias de los diseños experimentales, como por ejemplo en la definición de HBM. Gregson et al. definen la HBM como (a) el valor de *Z-score* L1 \geq +3,2 más el *Z-score* total de cadera $>$ +1,2; o (b) el valor de *Z-score* total de cadera \geq +3,2 más el de *Z-score* L1 $>$ +1,2; mientras que en nuestro estudio, como ya se ha comentado, hemos definido la HBM como *Z-score* total (la suma del *Z-score* lumbar (L1-L4) y del *Z-score* de cadera) $>$ 4 (Little et al., 2002). Sin embargo, siendo rigurosos en ninguno de los dos casos se puede considerar esta prevalencia como representativa de la población general ya que los individuos a los que se les realiza una DXA pueden estar sesgados por factores como la edad o problemas de salud, etc. Para tener datos más ajustados a la realidad, se debería elegir un grupo de individuos de la población general, realizarles medidas de DMO mediante DXAs y obtener los valores de *Z-score*.

En ese mismo estudio (Gregson et al., 2012) realizado en la población de Reino Unido, analizaron la DMO en los parientes de los individuos con HBM y

vieron que el 40% de los familiares tenía valores de DMO en el rango de HBM, lo que sugiere que la HBM es un rasgo genético. Además la distribución de la DMO de estos familiares no era bimodal, como se esperaría si la HBM fuese un fenotipo causado por un factor monogénico altamente penetrante. Estos datos apuntan a que existe una base genética para este fenotipo, sin resolver por completo si esta causa es monogénica o compleja.

Cuando se empezó a estudiar la HBM se describió como un fenotipo autosómico dominante, ligado al cromosoma 11, causado por mutaciones en el gen *LRP5* (Johnson et al., 1997; Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Sin embargo, tanto los resultados presentados en esta tesis como los publicados recientemente por otros autores (Gregson et al., 2012) muestran que sólo se ha conseguido identificar la mutación causal en menos del 2% de los casos de HBM. En nuestro estudio, además de los exones de *LRP5* que codifican el primer β -*propeller* también analizamos los exones que codifican los β -*propellers* tercero y cuarto ya que son los lugares de unión del inhibidor DKK1, según se ha descrito (Zhang et al., 2004). De las 13 mujeres con HBM analizadas en el presente trabajo ninguna presentaba mutaciones en las regiones analizadas del gen *LRP5*.

De acuerdo con la hipótesis planteada según la cual la HBM podría deberse a problemas en la unión del inhibidor DKK1 al co-receptor LRP5, se decidió secuenciar el gen *DKK1* en nuestro grupo de mujeres con HBM. En una de ellas se encontró la mutación *missense* p.Y74F. La región del gen donde se encuentra situado este cambio no codifica a ninguno de los dominios proteicos relevantes descritos en DKK1, por tanto no se sabe si puede llegar a afectar a la funcionalidad de la proteína. Este cambio se analizó con los programas Polyphen y Sift que predicen el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de la proteína. Para la mutación p.Y74F las predicciones de estos programas fueron "benigna" (0,38) y "tolerada" (0,68), respectivamente. Dado que estos programas se basan en predicciones *in silico*, sus predicciones son orientativas y deben ser

consideradas con prudencia. Por ejemplo, en un estudio sobre el síndrome Miller se descartó una serie de cambios de aminoácidos que Polyphen predijo como "benignos" y después se demostró que uno de ellos era el cambio patogénico (Ng et al., 2010). Muy recientemente, se ha podido estudiar la cosegregación del cambio p.Y74F en la familia, gracias a la colaboración de una hija con HBM ($Z\text{-score} = 4,9$) y un hijo con una DMO dentro del rango normal ($Z\text{-score} = 0,5$). Al obtener los datos del genotipo de la mutación de DKK1 se vio que la hija HBM tenía la misma mutación que la madre, mientras que el hermano no afecto no presentaba la mutación. Es decir, que en esta familia la mutación *missense* p.Y74F cosegrega con la enfermedad. El siguiente paso es intentar obtener más información en relación a la posibilidad de que este cambio sea la causa del fenotipo HBM. Se pueden realizar pruebas funcionales, por ejemplo habría que comprobar si esta mutación impide que DKK1 realice su función inhibidora de LRP5 favoreciendo que la vía de Wnt esté continuamente activa.

Llegados a este punto, a la gran mayoría de los individuos HBM estudiados no se les había encontrado la mutación causante de su fenotipo ni en el gen *LRP5* ni en *DKK1* (con la excepción discutida en el párrafo anterior), así que se decidió abordar la investigación desde un nuevo enfoque. Ya que la HBM se trata de un fenotipo que se define a través del valor de $Z\text{-score}$ de la DMO y dado que la DMO es un carácter poligénico, se puede suponer que la HBM también tendrá cierto rasgo de fenotipo complejo. Es decir, si en la población general el tener la DMO baja está determinado por una serie de SNPs con alelos que aumentan ese riesgo, la hipótesis que hay que probar es que los individuos con HBM serán portadores de un menor número de dichos alelos de riesgo que la media de la población. Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados que hemos obtenido del análisis de los 55 loci autosómicos descritos como asociados a la DMO, en un estudio de GWA (Estrada et al., 2012). Este trabajo de Estrada et al. (en el que ha participado la cohorte BARCOS) ha identificado 56 loci (32 de ellos nuevos) asociados a la DMO, lo

que subraya el carácter poligénico de la DMO. Este estudio además describe un valor riesgo para cada uno de los 56 alelos asociados a baja DMO. Este valor de riesgo genético junto con la identificación de los 56 loci nos ha brindado la posibilidad de testar nuestra hipótesis de si los individuos con HBM tienen un menor valor de riesgo genético. En nuestro estudio analizamos los 55 loci autosómicos asociados a baja DMO en las mujeres HBM. Los resultados que obtuvimos son coherentes con la hipótesis de que los valores de DMO de los individuos HBM, analizados a través de su *Z-score*, en parte se pueden explicar por el conjunto de los loci analizados. Encontramos una excepción, el individuo con mayor valor de *Z-score* era el que tenía el mayor factor de riesgo genético. El fenotipo de HBM, en su caso concreto, podría deberse a un alelo raro altamente penetrante y protector, que contrarrestaría el efecto aditivo de los alelos de riesgo, como ocurriría en un fenotipo monogénico. Este alelo podría encontrarse en las regiones no analizadas del gen *LRP5*, o en otro gen candidato, por tanto puede ser muy interesante continuar el estudio de este caso empezando por genotipar todos los exones del *LRP5* que faltan. Alternativamente, se puede hacer un análisis de ligamiento en su familia, ya que la madre es también HBM mientras que su hermano mayor no lo es. En caso de no lograr la participación de más individuos de la familia no se tendría suficiente fuerza estadística en los resultados del análisis de ligamiento. Una alternativa sería combinar éste con la secuenciación del exoma y analizar la segregación de las variantes que se encuentren. Por tanto se puede analizar la cosegregación de una serie de genes candidatos con el fenotipo HBM en este pedigrí.

Otra forma de analizar el fenotipo de HBM que nos planteamos fue mediante un estudio transcriptómico en osteoblastos primarios. Este tipo de estudio nos permite obtener datos objetivos de los genes que se expresan en osteoblastos primarios en el tejido óseo de adultos. Gracias a la coordinación y organización de los distintos especialistas implicados pudimos recibir estas muestras. Dichas muestras tienen un gran valor ya que no son fáciles de

conseguir, puesto que es necesaria una intervención quirúrgica para su obtención. Los osteoblastos se cultivaron a partir de huesos de rodillas extraídas en operaciones de reemplazo de las mismas. Las células se cultivaron el tiempo imprescindible para conseguir el suficiente número como para poder realizar los análisis sin que se perdieran sus características de osteoblastos primarios. Disponíamos de muestras de dos casos HBM y de individuos control de los que llegamos a juntar cinco, lo que nos permitió poder realizar comparaciones. La estrategia que se usó para el análisis transcriptómico fue realizar PCR en tiempo real sobre una placa diseñada a medida (Roche *RealTime Custom Panel 384*), es decir que pudimos elegir los genes a analizar. Se optó por esta técnica porque no disponíamos de una gran cantidad de material para un análisis más completo. Es una técnica más moderada que la secuenciación masiva del ARN (RNA-seq) pero que nos proporciona un volumen más manejable de datos sobre los niveles de expresión en las células además de requerir una menor cantidad de muestra, nuestra mayor limitación. Las razones de inclusión en el análisis de los 88 genes fueron diversas, por un lado se eligieron genes implicados en la osteogénesis y/o en la vía de Wnt, y por otro se seleccionaron genes asociados a la DMO y/o a la osteoporosis, basándonos en los artículos más recientes sobre el tema como son los de Estrada et al. (2012), Duncan y Brown (2010) y Li et al. (2010). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los genes *TWIST1*, *IL6R* y *DLX3* correlaciona negativamente con la DMO expresada mediante el *Z-score* y que *PPARG* tiene la misma tendencia sin llegar a ser significativo. Estos genes podrían tener un efecto aditivo en el desarrollo de la HBM ya que si sumamos los niveles de expresión de los tres genes que correlacionan significativamente con la DMO vemos que explican el 91% del valor de *Z-score*. Por otro lado, *RUNX2* y *SOX6* muestran valores de expresión extremos cada uno en uno de los casos HBM, *RUNX2* por exceso y *SOX6* por defecto, con respecto a las muestras control. En cuanto a la función de estos genes, *PPARG*, *RUNX2* y *TWIST1* están implicados en la diferenciación de células madre mesenquimales; *SOX6* estimula la diferenciación de los

condroblastos y la maduración de los condrocitos en las placas de crecimiento; *DLX3* tiene un papel en la formación esquelética; e *IL6R* actúa en procesos proinflamatorios y en la osteoclastogénesis. Todos estos genes, excepto *IL6R*, intervienen en el desarrollo esquelético además de afectar a la DMO en distintos momentos del desarrollo. De acuerdo a estos resultados, estas vías podrían estar implicadas en el fenotipo HBM. Habría que hacer más análisis para comprobar la fiabilidad de estos resultados ya que el tamaño muestral es muy pequeño, pero de confirmarse abriría la puerta a la búsqueda de nuevas terapias frente a la osteoporosis. Por otro lado, si estos valores de expresión de ARN en osteoblastos fueran equivalentes a valores de expresión en linfocitos de sangre periférica, sería una forma no invasiva de comprobar la calidad del hueso.

Todos estos resultados en conjunto parecen indicar que el fenotipo de HBM es un rasgo heterogéneo, cuya genética puede deberse tanto a factores monogénicos y tener una herencia mendeliana simple, como a factores poligénicos de efecto aditivo y ser de herencia compleja.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- El uso combinado de dos métodos complementarios en la búsqueda de mutaciones (detección de la dosis génica y análisis de la secuencia de ADN) ha permitido descubrir la causa de MO en el 95% de los pacientes españoles y en el 83% de los pacientes latinoamericanos analizados.
- Se ha realizado el análisis mutacional en 39 pacientes españoles con MO en el que se ha identificado la mutación causal en 37 de ellos, 29 en *EXT1* y 8 en *EXT2*, 18 de las cuales no habían sido descritas previamente.
- Tras el análisis mutacional en 27 pacientes latinoamericanos con MO y 6 pacientes con SO se ha identificado la mutación causal en 18 pacientes con MO. En los pacientes con SO no se ha encontrado la mutación causal.
- Se ha confirmado que las mutaciones presentes en mosaico también pueden dar lugar a MO.
- El estudio de la correlación fenotipo-genotipo ha permitido determinar que los pacientes españoles con mutaciones *missense* tienen menor número de osteocondromas que los pacientes con otro tipo de mutaciones.
- En los pacientes latinoamericanos no se ha podido establecer ninguna correlación entre el grado de severidad y el gen mutado.
- El fenotipo HBM, de las probandos extraídas de la cohorte BARCOS, no está causado por mutaciones en las regiones analizadas del gen *LRP5*.

- En una probando con HBM se ha identificado un cambio *missense* en *DKK1* (p.Y74F), no descrito previamente, que podría ser la causa del fenotipo.
- En la mayoría de los casos de HBM estudiados, los niveles de DMO se distribuyen inversamente al número de alelos de riesgo de osteoporosis.
- El único caso en el que esto no se cumple es el que presenta el mayor valor de *Z-score* y su alta masa ósea podría explicarse por una variante genética rara y penetrante.
- En el estudio transcriptómico de osteoblastos primarios de 2 dos individuos con HBM y de 5 muestras control se ha observado una correlación negativa entre el valor de *Z-score* y la expresión de *IL6R*, *DLX3*, *TWIST1* y *PPARG*.
- El estudio de expresión en osteoblastos primarios apunta a que tanto un aumento en los niveles de *RUNX2* como una disminución en la cantidad de *SOX6* podrían tener un papel en algunos casos de HBM.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se propone un modelo de heterogeneidad genética para la HBM, en la que hay casos debidos a efectos pequeños y aditivos de diversos genes y otros causados principalmente por mutaciones en un único gen.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Agueda, L., Bustamante, M., Jurado, S., Garcia-Giralt, N., Ciria, M., Salo, G., et al. (2008). "A Haplotype-Based Analysis of the LRP5 Gene in Relation to Osteoporosis Phenotypes in Spanish Postmenopausal Women." J Bone Miner Res.
- Agueda, L., Velazquez-Cruz, R., Urreiziti, R., Yoskovitz, G., Sarrion, P., Jurado, S., et al. (2011). "Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: novel involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation." J Bone Miner Res **26**(5): 1133-1144.
- Ahn, J., Ludecke, H. J., Lindow, S., Horton, W. A., Lee, B., Wagner, M. J., et al. (1995). "Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1)." Nat Genet **11**(2): 137-143.
- Ai, M., Holmen, S. L., Van Hul, W., Williams, B. O. and Warman, M. L. (2005). "Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling." Mol Cell Biol **25**(12): 4946-4955.
- Akhter, M. P., Wells, D. J., Short, S. J., Cullen, D. M., Johnson, M. L., Haynatzki, G. R., et al. (2004). "Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice." Bone **35**(1): 162-169.
- Akiyama, T. (2000). "Wnt/beta-catenin signaling." Cytokine Growth Factor Rev **11**(4): 273-282.
- Alvarez, C., Tredwell, S., De Vera, M. and Hayden, M. (2006). "The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses." Clin Genet **70**(2): 122-130.
- Arce, L., Yokoyama, N. N. and Waterman, M. L. (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." Oncogene **25**(57): 7492-7504.
- Arnett, T. (2004). Estructura y remodelado del hueso. Madrid, Jarpyo Editores S.A.
- Babij, P., Zhao, W., Small, C., Kharode, Y., Yaworsky, P. J., Bouxsein, M. L., et al. (2003). "High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene." J Bone Miner Res **18**(6): 960-974.
- Baek, S. H., Kioussi, C., Briata, P., Wang, D., Nguyen, H. D., Ohgi, K. A., et al. (2003). "Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3245-3250.
- Balemans, W., Devogelaer, J. P., Cleiren, E., Piters, E., Caussin, E. and Van Hul, W. (2007). "Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling." J Bone Miner Res **22**(5): 708-716.
- Balemans, W. and Van Hul, W. (2007). "The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes." Endocrinology **148**(6): 2622-2629.
- Baron, R. and Rawadi, G. (2007). "Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton." Endocrinology **148**(6): 2635-2643.
- Baron, R. and Rawadi, G. (2007). "Wnt signaling and the regulation of bone mass." Curr Osteoporos Rep **5**(2): 73-80.
- Bartsch, O., Wuyts, W., Van Hul, W., Hecht, J. T., Meinecke, P., Hogue, D., et al. (1996). "Delineation of a contiguous gene syndrome with multiple exostoses, enlarged parietal foramina, craniofacial dysostosis, and mental retardation,

- caused by deletions in the short arm of chromosome 11." Am J Hum Genet **58**(4): 734-742.
- Behrens, J. (2000). "Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: a role of MAP kinases." J Cell Sci **113** (Pt 6): 911-919.
- Bell, W. C., Klein, M. J., Pitt, M. J. and Siegal, G. P. (2006). "Molecular pathology of chondroid neoplasms: part 1, benign lesions." Skeletal Radiol **35**(11): 805-813.
- Bellaïche, Y., The, I. and Perrimon, N. (1998). "Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion." Nature **394**(6688): 85-88.
- Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D., et al. (2005). "Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3324-3329.
- Berger, A. H., Knudson, A. G. and Pandolfi, P. P. (2011). "A continuum model for tumour suppression." Nature **476**(7359): 163-169.
- Blanton, S. H., Hogue, D., Wagner, M., Wells, D., Young, I. D. and Hecht, J. T. (1996). "Hereditary multiple exostoses: confirmation of linkage to chromosomes 8 and 11." Am J Med Genet **62**(2): 150-159.
- Bodine, P. V., Zhao, W., Kharode, Y. P., Bex, F. J., Lambert, A. J., Goad, M. B., et al. (2004). "The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice." Mol Endocrinol **18**(5): 1222-1237.
- Boland, G. M., Perkins, G., Hall, D. J. and Tuan, R. S. (2004). "Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells." J Cell Biochem **93**(6): 1210-1230.
- Bornemann, D. J., Duncan, J. E., Staatz, W., Selleck, S. and Warrior, R. (2004). "Abrogation of heparan sulfate synthesis in Drosophila disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways." Development **131**(9): 1927-1938.
- Bovee, J. V. (2008). "Multiple osteochondromas." Orphanet J Rare Dis **3**: 3.
- Bovee, J. V., Cleton-Jansen, A. M., Kuipers-Dijkshoorn, N. J., van den Broek, L. J., Taminiau, A. H., Cornelisse, C. J., et al. (1999). "Loss of heterozygosity and DNA ploidy point to a diverging genetic mechanism in the origin of peripheral and central chondrosarcoma." Genes Chromosomes Cancer **26**(3): 237-246.
- Bovee, J. V., Cleton-Jansen, A. M., Wuyts, W., Caethoven, G., Taminiau, A. H., Bakker, E., et al. (1999). "EXT-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas." Am J Hum Genet **65**(3): 689-698.
- Bovee, J. V., Hameetman, L., Kroon, H. M., Aigner, T. and Hogendoorn, P. C. (2006). "EXT-related pathways are not involved in the pathogenesis of dysplasia epiphysealis hemimelica and metachondromatosis." J Pathol **209**(3): 411-419.
- Bovee, J. V. and Hogendoorn, P. C. (2002). Multiple osteochondromas. Lyon, IARC Press.
- Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med **346**(20): 1513-1521.
- Boyer, A. (1814). Traité des maladies chirurgicales. Paris.
- Buhler, E. M. and Malik, N. J. (1984). "The tricho-rhino-phalangeal syndrome(s): chromosome 8 long arm deletion: is there a shortest region of overlap between reported cases? TRP I and TRP II syndromes: are they separate entities?" Am J Med Genet **19**(1): 113-119.

- Canalis, E., Giustina, A. and Bilezikian, J. P. (2007). "Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis." N Engl J Med **357**(9): 905-916.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-480.
- Clines, G. A., Ashley, J. A., Shah, S. and Lovett, M. (1997). "The structure of the human multiple exostoses 2 gene and characterization of homologs in mouse and *Caenorhabditis elegans*." Genome Res **7**(4): 359-367.
- Cole, R. E. (2008). "Improving clinical decisions for women at risk of osteoporosis: dual-femur bone mineral density testing." J Am Osteopath Assoc **108**(6): 289-295.
- Cook, A., Raskind, W., Blanton, S. H., Pauli, R. M., Gregg, R. G., Francomano, C. A., et al. (1993). "Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses." Am J Hum Genet **53**(1): 71-79.
- Cui, Y., Niziolek, P. J., MacDonald, B. T., Zylstra, C. R., Alenina, N., Robinson, D. R., et al. (2011). "Lrp5 functions in bone to regulate bone mass." Nat Med **17**(6): 684-691.
- Cumming, R. G. (1990). "Calcium intake and bone mass: a quantitative review of the evidence." Calcif Tissue Int **47**(4): 194-201.
- Checa Vizcaíno, M. A., Robles Corchado, A. and Carreras Collado, R. (2009). Anatomía y ultraestructura ósea, osteoblastos y osteoclastos, regulación del remodelado óseo, sistema RANK-RANK-L, catepsina y metabolismo óseo, Editorial Médica Panamerica, S. A.
- Chung, B. D., Kayserili, H., Ai, M., Freudenberg, J., Uzumcu, A., Uyguner, O., et al. (2009). "A mutation in the signal sequence of LRP5 in a family with an osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG)-like phenotype indicates a novel disease mechanism for trinucleotide repeats." Hum Mutat **30**(4): 641-648.
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. and Yang, Y. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." Dev Cell **8**(5): 739-750.
- De Boer, J., Wang, H. J. and Van Blitterswijk, C. (2004). "Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells." Tissue Eng **10**(3-4): 393-401.
- de la Mata Llord, J. (1997). Estructura del hueso y de los sistemas celulares. Barcelona, Masson.
- del Río, L. (2004). Densitometría ósea. Madrid, Jarpyo Editores S. A.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., et al. (2000). "Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass." Cell **100**(2): 197-207.
- Duncan, E. L. and Brown, M. A. (2010). "Clinical review 2: Genetic determinants of bone density and fracture risk--state of the art and future directions." J Clin Endocrinol Metab **95**(6): 2576-2587.
- Duncan, E. L., Danoy, P., Kemp, J. P., Leo, P. J., McCloskey, E., Nicholson, G. C., et al. (2011). "Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk." PLoS Genet **7**(4): e1001372.
- Ehrenfried, A. (1915). "Multiple cartilaginous exostoses—hereditary deforming chorodysplasia: A brief report on a little know disease." JAMA **64**: 1642–1646.
- Ellies, D. L., Viviano, B., McCarthy, J., Rey, J. P., Itasaki, N., Saunders, S., et al. (2006). "Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity." J Bone Miner Res **21**(11): 1738-1749.

- Esko, J. D. and Lindahl, U. (2001). "Molecular diversity of heparan sulfate." J Clin Invest **108**(2): 169-173.
- Esko, J. D. and Selleck, S. B. (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." Annu Rev Biochem **71**: 435-471.
- Estrada, K., Styrkarsdottir, U., Evangelou, E., Hsu, Y. H., Duncan, E. L., Ntzani, E. 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**(5): 491-501.
- Faiyaz-Ul-Haque, M., Ahmad, W., Zaidi, S. H., Hussain, S., Haque, S., Ahmad, M., et al. (2004). "Novel mutations in the EXT1 gene in two consanguineous families affected with multiple hereditary exostoses (familial osteochondromatosis)." Clin Genet **66**(2): 144-151.
- Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W. H., Miki, T., Bottaro, D. P., et al. (1999). "Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling." J Biol Chem **274**(27): 19465-19472.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarron, M. and Blanco-Jerez, L. (2006). "Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **11**(2): E151-157.
- Figueroa, D. J., Hess, J. F., Ky, B., Brown, S. D., Sandig, V., Hermanowski-Vosatka, A., et al. (2000). "Expression of the type I diabetes-associated gene LRP5 in macrophages, vitamin A system cells, and the Islets of Langerhans suggests multiple potential roles in diabetes." J Histochem Cytochem **48**(10): 1357-1368.
- Fiter, J. (2010). Factores locales reguladores del metabolismo óseo, Ed. Médica Panamericana.
- Frame, B., Honasoge, M. and Kottamasu, S. R. (1987). Osteosclerosis, hyperostosis, and related disorders, New York, NY.
- Francannet, C., Cohen-Tanugi, A., Le Merrer, M., Munnich, A., Bonaventure, J. and Legeai-Mallet, L. (2001). "Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses." J Med Genet **38**(7): 430-434.
- Fujino, T., Asaba, H., Kang, M. J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., et al. (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 229-234.
- Glick, R., Khaldi, L., Ptaszynski, K. and Steiner, G. C. (2007). "Dysplasia epiphysealis hemimelica (Trevor disease): a rare developmental disorder of bone mimicking osteochondroma of long bones." Hum Pathol **38**(8): 1265-1272.
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., et al. (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell **107**(4): 513-523.
- González, J. (2004). Osteoporosis: definición y etiología. Madrid, Jarpyo Editores S.A.
- Gordon, M. D. and Nusse, R. (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." J Biol Chem **281**(32): 22429-22433.
- Gregson, C. L., Steel, S. A., O'Rourke, K. P., Allan, K., Ayuk, J., Bhalla, A., et al. (2012). "'Sink or swim': an evaluation of the clinical characteristics of individuals with high bone mass." Osteoporos Int **23**(2): 643-654.
- Guy's (1825). "Guy's Hospital Reports Case of Cartilaginous Exostosis." Lancet **2**: 91.

- Hall, C. R., Cole, W. G., Haynes, R. and Hecht, J. T. (2002). "Reevaluation of a genetic model for the development of exostosis in hereditary multiple exostosis." Am J Med Genet **112**(1): 1-5.
- Hameetman, L., Bovee, J. V., Taminiau, A. H., Kroon, H. M. and Hogendoorn, P. C. (2004). "Multiple osteochondromas: clinicopathological and genetic spectrum and suggestions for clinical management." Hered Cancer Clin Pract **2**(4): 161-173.
- Hameetman, L., Szuhai, K., Yavas, A., Knijnenburg, J., van Duin, M., van Dekken, H., et al. (2007). "The role of EXT1 in nonhereditary osteochondroma: identification of homozygous deletions." J Natl Cancer Inst **99**(5): 396-406.
- Han, C., Belenkaya, T. Y., Khodoun, M., Tauchi, M., Lin, X. and Lin, X. (2004). "Distinct and collaborative roles of Drosophila EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation." Development **131**(7): 1563-1575.
- Harada, S. and Rodan, G. A. (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." Nature **423**(6937): 349-355.
- Hecht, J. T., Hogue, D., Strong, L. C., Hansen, M. F., Blanton, S. H. and Wagner, M. (1995). "Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8." Am J Hum Genet **56**(5): 1125-1131.
- Heinritz, W., Huffmeier, U., Strenge, S., Mitterski, B., Zweier, C., Leinung, S., et al. (2009). "New Mutations of EXT1 and EXT2 Genes in German Patients with Multiple Osteochondromas." Ann Hum Genet.
- Hennekam, R. C. (1991). "Hereditary multiple exostoses." J Med Genet **28**(4): 262-266.
- Hill, P. A. (1998). "Bone remodelling." Br J Orthod **25**(2): 101-107.
- Hill, T. P., Spater, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. and Hartmann, C. (2005). "Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes." Dev Cell **8**(5): 727-738.
- Hill, T. P., Taketo, M. M., Birchmeier, W. and Hartmann, C. (2006). "Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning." Development **133**(7): 1219-1229.
- Hou, J., Parrish, J., Ludecke, H. J., Sapru, M., Wang, Y., Chen, W., et al. (1995). "A 4-megabase YAC contig that spans the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8q24.1: use in refining the location of the trichorhinophalangeal syndrome and multiple exostoses genes (TRPS1 and EXT1)." Genomics **29**(1): 87-97.
- Hunter, J. and Palmer, J. F. (1837). Lectures on the principles of surgery. London.
- Huvos, A. G. (1991). Bone tumors: Diagnosis, treatment, and prognosis. Philadelphia, W.B. Saunders Co.
- Ioannidis, J. P., Ralston, S. H., Bennett, S. T., Brandi, M. L., Grinberg, D., Karassa, F. B., et al. (2004). "Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes." Jama **292**(17): 2105-2114.
- Janssens, K. and Van Hul, W. (2002). "Molecular genetics of too much bone." Hum Mol Genet **11**(20): 2385-2393.
- Jennes, I., Entius, M. M., Van Hul, E., Parra, A., Sangiorgi, L. and Wuyts, W. (2008). "Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteochondromas." J Mol Diagn **10**(1): 85-92.

- Jennes, I., Pedrini, E., Zuntini, M., Mordenti, M., Balkassmi, S., Asteggiano, C. G., et al. (2009). "Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb)." *Hum Mutat* **30**(12): 1620-1627.
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., et al. (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6." *Science* **257**(5066): 88-91.
- Johnson, M. L., Gong, G., Kimberling, W., Recker, S. M., Kimmel, D. B. and Recker, R. B. (1997). "Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13)." *Am J Hum Genet* **60**(6): 1326-1332.
- Jones, K. B. (2011). "Glycobiology and the growth plate: current concepts in multiple hereditary exostoses." *J Pediatr Orthop* **31**(5): 577-586.
- Jones, K. B., Piombo, V., Searby, C., Kurriger, G., Yang, B., Grabellus, F., et al. (2010). "A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of *Ext1* in chondrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(5): 2054-2059.
- Kanellakis, S., Moschonis, G., Tenta, R., Schaafsma, A., van den Heuvel, E. G., Papaioannou, N., et al. (2012). "Changes in parameters of bone metabolism in postmenopausal women following a 12-month intervention period using dairy products enriched with calcium, vitamin D, and phylloquinone (vitamin K(1)) or menaquinone-7 (vitamin K (2)): the Postmenopausal Health Study II." *Calcif Tissue Int* **90**(4): 251-262.
- Kang, Z., Peng, F. and Ling, T. (2012). "Mutation screening of EXT genes in Chinese patients with multiple osteochondromas." *Gene* **506**(2): 298-300.
- Kato, M., Patel, M. S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B. H., Glass, D. A., 2nd, et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor." *J Cell Biol* **157**(2): 303-314.
- Keith, A. (1920). "Studies on the Anatomical Changes which accompany certain Growth-disorders of the Human Body: I. The Nature of the Structural Alterations in the Disorder known as Multiple Exostoses." *J Anat* **54**(Pt 2-3): 101-115.
- Khurana, J., Abdul-Karim, F. and Bovée, J. V. (2002). *Osteochondroma*. Lyon, IARC Press.
- Kitsoulis, P., Galani, V., Stefanaki, K., Paraskevas, G., Karatzias, G., Agnantis, N. J., et al. (2008). "Osteochondromas: review of the clinical, radiological and pathological features." *In Vivo* **22**(5): 633-646.
- Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." *Annu Rev Biochem* **60**: 443-475.
- Kleber, M. and Sommer, L. (2004). "Wnt signaling and the regulation of stem cell function." *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 681-687.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-823.
- Koay, M. A., Woon, P. Y., Zhang, Y., Miles, L. J., Duncan, E. L., Ralston, S. H., et al. (2004). "Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD." *J Bone Miner Res* **19**(10): 1619-1627.
- Krishnan, V., Bryant, H. U. and Macdougald, O. A. (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." *J Clin Invest* **116**(5): 1202-1209.
- Krooth, R. S., Macklin, M. T. and Hilbish, T. F. (1961). "Diaphysial aclasis (multiple exostoses) on Guam." *Am J Hum Genet* **13**: 340-347.

- Kusu, N., Laurikkala, J., Imanishi, M., Usui, H., Konishi, M., Miyake, A., et al. (2003). "Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity." *J Biol Chem* **278**(26): 24113-24117.
- Lai, L. P. and Mitchell, J. (2005). "Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development." *J Cell Biochem* **96**(6): 1163-1173.
- Langer, L. O., Jr., Krassikoff, N., Laxova, R., Scheer-Williams, M., Lutter, L. D., Gorlin, R. J., et al. (1984). "The tricho-rhino-phalangeal syndrome with exostoses (or Langer-Giedion syndrome): four additional patients without mental retardation and review of the literature." *Am J Med Genet* **19**(1): 81-112.
- Le Merrer, M., Legeai-Mallet, L., Jeannin, P. M., Horsthemke, B., Schinzel, A., Plauchu, H., et al. (1994). "A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p." *Hum Mol Genet* **3**(5): 717-722.
- Legeai-Mallet, L., Munnich, A., Maroteaux, P. and Le Merrer, M. (1997). "Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses." *Clin Genet* **52**(1): 12-16.
- Li, W. F., Hou, S. X., Yu, B., Li, M. M., Ferec, C. and Chen, J. M. (2010). "Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation." *Hum Genet* **127**(3): 249-285.
- Li, X., Liu, P., Liu, W., Maye, P., Zhang, J., Zhang, Y., et al. (2005). "Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation." *Nat Genet* **37**(9): 945-952.
- Li, X., Ominsky, M. S., Warmington, K. S., Niu, Q. T., Asuncion, F. J., Barrero, M., et al. (2011). "Increased bone formation and bone mass induced by sclerostin antibody is not affected by pretreatment or cotreatment with alendronate in osteopenic, ovariectomized rats." *Endocrinology* **152**(9): 3312-3322.
- Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J. D., Wells, D. E., et al. (2000). "Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice." *Dev Biol* **224**(2): 299-311.
- Lin, X. and Wells, D. (1997). "Isolation of the mouse cDNA homologous to the human EXT1 gene responsible for Hereditary Multiple Exostoses." *DNA Seq* **7**(3-4): 199-202.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U. and Lidholt, K. (1998). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate." *J Biol Chem* **273**(41): 26265-26268.
- Little, R. D., Carulli, J. P., Del Mastro, R. G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., 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**(1): 11-19.
- Little, R. D., Recker, R. R. and Johnson, M. L. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." *N Engl J Med* **347**(12): 943-944; author reply 943-944.
- Lohmann, D. R., Buiting, K., Ludecke, H. J. and Horsthemke, B. (1997). "The murine Ext1 gene shows a high level of sequence similarity with its human homologue and is part of a conserved linkage group on chromosome 15." *Cytogenet Cell Genet* **76**(3-4): 164-166.
- Lonie, L., Porter, D. E., Fraser, M., Cole, T., Wise, C., Yates, L., et al. (2006). "Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases." *Hum Mutat* **27**(11): 1160.

- Ludecke, H. J., Ahn, J., Lin, X., Hill, A., Wagner, M. J., Schomburg, L., et al. (1997). "Genomic organization and promoter structure of the human EXT1 gene." Genomics **40**(2): 351-354.
- Ludecke, H. J., Wagner, M. J., Nardmann, J., La Pillo, B., Parrish, J. E., Willems, P. J., et al. (1995). "Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome." Hum Mol Genet **4**(1): 31-36.
- MacDonald, B. T., Joiner, D. M., Oyserman, S. M., Sharma, P., Goldstein, S. A., He, X., et al. (2007). "Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice." Bone **41**(3): 331-339.
- Marques-Pinheiro, A., Levasseur, R., Cormier, C., Bonneau, J., Boileau, C., Varret, M., et al. (2010). "Novel LRP5 gene mutation in a patient with osteoporosis-pseudoglioma syndrome." Joint Bone Spine **77**(2): 151-153.
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K. T. and Tufaro, F. (2000). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 668-673.
- McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., Esford, L. E., Dyer, A. P., et al. (1998). "The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate." Nat Genet **19**(2): 158-161.
- Melton, L. J., 3rd, Ilstrup, D. M., Beckenbaugh, R. D. and Riggs, B. L. (1982). "Hip fracture recurrence. A population-based study." Clin Orthop Relat Res(167): 131-138.
- Mertens, F. and Unni, K. (2002). Enchondromatosis: Ollier disease and Maffucci syndrome. Lyon, IARC Press.
- Monroe, D. G., McGee-Lawrence, M. E., Oursler, M. J. and Westendorf, J. J. (2012). "Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease." Gene **492**(1): 1-18.
- Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M. and Perrimon, N. (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin." Science **296**(5573): 1644-1646.
- Morvan, F., Boulukos, K., Clement-Lacroix, P., Roman Roman, S., Suc-Royer, I., Vayssiere, B., et al. (2006). "Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass." J Bone Miner Res **21**(6): 934-945.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., et al. (2001). "Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse." Dev Cell **1**(3): 423-434.
- National Guideline, C. (2010). "ACR Appropriateness Criteria®; osteoporosis and bone mineral density." Retrieved 12/6/2012, from <http://www.guideline.gov/content.aspx?id=23824&search=american+college+of+radiology+and+osteoporosis+and+bone+mineral+density>.
- Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., et al. (2010). "Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder." Nat Genet **42**(1): 30-35.
- Nikopoulos, K., Venselaar, H., Collin, R. W., Riveiro-Alvarez, R., Boonstra, F. N., Hooymans, J. M., et al. (2010). "Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP." Hum Mutat **31**(6): 656-666.

- Okubo, M., Horinishi, A., Kim, D. H., Yamamoto, T. T. and Murase, T. (2002). "Seven novel sequence variants in the human low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5) gene." *Hum Mutat* **19**(2): 186.
- Pangrazio, A., Boudin, E., Piters, E., Damante, G., Lo Iacono, N., D'Elia, A. V., et al. (2011). "Identification of the first deletion in the LRP5 gene in a patient with autosomal dominant osteopetrosis type I." *Bone* **49**(3): 568-571.
- Pannier, S. and Legeai-Mallet, L. (2008). "Hereditary multiple exostoses and enchondromatosis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**(1): 45-54.
- Pedrini, E., Jennes, I., Tremosini, M., Milanesi, A., Mordenti, M., Parra, A., et al. (2011). "Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors." *J Bone Joint Surg Am* **93**(24): 2294-2302.
- Peterson, H. A. (1989). "Multiple hereditary osteochondromata." *Clin Orthop Relat Res*(239): 222-230.
- Porter, D. E., Lonie, L., Fraser, M., Dobson-Stone, C., Porter, J. R., Monaco, A. P., et al. (2004). "Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A genotype-phenotype study." *J Bone Joint Surg Br* **86**(7): 1041-1046.
- Potocki, L. and Shaffer, L. G. (1996). "Interstitial deletion of 11(p11.2p12): a newly described contiguous gene deletion syndrome involving the gene for hereditary multiple exostoses (EXT2)." *Am J Med Genet* **62**(3): 319-325.
- Raskind, W. H., Conrad, E. U., Chansky, H. and Matsushita, M. (1995). "Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11." *Am J Hum Genet* **56**(5): 1132-1139.
- Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. and Roman-Roman, S. (2003). "BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop." *J Bone Miner Res* **18**(10): 1842-1853.
- Richards, J. B., Kavvoura, F. K., Rivadeneira, F., Styrkarsdottir, U., Estrada, K., Halldorsson, B. V., et al. (2009). "Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture." *Ann Intern Med* **151**(8): 528-537.
- Riggs, B. L., Khosla, S. and Melton, L. J., 3rd (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." *Endocr Rev* **23**(3): 279-302.
- Rivadeneira, F., Styrkarsdottir, U., Estrada, K., Halldorsson, B. V., Hsu, Y. H., Richards, J. B., et al. (2009). "Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies." *Nat Genet* **41**(11): 1199-1206.
- Robling, A. G., Castillo, A. B. and Turner, C. H. (2006). "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 455-498.
- Roessler, E., Du, Y., Glinka, A., Dutra, A., Niehrs, C. and Muenke, M. (2000). "The genomic structure, chromosome location, and analysis of the human DKK1 head inducer gene as a candidate for holoprosencephaly." *Cytogenet Cell Genet* **89**(3-4): 220-224.
- Rosell, W., Dovale, C. and Álvarez, I. (2001). *Sistemas somáticos*.
- Ross, M. H. and Pawlina, W. (2008). *Tejido óseo*.
- Schmale, G. A., Conrad, E. U. r. and Raskind, W. H. (1994). "The natural history of hereditary multiple exostoses." *J Bone Joint Surg Am* **76**(7): 986-992.

- Seki, H., Kubota, T., Ikegawa, S., Haga, N., Fujioka, F., Ohzeki, S., et al. (2001). "Mutation frequencies of EXT1 and EXT2 in 43 Japanese families with hereditary multiple exostoses." Am J Med Genet **99**(1): 59-62.
- Semenov, M., Tamai, K. and He, X. (2005). "SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor." J Biol Chem **280**(29): 26770-26775.
- Signori, E., Massi, E., Matera, M. G., Poscente, M., Gravina, C., Falcone, G., et al. (2007). "A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients." Genes Chromosomes Cancer **46**(5): 470-477.
- Sims, A. M., Shephard, N., Carter, K., Doan, T., Dowling, A., Duncan, E. L., et al. (2008). "Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes." J Bone Miner Res **23**(4): 499-506.
- Solomon, L. (1963). "Hereditary multiple exostosis." J Bone Joint Surg Br **45**: 292-304.
- Stancheva-Ivanova, M. K., Wuyts, W., van Hul, E., Radeva, B. I., Vazharova, R. V., Sokolov, T. P., et al. (2011). "Clinical and molecular studies of EXT1/EXT2 in Bulgaria." J Inherit Metab Dis **34**(4): 917-921.
- Stickens, D., Clines, G., Burbee, D., Ramos, P., Thomas, S., Hogue, D., et al. (1996). "The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes." Nat Genet **14**(1): 25-32.
- Stickens, D. and Evans, G. A. (1997). "Isolation and characterization of the murine homolog of the human EXT2 multiple exostoses gene." Biochem Mol Med **61**(1): 16-21.
- Stickens, D., Zak, B. M., Rougier, N., Esko, J. D. and Werb, Z. (2005). "Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses." Development **132**(22): 5055-5068.
- Styrkarsdottir, U., Halldorsson, B. V., Gretarsdottir, S., Gudbjartsson, D. F., Walters, G. B., Ingvarsson, T., et al. (2008). "Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures." N Engl J Med **358**(22): 2355-2365.
- Styrkarsdottir, U., Halldorsson, B. V., Gretarsdottir, S., Gudbjartsson, D. F., Walters, G. B., Ingvarsson, T., et al. (2009). "New sequence variants associated with bone mineral density." Nat Genet **41**(1): 15-17.
- Takeda, S., Elefteriou, F., Lévassieur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K. L., et al. (2002). "Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system." Cell **111**(3): 305-317.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." Mol Cell **13**(1): 149-156.
- Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., et al. (2003). "The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma." N Engl J Med **349**(26): 2483-2494.
- van Meurs, J. B., Trikalinos, T. A., Ralston, S. H., Balcells, S., Brandi, M. L., Brixen, K., et al. (2008). "Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis." Jama **299**(11): 1277-1290.
- Van Wesenbeeck, L., Cleiren, E., Gram, J., Beals, R. K., Benichou, O., Scopelliti, D., et al. (2003). "Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density." Am J Hum Genet **72**(3): 763-771.
- Virchow, R. (1876). "Ueber the Entstehung des Enchondroms und seine Beziehungen zur Enchondrosis und Exostosis cartilaginea." Monatsberichte der Koniglichen Preussischen Akademie der Wissenschaften **760**.

- Vlodavsky, I. and Friedmann, Y. (2001). "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis." J Clin Invest **108**(3): 341-347.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., et al. (1999). "Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis." Nat Med **5**(7): 793-802.
- Waaiker, C. J., Winter, M. G., Reijnders, C. M., de Jong, D., John Ham, S., Bovee, J. V., et al. (2013). "Intronic deletion and duplication proximal of the EXT1 gene: a novel causative mechanism for multiple osteochondromas." Genes Chromosomes Cancer **52**(4): 431-436.
- Welsch, U. (2010). Tejidos.
- WHO, S. G. (2003). "Prevention and management of osteoporosis." World Health Organ Tech Rep Ser **921**: 1-164, back cover.
- Whyte, M. P. (1997). "Searching for gene defects that cause high bone mass." Am J Hum Genet **60**(6): 1309-1311.
- Whyte, M. P., Reinus, W. H. and Mumm, S. (2004). "High-bone-mass disease and LRP5." N Engl J Med **350**(20): 2096-2099; author reply 2096-2099.
- Wicklund, C. L., Pauli, R. M., Johnston, D. and Hecht, J. T. (1995). "Natural history study of hereditary multiple exostoses." Am J Med Genet **55**(1): 43-46.
- Wu, Y. Q., Heutink, P., de Vries, B. B., Sandkuijl, L. A., van den Ouweland, A. M., Niermeijer, M. F., et al. (1994). "Assignment of a second locus for multiple exostoses to the pericentromeric region of chromosome 11." Hum Mol Genet **3**(1): 167-171.
- Wuyts, W., Ramlakhan, S., Van Hul, W., Hecht, J. T., van den Ouweland, A. M., Raskind, W. H., et al. (1995). "Refinement of the multiple exostoses locus (EXT2) to a 3-cM interval on chromosome 11." Am J Hum Genet **57**(2): 382-387.
- Wuyts, W. and Van Hul, W. (2000). "Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes." Hum Mutat **15**(3): 220-227.
- Wuyts, W., Van Hul, W., Wauters, J., Nemtsova, M., Reyniers, E., Van Hul, E. V., et al. (1996). "Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses." Hum Mol Genet **5**(10): 1547-1557.
- Xu, L., Xia, J., Jiang, H., Zhou, J., Li, H., Wang, D., et al. (1999). "Mutation analysis of hereditary multiple exostoses in the Chinese." Hum Genet **105**(1-2): 45-50.
- Yadav, V. K., Ryu, J. H., Suda, N., Tanaka, K. F., Gingrich, J. A., Schutz, G., et al. (2008). "Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum." Cell **135**(5): 825-837.
- Yen, M. L., Chien, C. C., Chiu, I. M., Huang, H. I., Chen, Y. C., Hu, H. I., et al. (2007). "Multilineage differentiation and characterization of the human fetal osteoblastic 1.19 cell line: a possible in vitro model of human mesenchymal progenitors." Stem Cells **25**(1): 125-131.
- Yoshiura, K., Inazawa, J., Koyama, K., Nakamura, Y. and Niikawa, N. (1994). "Mapping of the 8q23 translocation breakpoint of t(8;13) observed in a patient with multiple exostoses." Genes Chromosomes Cancer **9**(1): 57-61.
- Zanchetta, J. R. and Talbot, J. R. (2001). Diagnóstico.
- Zhang, Y., Wang, Y., Li, X., Zhang, J., Mao, J., Li, Z., et al. (2004). "The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd." Mol Cell Biol **24**(11): 4677-4684.
- Zuntini, M., Pedrini, E., Parra, A., Sgariglia, F., Gentile, F. V., Pandolfi, M., et al. (2010). "Genetic models of osteochondroma onset and neoplastic progression:

evidence for mechanisms alternative to EXT genes inactivation." Oncogene **29**(26): 3827-3834.