



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ ΥΓΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ**  
**ΓΙΑ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

ΜΑΡΙΑ ΧΡΗΣΤΟΥ  
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ ΥΓΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ**  
**ΓΙΑ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

ΜΑΡΙΑ ΧΡΗΣΤΟΥ  
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2).





Ημερομηνία αίτησης της κας Χρήστου Μαρίας: 14-12-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 773<sup>α</sup>/16-12-2014

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Ντζάνη Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην Επιδημιολογία

Μέλη

Ευαγγέλου Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Κλινική και Μοριακή Επιδημιολογία  
Ιωαννίδης Ιωάννης, Professor of Health Research and Policy, Director of the Stanford Prevention Research Center, Stanford University, School of Medicine

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 22-1-2016

«Αποτίμηση γενετικών παραγόντων κινδύνου για διαταραχές των οστών»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 933<sup>α</sup>/28-7-2020**

1. Γουλής Δημήτριος, Καθηγητής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
2. Ιωαννίδης Ιωάννης, Professor of Health Research and Policy, Stanford University, School of Medicine
3. Ευαγγέλου Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Κλινική και Μοριακή Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Ντζάνη Ευαγγελία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Τσιλίδης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τίγκας Στυλιανός, Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Τζουλάκη Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-12-2020

Ιωάννινα 30-3-2021

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



*Στους γονείς μου, Τάσο και Κατερίνα  
Στα αδέρφια μου, Γιώργο, Κώστα, Ελένη, Γιώτα και Βαγγέλη*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μέντορα και επιβλέπουσα της διατριβής μου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ευαγγελία Ντζάνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση όλα αυτά τα χρόνια και τη συμπόρευση σε αυτό το μακρύ και συνάμα συναρπαστικό ταξίδι. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή κ. Ιωάννη Ιωαννίδη ο οποίος με μύησε στην έρευνα ήδη από το τρίτο έτος της Ιατρικής, μου δίδαξε τη σπουδαιότητα της αυστηρής ερευνητικής τεκμηρίωσης και της σκληρής δουλειάς, ενώ συνεχίζει να αποτελεί για εμένα πρότυπο στην ερευνητική μου διαδρομή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς το συνεπιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής κ. Ευάγγελο Ευαγγέλου για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξη στη διάρκεια αυτών των ετών, καθώς επίσης το Διευθυντή της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του ΠΓΝ Ιωαννίνων και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Στυλιανό Τίγκα για την εμπύχωση και τη συνεχή υποστήριξη παρά τις δυσκολίες της καθημερινής κλινικής πράξης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ενδοκρινολογίας του ΑΠΘ κ. Δημήτριο Γουλή, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής κ. Κωνσταντίνο Τσιλίδη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής κα. Ιωάννα Τζουλάκη για την ουσιαστική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή David Karasik από το Πανεπιστήμιο Bar Ilan του Ισραήλ για τη γόνιμη και παραγωγική συνεργασία.

Ευχαριστώ επίσης τους συνεργάτες και το προσωπικό του Εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την αλληλεπίδραση που είχαμε όλο αυτό το διάστημα και

ιδιαίτερα τους Γιώργο Μαρκοζάννες, Νίκη Δήμου, Γιώργο Ντρίτσο και Φώτη Κοσκερίδη. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συμπαράστασή της σε κάθε μου βήμα προς την επίτευξη του στόχου μου.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I would like to warmly thank my mentor and PhD thesis supervisor, Director of the Laboratory of Hygiene and Epidemiology Associate Professor Evangelia Ntzani for the trust she has placed in me and for her guidance over the years of this long yet fascinating journey. Special thanks to Professor John Ioannidis who introduced me to research in the third year of my medical studies, taught me the importance of rigorous research documentation and hard work and remains a model for me in my research journey.

In addition, I would like to thank from the bottom of my heart the co-supervisor Associate Professor of Hygiene Evangelos Evangelou for the valuable guidance and support during these years, as well as the Director of the Department of Endocrinology at the University Hospital of Ioannina Associate Professor Stilianos Tigas for his encouragement and continuing support through the challenges of everyday clinical practice. I would also like to thank the Professor of Endocrinology at the Aristotle University of Thessaloniki Dimitrios Goulis, the Associate Professor of Hygiene Konstantinos Tsilidis and the Assistant Professor of Hygiene Ioanna Tzoulaki for their substantial contribution to the completion of my dissertation. I would especially like to express special thanks to Associate Professor David Karasik from Bar-Ilan University in Israel for our fruitful and productive collaboration.

I would also like to thank the collaborators and the staff of the Laboratory of Hygiene and Epidemiology for the excellent cooperation and interaction that we had all these years and especially Georgios Markozannes, Niki Dimou, Georgios Ntritsos

and Fotis Koskeridis. Lastly, I have to thank my family for their support in every step I took to achieve my goal.



## ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ ...

*... παρατίθεται ο αρχικός ορισμός της πλειοτροπίας όπως διατυπώθηκε το 1910 από το Γερμανό γενετιστή Ludwig Plate: "I call a unit of inheritance pleiotropic if several characteristics are dependent upon it; these characteristics will then always appear together and may thus appear correlated."*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ</b> ...	<b>iii</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>v</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Η ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Διαταραχές των οστών και ορισμός της οστεοπόρωσης .....	1
1.1.2. Βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί.....	1
1.1.3. Επιδημιολογία της οστεοπόρωσης και των οστεοπορωτικών καταγμάτων .....	6
1.1.4. Μέτρηση και χρήση της οστικής πυκνότητας .....	9
1.1.5. Διάγνωση της οστεοπόρωσης .....	11
<b>1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ</b> .....	<b>14</b>
1.2.1. Γενετική αρχιτεκτονική των διάφορων φαινοτύπων .....	14
1.2.2. Διακύμανση και κληρονομησιμότητα της οστικής πυκνότητας .....	16
1.2.3. Γενετικές μελέτες της οστεοπόρωσης .....	18
<b>1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑ</b> .....	<b>27</b>
1.3.1. Εισαγωγή στη γενετική πλειοτροπία .....	27
1.3.2. Έκταση της γενετικής πλειοτροπίας .....	28
1.3.3. Τύποι γενετικής πλειοτροπίας .....	30
<b>1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	<b>33</b>
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑ ΟΣΤΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ: ΔΙΔΑΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ</b> .....	<b>35</b>
2.1.1. Εισαγωγή – Σκοπός .....	35
2.1.2. Μέθοδοι.....	36
2.1.3. Αποτελέσματα .....	41
2.1.4. Συζήτηση .....	56
<b>2.2. ΣΑΡΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΕΥΡΕΣΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΜΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ</b> .....	<b>58</b>

2.2.1. Εισαγωγή – Σκοπός .....	58
2.2.2. Μέθοδοι.....	59
2.2.3. Αποτελέσματα .....	63
2.2.4. Συζήτηση .....	79
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>83</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ .....</b>	<b>85</b>
<b>ABSTRACT IN ENGLISH .....</b>	<b>89</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>91</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>101</b>

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b> Διαδικασία διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών. ....	5
<b>Εικόνα 2.</b> Ποσοστά κατάγματος ισχίου σε άντρες και γυναίκες προσαρμοσμένα για ηλικία και φύλο σε διάφορες χώρες του κόσμου. Όπου υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα, οι χώρες έχουν κόκκινο χρώμα (ετήσια επίπτωση >150/100.000), πορτοκαλί (100-150/100.000) ή πράσινο (<100/100.000). ....	8
<b>Εικόνα 3.</b> Μέτρηση της BMD και άλλων οστικών παραμέτρων με α) DXA και β) υπερηχογράφημα.....	11
<b>Εικόνα 4.</b> Κατανομή της BMD σε νέες, υγιείς γυναίκες και τιμές κατωφλίου για οστεοπόρωση και ελαττωμένη οστική μάζα. ....	13
<b>Εικόνα 5.</b> Γενετική αρχιτεκτονική των διάφορων φαινοτύπων. ....	15
<b>Εικόνα 6.</b> Διακύμανση της BMD με βάση μελέτες GWA. ....	17
<b>Εικόνα 7.</b> Περιγραφή των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στη μελέτη UK Biobank....	22
<b>Εικόνα 8.</b> Τύποι γενετικής πλειοτροπίας. ....	32
<b>Εικόνα 9.</b> Φαινότυποι που εμπλέκονται στη γενετική πλειοτροπία της BMD εντός και εκτός του μυοσκελετικού συστήματος με βάση μελέτες GWA.....	56
<b>Εικόνα 10.</b> Διάγραμμα ροής που εξηγεί τη διαδικασία για την επιλογή μη οστικών γενετικών τόπων στη φάση ανακάλυψης της οστικής πλειοτροπίας. ....	65
<b>Εικόνα 11.</b> Σχηματική αναπαράσταση των συσχετίσεων μεταξύ SNPs και φαινοτύπων με βάση (α) την ανάλυση επικύρωσης στη UK Biobank και (β) την ανάλυση βιοπληροφορικής στη βάση PhenoScanner. ....	70



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b> Εκτιμώμενος αριθμός αντρών και γυναικών με οστεοπόρωση στον αυχένα της κεφαλής του μηριαίου οστού και επιπολασμός σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών στην Ευρώπη, 2010.....	8
<b>Πίνακας 2.</b> Αντιπροσωπευτικές μελέτες γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ BMD και άλλων οστικών φαινοτύπων. ....	44
<b>Πίνακας 3.</b> Αντιπροσωπευτικές μελέτες γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ BMD και φαινοτύπων άλλων συστημάτων.....	51
<b>Πίνακας 4.</b> Δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στη UK Biobank που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.....	67
<b>Πίνακας 5.</b> Πλειοτροπικά SNPs σε επίπεδο σημαντικότητας μελετών ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος ( $p$ -value $<5 \times 10^{-8}$ ) που σχετίζονται με τη BMD πτέρνας και μη οστικούς φαινοτύπους στη φάση επικύρωσης στη UK Biobank.....	69





## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AMD: Age-related Macular Degeneration, εκφύλιση ωχράς κηλίδας σχετιζόμενη με την ηλικία
- aWC: BMI-adjusted Waist Circumference, περιφέρεια μέσης προσαρμοσμένη για τον BMI
- BMD: Bone Mineral Density, οστική πυκνότητα
- BMI: Body Mass Index, δείκτης μάζας σώματος
- BUA: Broadband Ultrasound Attenuation, εξασθένηση υπερήχων ευρείας ζώνης
- BUN: Blood Urea Nitrogen, άζωτο ουρίας αίματος
- CAD: Coronary Artery Disease, στεφανιαία νόσος
- ccFDR: conjunctive conditional False Discovery Rate, από κοινού δεσμευμένο ποσοστό ψευδών ευρημάτων
- CNV: Copy Number Variation – ποικιλομορφία επαναληπτικών ακολουθιών
- DALYs: Disability Adjusted Life Years, προσαρμοσμένα στην ανικανότητα έτη ζωής
- DXA: Dual-energy X-ray Absorptiometry, απορρόφηση ακτίνων Χ διπλής ενέργειας
- eBMD: estimated Bone Mineral Density, εκτιμώμενη οστική πυκνότητα
- EBV: Epstein - Barr Virus, ιός Epstein - Barr
- eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate, εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης
- eLC: empirical-weighted Linear-Combined
- eQTL: expression Quantitative Trait Loci, τόποι ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης
- FDR: False Discovery Rate, ποσοστό ψευδών ευρημάτων
- FN: Femoral Neck, αυχένιας κεφαλής μηριαίου οστού
- GCTA: Genome-wide Complex Trait Analysis, ευρυγονιδιωματική ανάλυση πολυπαραγοντικών νοσημάτων
- GEFOS: GEnetic Factors for Osteoporosis
- GENOMOS: Genetic Markers of Osteoporosis
- GPA: Genetic analysis incorporating Pleiotropy and Annotation, γενετική ανάλυση που ενσωματώνει δεδομένα πλειοτροπίας και σχολιασμού
- GWAS: Genome Wide Association Study, μελέτη ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος
- HR-pQCT: High Resolution - peripheral Quantitative Computed Tomography, υψηλής ανάλυσης περιφερική ποσοτική υπολογιστική τομογραφία
- LD: Linkage Disequilibrium, ανισορροπία σύνδεσης
- LDD: Lumbar Disc Degeneration, εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης
- LDL: Low Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
- LDSC: Linkage Disequilibrium Score, σκορ ανισορροπίας σύνδεσης
- LS: Lumbar Spine, οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης
- MAF: Minor Allele Frequency, συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου
- MHC: Major Histocompatibility Complex, μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας
- NHANES III: Third National Health and Nutrition Examination Survey

- NHGRI-EBI: National Human Genome Research - European Bioinformatics Institute
- PRS: Polygenic Risk Score, πολυγονιδιακό σκορ κινδύνου
- QALYs: Quality Adjusted Life Years, ποιοτικά προσαρμοσμένα έτη ζωής
- QUI: Quantitative Ultrasound Index, ποσοτικός δείκτης υπερήχων
- SD: Standard Deviation, τυπική απόκλιση
- SNIIPA: Single Nucleotide Polymorphisms Annotator, εργαλείο σχολιασμού μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism, μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός
- SOS: Speed of Sound, ταχύτητα του ήχου
- TGFβ: Transforming Growth Factor beta, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
- TSH: Thyroid Stimulating Hormone, θυρεοτρόπος ορμόνη
- T2D: Type 2 Diabetes, διαβήτης τύπου 2
- UK NHS: United Kingdom National Health Service, Εθνική Υπηρεσία Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας
- V: variance, διακύμανση
- V<sub>A</sub>: additive variance, αθροιστική διακύμανση
- V<sub>D</sub>: dominant variance, επικρατής διακύμανση
- V<sub>E</sub>: environmental variance, περιβαλλοντική διακύμανση
- V<sub>G</sub>: genetic variance, γενετική διακύμανση
- V<sub>I</sub>: epistatic variance, διακύμανση επίστασης
- V<sub>P</sub>: phenotypic variance, φαινοτυπική διακύμανση
- WB: Weight Bearing, φερόντων βάρος
- WGCNA: Weighted Genes Co-expression Network Analysis, ανάλυση δικτύων σταθμισμένης συνέκφρασης γονιδίων
- WGS: Whole Genome Sequencing, αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος
- WHO: World Health Organization, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
- WHR: Waist Hip Ratio, λόγος περιφέρειας μέσης ισχίου

## 1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1. Η ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

#### 1.1.1. Διαταραχές των οστών και ορισμός της οστεοπόρωσης

Οι διαταραχές των οστών αποτελούν ένα σύνολο διαταραχών που επηρεάζουν τη δομή και το μεταβολισμό του σκελετού (1). Η πιο συχνή οστική διαταραχή είναι η οστεοπόρωση. Το 1993, διατυπώθηκε με διεθνή συναίνεση, ο ακόλουθος ορισμός της οστεοπόρωσης: *“Η οστεοπόρωση είναι μία συστηματική σκελετική νόσος που χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη οστική μάζα και/ή επηρεασμένη ποιότητα των οστών που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη οστική ευθραυστότητα και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων χαμηλής βίας”* (2).

#### 1.1.2. Βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα ή προ-οστεοβλάστες (**Εικόνα 1**) (3). Στη συνέχεια, οι προ-οστεοβλάστες διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες οι οποίοι μπορούν να παραμείνουν στην επιφάνεια των οστών ως κύτταρα επένδυσης ή ενσωματώνονται στο εσωτερικό των οστών ως οστεοκύτταρα. Επιπλέον, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών μπορεί να διαφοροποιηθούν σε δενδριτικά κύτταρα ή μονοκύτταρα/μακροφάγα. Τα τελευταία κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προ-οστεοκλάστες και στη συνέχεια σε οστεοκλάστες. Η αναδιαμόρφωση των οστών βασίζεται σε μία δυναμική ισορροπία μεταξύ οστικής απορρόφησης από τους οστεοκλάστες και οστικού σχηματισμού από τους οστεοβλάστες.

Η χαμηλή οστική μάζα μπορεί να είναι αποτέλεσμα διάφορων παθογενετικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν: i) αποτυχία επίτευξης μέγιστης οστικής μάζας κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης, ii) αυξημένη οστική απορρόφηση ή iii) επηρεασμένος οστικός σχηματισμός (4). Με εξαίρεση τις σπάνιες οστικές διαταραχές που επηρεάζουν τη δομή της οστικής θεμέλιας ουσίας (π.χ. ατελής οστεογένεση) ή το μεταβολισμό της βιταμίνης D (π.χ. ραχίτιδα), οι περισσότερες διαταραχές που συνοδεύονται από χαμηλή οστική μάζα είναι αποτέλεσμα ανισορροπίας μεταξύ απορρόφησης και σχηματισμού οστού. Συγκεκριμένα, μετά την πέμπτη δεκαετία της ζωής η οστική απορρόφηση υπερβαίνει τον οστικό σχηματισμό ως αποτέλεσμα ανεπάρκειας οιστρογόνων στις γυναίκες, ανεπάρκειας ασβεστίου ή/και των διαδικασιών που σχετίζονται με τη γήρανση οδηγώντας σε απώλεια οστού, οστεοπενία ή οστεοπόρωση (5). Υπάρχουν 5 κύρια βιολογικά μονοπάτια που είναι σημαντικά για τον οστικό μεταβολισμό (6, 7).

#### *1.1.2.1. Μονοπάτι διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων*

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Πολυάριθμοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι RUNX2, Osterix (Osx), SOX9 μπορούν να προκαλέσουν τη διαφοροποίηση των ανωτέρω κυττάρων σε οστεοβλάστες.

#### *1.1.2.2. Μονοπάτι WNT*

Το μονοπάτι WNT διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην οστική ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, καθώς επίσης στον οστικό σχηματισμό και την απορρόφηση κατά τη μετέπειτα ζωή. Οι WNTs είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη

διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των οστεοκυττάρων. Υπάρχουν αρκετά μονοπάτια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τις πρωτεΐνες WNTs μεταξύ των οποίων το πιο σημαντικό είναι το μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -catenin.

Αυτό το μονοπάτι ενεργοποιείται όταν οι πρωτεΐνες WNTs συνδέονται με τους μεμβρανικούς υποδοχείς Frizzled και την πρωτεΐνη LRP5/6. Στη συνέχεια, η σταθεροποιημένη  $\beta$ -κατενίνη μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες LEF1/TCF και ξεκινά η μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Αρκετά γονίδια που έχουν αναγνωρισθεί από μελέτες ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος (Genome Wide Association, Studies, GWAS), σχετίζονται με διάφορες οστικές παραμέτρους και εμπλέκονται στο μονοπάτι WNT, όπως *LRP5*, *WNT16*, *AXIN1*, *CTNNB1*, *DKK1*, *WLS*, *LPR4*, *MEF2C*, *RSPO3*, *SERP4*, *SNT16*, *SOST*, *WNT4*, *WNT5B* και *EN1*.

#### 1.1.2.3. Μονοπάτι NOTCH

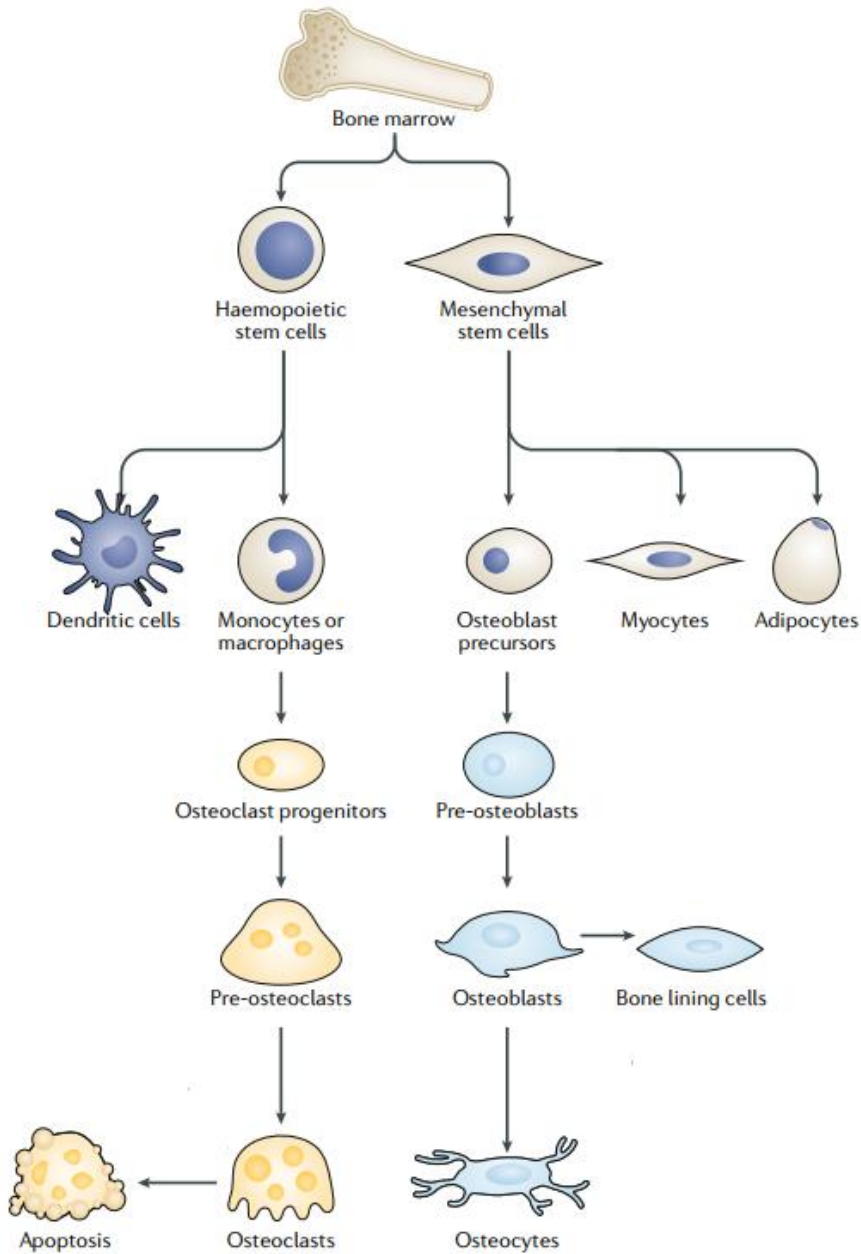
Το μονοπάτι NOTCH είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών (8). Οι πρωτεΐνες NOTCH είναι μία οικογένεια 4 διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση με πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων (9). Σε αυτή την περίπτωση προκαλείται πρωτεολυτική διάσπαση και απελευθέρωση της ενδοκυττάριας περιοχής τους η οποία εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και ξεκινά η μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Διάφορα γονίδια που σχετίζονται με την οστική πυκνότητα, εμπλέκονται με αυτό το μονοπάτι, όπως τα *JAG1*, *MAPT* και *NOTCH2*.

#### 1.1.2.4. Μονοπάτι *Indian Hedgehog*

Το μονοπάτι *Indian Hedgehog* ρυθμίζει την πορεία των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, καθώς επίσης τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων στην ενήλικη ζωή (10). Αυτό το μονοπάτι είναι σημαντικό για την οστεοποίηση των οστών του κρανίου αλλά και άλλων οστών του σκελετού. Κατά τη διάρκεια της ενδοχονδρικής οστεοποίησης, τα χονδροκύτταρα διέρχονται από ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο πρόγραμμα πολλαπλασιασμού, υπερτροφίας και απόπτωσης και τελικά αντικαθίστανται από οστεοβλάστες στα κέντρα οστεοποίησης (10). Αρκετά GWAS γονίδια που σχετίζονται με διάφορες οστικές παραμέτρους, εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι, όπως τα *WNT1*, *WNT4*, *WNT5b*, *WNT16*, *DHH* και *PTCH1*.

#### 1.1.2.5. Μονοπάτι *RANK/RANKL/OPG*

Το μονοπάτι *RANK/RANKL/OPG* ρυθμίζει κατά κύριο λόγο τη δράση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών (11). Οι οστεοβλάστες εκκρίνουν το μόριο *RANKL* το οποίο συνδέεται με το μόριο *RANK* στην επιφάνεια των μονοκυττάρων με αποτέλεσμα διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Το μόριο *OPG* που εκκρίνεται επίσης από τους οστεοβλάστες είναι υποδοχέας του *RANKL* και εμποδίζει την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών ανταγωνιζόμενος τη σύνδεση των μορίων *RANK* και *RANKL*. Το μονοπάτι *RANK/RANKL/OPG* έχει επιπρόσθετες λειτουργίες εκτός από την οστική αναδιαμόρφωση, όπως η ασβεστοποίηση των αγγείων και η συσχέτιση διαβήτη και καρκίνου.



**Εικόνα 1.** Διαδικασία διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών.

Πηγή: Yang TL, Shen H, Liu A, Dong SS, Zhang L, Deng FY, Zhao Q, Deng HW. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2020 Feb;16(2):91-103.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι συγκεντρώσεις των μορίων OPG και RANKL βρίσκονται σε ισορροπία. Ωστόσο, υπό παθολογικές καταστάσεις ή κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης, μειώνεται η συγκέντρωση του μορίου OPG και συνεπώς υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση του RANKL που οδηγεί σε διαφοροποίηση/ενεργοποίηση

των οστεοκλαστών και συστηματική ή τοπική οστική απορρόφηση. Τα γονίδια *TNFRSF11* (RANKL), *TNFRSF11A* (RANK) και *TNFSF11B* (OPG) είναι από τα πρώτα γονίδια που βρέθηκε ότι σχετίζονται με την οστεοπόρωση.

### **1.1.3. Επιδημιολογία της οστεοπόρωσης και των οστεοπορωτικών καταγμάτων**

Εκτιμάται ότι 22 εκατομμύρια γυναίκες και 5,5 εκατομμύρια άντρες είχαν οστεοπόρωση το 2010 στην Ευρώπη, με τον επιπολασμό της νόσου να είναι 6,6% και 22,1% σε άντρες και γυναίκες, ηλικίας 50 ετών και άνω, αντίστοιχα (**Πίνακας 1**) (12). Κατά τη διαστρωμάτωση του πληθυσμού σε ηλικιακές ομάδες των 5 ετών, ο μεγαλύτερος αριθμός αντρών και γυναικών με οστεοπόρωση παρατηρήθηκε στην ομάδα 60-64 ετών (περίπου 800.000) και 75-79 ετών (περίπου 3.900.000), αντίστοιχα. Εκτιμάται ότι ο αριθμός των ατόμων με οστεοπόρωση θα αυξηθεί κατά 23%, από 28 εκατομμύρια το 2010 σε 34 εκατομμύρια το 2025.

Λόγω της συστηματικής φύσης της οστεοπόρωσης, η σχετιζόμενη αύξηση του κινδύνου κατάγματος επηρεάζει σχεδόν όλες τις σκελετικές θέσεις και κυρίως τη σπονδυλική στήλη, το ισχίο, το άπω αντιβράχιο και το εγγύς βραχιόνιο οστό (13). Η πιθανότητα εμφάνισης κατάγματος σε οποιαδήποτε από τις ανωτέρω θέσεις σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (περίπου 12%) υπερβαίνει εκείνη του καρκίνου του μαστού (14). Επιπλέον, εκτιμάται ότι ο αριθμός αντρών και γυναικών στην Ευρώπη, ηλικίας 50 ετών και άνω, με προηγούμενο κάταγμα ισχίου ή σπονδυλικής στήλης είναι 3,3 ή 3,5 εκατομμύρια, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ο αριθμός νέων καταγμάτων το 2010 στην Ευρώπη υπολογίστηκε σε 3,5 εκατομμύρια, με τα 2/3 αυτών να παρατηρούνται σε γυναίκες, ενώ αναμένεται αύξηση αυτών σε 4,5 εκατομμύρια το 2025. Στην Ελλάδα, η ετήσια επίπτωση κατάγματος ισχίου σε άντρες και γυναίκες



υπολογίστηκε σε 247/100.000 άτομα που αντιστοιχεί σε μετρίου βαθμού κίνδυνο σε σχέση με άλλες χώρες του κόσμου (**Εικόνα 2**) (15).

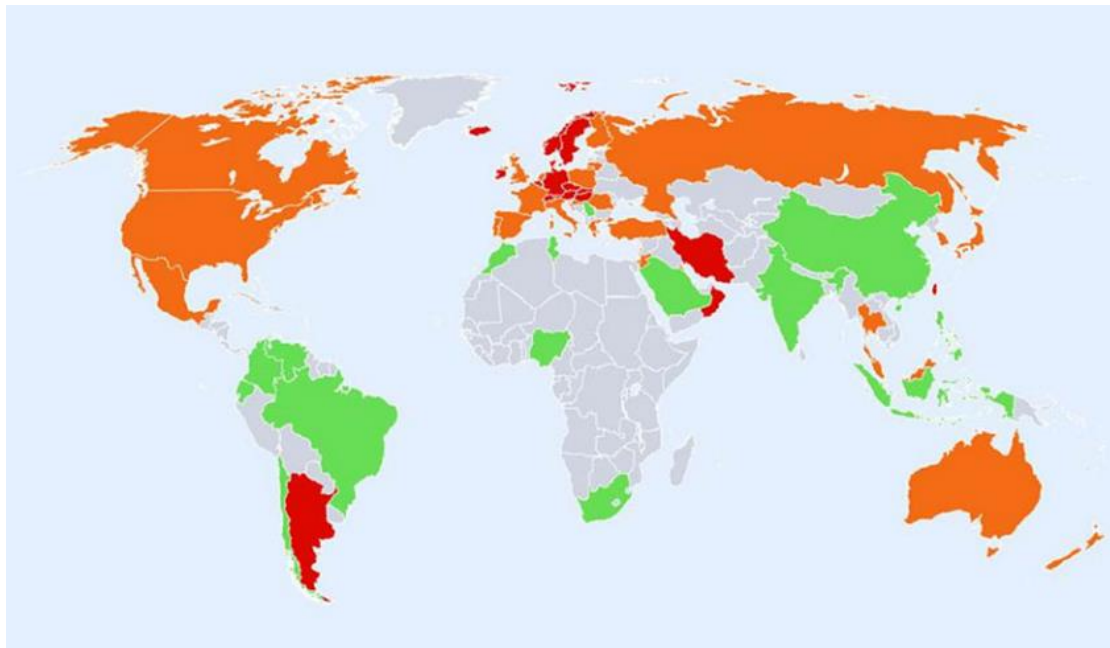
Η επιβάρυνση της οστεοπόρωσης στην υγεία για την Ευρώπη, υπολογίζεται σε απώλεια 1.180.000 ποιοτικά προσαρμοσμένων ετών ζωής (Quality Adjusted Life Years, QALYs), με την πλειονότητα αυτών να είναι αποτέλεσμα προηγούμενων καταγμάτων. Σημειώνεται ότι στην Ευρώπη, η οστεοπόρωση αντιπροσωπεύει την απώλεια περισσότερων προσαρμοσμένων στην ανικανότητα ετών ζωής (Disability Adjusted Life Years, DALYs) σε σχέση με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, αλλά λιγότερα από την οστεοαρθρίτιδα. Ειδικότερα, τα κατάγματα ισχίου σχετίζονται με σημαντική απώλεια DALYs (16). Επιπρόσθετα, η επιβάρυνση της οστεοπόρωσης στην υγεία είναι μεγαλύτερη σε σχέση με όλους τους τύπους καρκίνου, με εξαίρεση τον καρκίνο του πνεύμονα (17).

Το κόστος της οστεοπόρωσης στην Ευρώπη το 2010 εκτιμήθηκε σε 37 δισεκατομμύρια ευρώ, με το κόστος της θεραπείας των καταγμάτων να αντιπροσωπεύει 66% αυτών των δαπανών, η φαρμακολογική πρόληψη 5% και η μακροχρόνια φροντίδα κατάγματος 29%. Σημειώνεται ότι τα κατάγματα ισχίου αντιπροσωπεύουν 54% του κόστους (12).

**Πίνακας 1.** Εκτιμώμενος αριθμός αντρών και γυναικών με οστεοπόρωση στον αυχένα της κεφαλής του μηριαίου οστού και επιπολασμός σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών στην Ευρώπη, 2010.

Ηλικία (έτη)	Άτομα με οστεοπόρωση (000)			Πληθυσμός σε κίνδυνο (000)			Επιπολασμός (%)		
	Γυναίκες	Άντρες	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	Σύνολο
50-54	1.106	429	1.535	17.556	17.152	34.708	6,3	2,5	4,4
55-59	1.578	547	2.125	16.434	15.637	32.071	9,6	3,5	6,6
60-64	2.188	826	3.014	15.302	14.242	29.544	14,3	5,8	10,2
65-69	2.523	818	3.341	12.489	11.054	23.543	20,2	7,4	14,2
70-74	3.409	777	4.186	12.217	9.967	22.184	27,9	7,8	18,9
75-79	3.876	768	4.644	10.335	7.459	17.794	37,5	10,3	26,1
80+	7.350	1.325	8.675	15.573	7.980	23.553	47,2	16,6	36,8
50+	22.029	5.491	27.520	99.906	83.491	183.397	22,1	6,6	15,0

Πηγή: Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos. 2013;8(1-2):136.



**Εικόνα 2.** Ποσοστά κατάγματος ισχίου σε άντρες και γυναίκες προσαρμοσμένα για ηλικία και φύλο σε διάφορες χώρες του κόσμου. Όπου υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα, οι χώρες έχουν κόκκινο χρώμα (ετήσια επίπτωση >150/100.000), πορτοκαλί (100-150/100.000) ή πράσινο (<100/100.000).

Πηγή: Kanis JA, Odén A, McCloskey EV, Johansson H, Wahl DA, Cooper C; IOF Working Group on Epidemiology and Quality of Life. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. Osteoporos Int. 2012 Sep;23(9):2239-56.

#### 1.1.4. Μέτρηση και χρήση της οστικής πυκνότητας

Η οστική πυκνότητα (Bone Mineral Density, BMD) είναι η ποσότητα οστικής μάζας ανά μονάδα όγκου ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) ή ανά μονάδα επιφάνειας ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη μέτρηση της BMD αλλά οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες βασίζονται στην απορρόφηση των ακτίνων X από τα οστά και ιδιαίτερα στην απορρόφηση ακτίνων X διπλής ενέργειας (Dual-energy X-ray Absorptiometry, DXA) (**Εικόνα 3α**). Δεδομένου ότι η σάρωση είναι 2 διαστάσεων, υπολογίζεται η ποσότητα οστικής μάζας ανά μονάδα επιφάνειας.

Οι προτεινόμενες σκελετικές θέσεις για μέτρηση της BMD είναι η οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (Lumbar Spine, LS) και το ισχίο [ολικό ισχίο και αυχένιας κεφαλής μηριαίου οστού (Femoral Neck, FN)] (18, 19). Συνιστάται η ταυτόχρονη μέτρηση και των 2 σκελετικών θέσεων. Ωστόσο, σε ηλικιωμένα άτομα, η ακρίβεια των μετρήσεων στη σπονδυλική στήλη μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως σκολίωση, παραμόρφωση σπονδύλων, οστεόφυτα, εξωσκελετική ασβεστοποίηση και συνεπώς συστήνεται μέτρηση της BMD μόνο στο ισχίο. Ωστόσο, οι μετρήσεις της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρακολούθηση αποτελεσματικότητας της αντι-οστεοπορωτικής θεραπείας δεδομένου ότι είναι ευαίσθητες στις αλλαγές που προκαλούνται από τη θεραπεία.

Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μετρηθεί η BMD στο αντιβράχιο, όπως για παράδειγμα πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, παχυσαρκία με σωματικό βάρος που υπερβαίνει το όριο του ειδικού τραπεζιού σάρωσης, ανατομικές

δυσκολίες (π.χ. σκολίωση, σπονδυλαρθρίτιδα) ή δυσκολία ερμηνείας των αποτελεσμάτων μέτρησης σε ισχίο και σπονδυλική στήλη.

Μία άλλη μέθοδος μέτρησης της BMD αποτελεί το υπερηχογράφημα το οποίο εκτιμάει τη μετάδοση ηχητικών κυμάτων υψηλής συχνότητας (**Εικόνα 3β**) (20, 21). Συχνή περιοχή μέτρησης της BMD με υπερηχογράφημα αποτελεί η πτέρνα. Εκτιμώνται οι παράμετροι εξασθένηση υπερήχων ευρείας ζώνης (Broadband Ultrasound Attenuation, BUA), ταχύτητα του ήχου (Speed Of Sound, SOS) και ποσοτικός δείκτης υπερήχων (Quantitative Ultrasound Index, QUI). Η τελευταία παράμετρος αποτελεί συνδυασμό των BUA και SOS. Στη συνέχεια, το λογισμικό σύστημα του υπερηχογραφήματος υπολογίζει αυτόματα την αντίστοιχη BMD από την τιμή QUI.

Σημαντικά πλεονεκτήματα του υπερηχογραφήματος αποτελούν η έλλειψη ακτινοβολίας, το χαμηλό κόστος, η ταχύτητα της εξέτασης (10 δευτερόλεπτα), η δυνατότητα μεταφοράς της συσκευής (10 kg), καθώς επίσης η δυνατότητα χρησιμοποίησης για την εκτίμηση του κινδύνου κατάγματος σε ηλικιωμένους άντρες και γυναίκες (22-24). Ωστόσο, σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν το γεγονός ότι ο ορισμός της οστεοπόρωσης από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) βασίζεται σε μετρήσεις BMD με βάση τη μέθοδο DXA στο ισχίο, τη σπονδυλική στήλη ή το αντιβράχιο, καθώς επίσης η κατά βάση μέτρια συσχέτιση των μετρήσεων υπερηχογραφήματος και DXA (συντελεστής συσχέτισης 0,20-0,63) (25, 26). Συνεπώς, το υπερηχογράφημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση που δεν είναι διαθέσιμες οι μετρήσεις με DXA, καθώς επίσης σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες.

Η αξιολόγηση της BMD αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για τη διαχείριση της οστεοπόρωσης και χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της νόσου, την πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης οστεοπόρωσης, την επιλογή ασθενών για θεραπεία, καθώς επίσης την παρακολούθηση των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία (27). Μία επιπλέον πολύ σημαντική χρήση της BMD είναι η παροχή προγνωστικών πληροφοριών για μελλοντικό κίνδυνο κατάγματος (28, 29). Σημαντικός περιορισμός της BMD είναι το γεγονός ότι τα περισσότερα κατάγματα χαμηλής βίας εμφανίζονται σε άτομα χωρίς οστεοπόρωση και μερικά από αυτά σε άτομα χωρίς έστω ελαττωμένη BMD (30).



**Εικόνα 3.** Μέτρηση της BMD και άλλων οστικών παραμέτρων με α) DXA και β) υπερηχογράφημα.

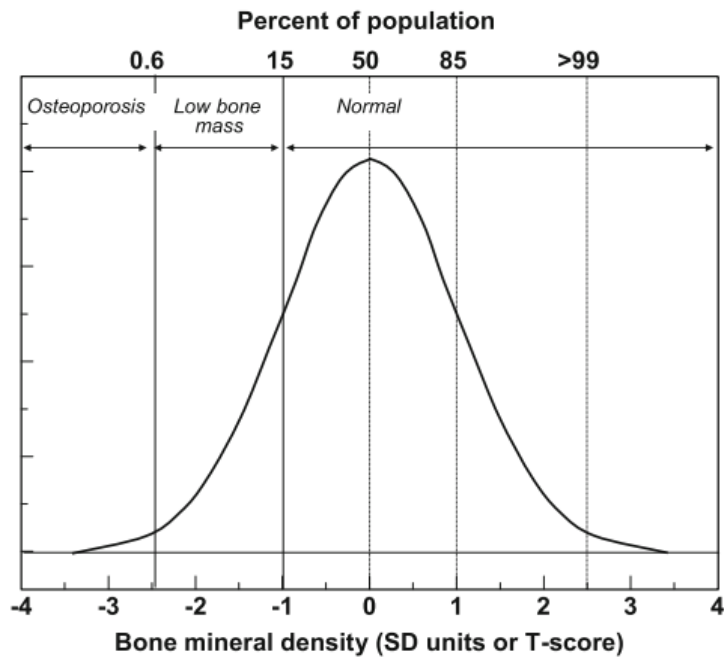
### 1.1.5. Διάγνωση της οστεοπόρωσης

Τα κριτήρια για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης προτάθηκαν από τον WHO το 1994 και βασίζονται στη μέτρηση της BMD η οποία περιγράφεται ως T-score ή Z-score (31). Σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άντρες  $\geq 50$  ετών, η οστεοπόρωση διαγιγνώσκεται όταν η BMD είναι τουλάχιστον 2,5 τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation, SD) μικρότερη από τη μέση τιμή που αναμένεται σε νεαρά, υγιή άτομα (T-

score  $\leq -2,5$  SD). Επίσης, η διάγνωση της οστεοπενίας τίθεται όταν το T-score είναι μεταξύ  $-1$  και  $-2,5$  SD (**Εικόνα 4**). Σημειώνεται ότι ο πληθυσμός αναφοράς είναι λευκές γυναίκες ηλικίας 20-29 ετών από τη μελέτη Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) με μετρήσεις για τη FN-BMD (32). Τα ανωτέρω όρια αφορούσαν αρχικά μετρήσεις της BMD στη σπονδυλική στήλη, το ισχίο ή το αντιβράχιο, ενώ στη συνέχεια, λόγω περισσότερων στοιχείων επικύρωσης, προτάθηκε η μέτρηση της BMD στο ισχίο με DXA για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης (33, 34).

Σε προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άντρες  $< 50$  ετών, η διάγνωση της οστεοπόρωσης βασίζεται σε μετρήσεις της BMD, καθώς επίσης σε πρόσθετες ενδείξεις μειωμένης οστικής αντοχής, όπως ιστορικό κατάγματος ή νόσοι που σχετίζονται με αυξημένο καταγματικό κίνδυνο (18). Σε αυτές τις περιπτώσεις, προτιμάται ο υπολογισμός του Z-score από το T-score. Συγκεκριμένα, το Z-score περιγράφει τον αριθμό των SD που διαφέρει η BMD ενός ατόμου από τη μέση τιμή που αναμένεται για την ηλικία και το φύλο. Η ορολογία για αυτές τις ηλικίες είναι: BMD κατώτερη της αναμενόμενης ηλικιακής διακύμανσης όταν  $Z\text{-score} < -2,0$  και BMD εντός της αναμενόμενης ηλικιακής διακύμανσης όταν  $Z\text{-score} > -2,0$ .

Ωστόσο, το T-score αυτών των ατόμων μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο κατά τη μακροχρόνια παρακολούθηση ειδικά αν αυτοί οι ασθενείς θα λάβουν τελικά αντι-οστεοπορωτική αγωγή η οποία θα διαρκέσει και μετά την ηλικία των 50 ετών. Επιπλέον, ένα T-score  $< -2,5$  στο ισχίο ή στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης σε συνδυασμό με μία χρόνια ασθένεια που επηρεάζει το μεταβολισμό των οστών μπορεί να υποδηλώνει οστεοπόρωση σε αυτά τα άτομα (35).



**Εικόνα 4.** Κατανομή της BMD σε νέες, υγιείς γυναίκες και τιμές κατωφλίου για οστεοπόρωση και ελαττωμένη οστική μάζα.

Πηγή: Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos. 2013;8(1-2):136.

## 1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

### 1.2.1. Γενετική αρχιτεκτονική των διάφορων φαινοτύπων

Η συχνότητα αλληλομόρφου και το φάσμα των μέτρων επίδρασης των υπεύθυνων γενετικών πολυμορφισμών [μεταλλάξεις ή μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)] διαμορφώνουν τη γενετική αρχιτεκτονική ενός φαινοτύπου (Εικόνα 5) (6). Ειδικότερα, οι πολυμορφισμοί με πολύ μικρή συχνότητα (συχνότητα αλληλομόρφου <1%) αποκαλούνται μεταλλάξεις και σχετίζονται με μεντελιανούς/μονογονιδιακούς φαινοτύπους. Αυτοί οι πολυμορφισμοί ασκούν μεγάλη επίδραση στο φαινότυπο, συνήθως εμφανίζονται σε οικογένειες και η συμμετοχή του περιβάλλοντος είναι μικρή.

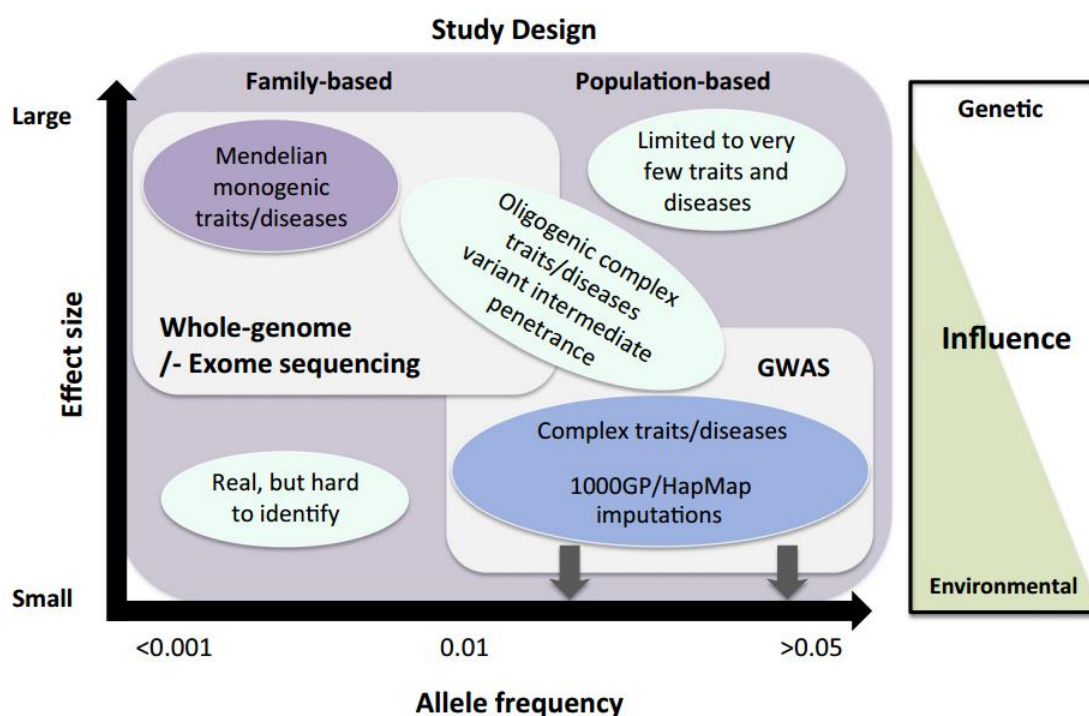
Η αναζήτηση των ανωτέρω σπάνιων πολυμορφισμών έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία με την πραγματοποίηση μελετών γενετικής διασύνδεσης (genetic linkage studies) (36). Πιο πρόσφατα, μελέτες που εξετάζουν την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδιώματος (whole exome studies) και μελέτες αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS studies) αποτελούν επί του παρόντος την κύρια προσέγγιση για διερεύνηση αυτών των φαινοτύπων (37-39). Σημειώνεται ότι οι μονογονιδιακοί φαινότυποι οφείλονται συνήθως σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδιώματος.

Οι σύνθετοι φαινότυποι είναι συνήθως συχνοί και μελετώνται σε μεγάλους πληθυσμούς. Για την εύρεση των υπεύθυνων πολυμορφισμών χαμηλής συχνότητας (συχνότητα αλληλομόρφου 1-5%) αλλά και των περισσότερο συχνών (>5%), χρησιμοποιούνται μελέτες GWA που εφαρμόζουν μεθοδολογία αντικατάστασης ελλειπουσών τιμών (imputation) από πρότυπες ακολουθίες (40). Αυτοί οι



πολυμορφισμοί έχουν ασθενή επίδραση στο φαινότυπο, η συμμετοχή του περιβάλλοντος είναι μεγάλη και συνήθως επηρεάζουν την έκφραση ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος. Έχει καταστεί προφανές ότι για τους περισσότερους σύνθετους φαινοτύπους η υποκείμενη γενετική αιτιολογία περιλαμβάνει εκατοντάδες (αν όχι χιλιάδες) πολυμορφισμούς (41-43).

Υπάρχουν λίγα παραδείγματα συχνών πολυμορφισμών που ασκούν μεγάλες επιδράσεις σε σύνθετους φαινοτύπους (π.χ. γονίδιο *CFH* στη μυωπία και *APOE* στη νόσο Alzheimer). Επιπλέον, υπάρχουν σπάνιοι πολυμορφισμοί με ασθενείς επιδράσεις οι οποίες όμως είναι απίθανο να εντοπιστούν με τις τρέχουσες μεθόδους σε ανθρώπινους πληθυσμούς.



**Εικόνα 5.** Γενετική αρχιτεκτονική των διάφορων φαινοτύπων.

Πηγή: Rivadeneira F, Mäkitie O. Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. *Trends Endocrinol Metab.* 2016 May;27(5):262-281.

### 1.2.2. Διακύμανση και κληρονομησιμότητα της οστικής πυκνότητας

Η κληρονομησιμότητα (heritability) αποτελεί την εκτιμώμενη γενετική επίδραση στη διακύμανση (variance,  $V$ ) ενός φαινοτύπου (44). Το 1918, ο Ronald Fisher εισήγαγε την έννοια της διακύμανσης και τη μέθοδο ανάλυσης της διακύμανσης (45). Για ένα συνεχή φαινότυπο  $X$ , ο οποίος υποθέτουμε ότι έχει κανονική κατανομή, η συνολική φαινοτυπική διακύμανση (phenotypic variance,  $V_P$ ) περιλαμβάνει στοιχεία περιβαλλοντικής (environmental variance,  $V_E$ ) και γενετικής διακύμανσης (genetic variance,  $V_G$ ). Η γενετική διακύμανση μπορεί περαιτέρω να διαιρεθεί σε: i) αθροιστική (additive variance,  $V_A$ ) που αποτελεί τις μέσες επιδράσεις των επιμέρους γενετικών τόπων οι οποίες προστίθενται αθροιστικά, ii) επικρατή (dominant variance,  $V_D$ ) που αποτελεί τις αλληλεπιδράσεις των αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο και iii) διακύμανση επίστασης (epistatic variance,  $V_I$ ) που αποτελεί τις αλληλεπιδράσεις των αλληλομόρφων μεταξύ διαφορετικών γενετικών τόπων:

$$V_P = V_A + V_D + V_I + V_E$$

Η κληρονομησιμότητα με την ευρεία έννοια του όρου ( $H^2$ ), αποτελεί το ποσοστό της φαινοτυπικής διακύμανσης ( $V_P$ ) που αποδίδεται σε όλες τις γενετικές επιδράσεις ( $V_G$ ):

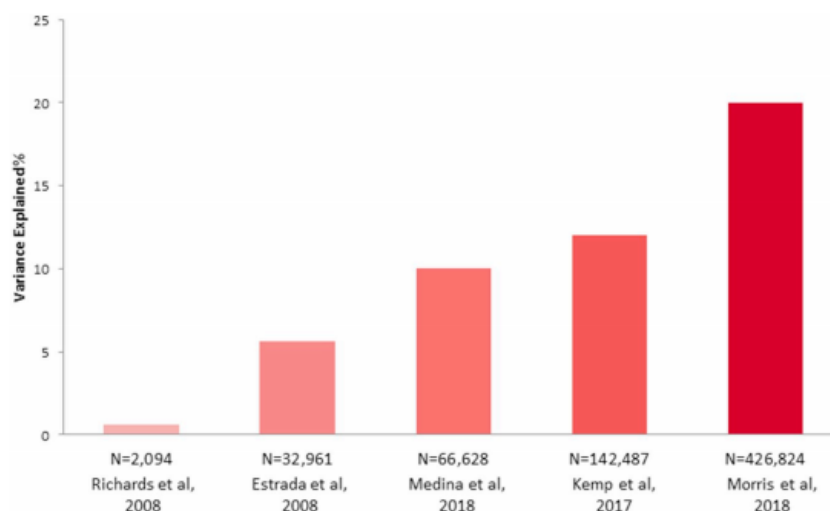
$$H^2 = V_G/V_P$$

Η κληρονομησιμότητα με την πιο περιορισμένη έννοια του όρου ( $h^2$ ), χρησιμοποιείται πιο συχνά και αντιπροσωπεύει το ποσοστό της φαινοτυπικής διακύμανσης ( $V_P$ ) που καθορίζεται μόνο από τις αθροιστικές γενετικές επιδράσεις ( $V_A$ ):

$$h^2 = V_A/V_P$$

Για κοινές ασθένειες, οι εκτιμήσεις της κληρονομησιμότητας χρησιμοποιούνται συχνά προκειμένου να προσδιοριστεί αν οι γενετικές προσεγγίσεις είναι επαρκώς ισχυρές ώστε να εντοπίσουν πολυμορφισμούς που συμβάλλουν στον κίνδυνο εμφάνισης μίας ασθένειας.

Οι γενετικοί παράγοντες εξηγούν περίπου 20% διακύμανσης της BMD (**Εικόνα 6**) (7) το οποίο είναι έως και διπλάσιο από αυτό που μπορεί να εξηγηθεί από παράγοντες όπως η ηλικία ή το σωματικό βάρος (46). Επιπρόσθετα, οι διάφορες οστικές παράμετροι παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό κληρονομησιμότητας, όπως η BMD ( $h^2=50-80\%$ ) (47, 48), η γεωμετρία των οστών ( $h^2=30-70\%$ ) (49), οι μετρήσεις με υπερηχογράφημα ( $h^2=40-50\%$ ) (48) ή οι μετρήσεις της οστικής μικροαρχιτεκτονικής με υψηλής ανάλυσης περιφερική ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (High Resolution - peripheral Quantitative Computed Tomography, HR-pQCT) ( $h^2=20-80\%$ ) (50).



**Εικόνα 6.** Διακύμανση της BMD με βάση μελέτες GWA.

Πηγή: Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Oct 9;11:556610.

### 1.2.3. Γενετικές μελέτες της οστεοπόρωσης

#### 1.2.3.1. Εισαγωγή των μελετών GWA στο πεδίο της οστεοπόρωσης

Οι μελέτες γενετικής διασύνδεσης και οι μελέτες υποψήφιων γονιδίων (candidate gene association studies) αποτέλεσαν τις πρώτες γενετικές μελέτες στον τομέα της οστεοπόρωσης. Ωστόσο, αποδείχθηκαν χαμηλής ισχύος (51) και περιορίστηκαν από την τεχνολογία γονοτύπησης, εξετάζοντας μόνο ένα μικρό αριθμό πολυμορφισμών σε χρονικό διάστημα μηνών έως ετών. Μία από τις λίγες εξαιρέσεις αποτέλεσαν οι μεγάλης έκτασης προσπάθειες (n=20.000 – 45.000) στο πλαίσιο του συνασπισμού Genetic Markers of Osteoporosis (GENOMOS) οι οποίες ανέδειξαν διάφορους πολυμορφισμούς στα γονίδια *ESR1*, *VDR*, *COL1A1*, *TGFB1* και *LRP5/6* (52-56).

Είναι γνωστό ότι οι μελέτες GWA έφεραν επανάσταση στο πεδίο γενετικής της οστεοπόρωσης (57-59). Ειδικότερα, η εφαρμογή γενετικής ανάλυσης σε μεγάλη κλίμακα μαζί με τη γνώση από το πρόγραμμα HarMap (60), επέτρεψαν την προσαρμογή της μεθοδολογίας GWAS στην ήδη καθιερωμένη γνώση από το συνασπισμό GENOMOS οδηγώντας στη δημιουργία του συνασπισμού Genetic Factors for Osteoporosis (GEFOS). Οι μελέτες GWA διερευνούν τη συσχέτιση μεταξύ εκατομμύριων πολυμορφισμών και διάφορων φαινοτύπων χωρίς πρωταρχικές υποθέσεις όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πολυμορφισμών (61, 62). Οι περισσότερες μελέτες GWA έχουν μεγάλα μεγέθη δείγματος και έχουν πραγματοποιηθεί στο πλαίσιο συνεργασίας διάφορων ερευνητικών ομάδων (63). Το μέγεθος δείγματος εξακολουθεί να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα με αποτέλεσμα την εύρεση μόνο ενός μικρού ποσοστού όλων των πολυμορφισμών που αναμένεται να σχετίζονται με ένα σύνθετο φαινότυπο.

Το αυστηρό όριο στατιστικής σημαντικότητας σε επίπεδο μελετών GWA ( $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ , genome-wide significant) έχει γίνει αποδεκτό για την εξαίρεση τυχαίων ευρημάτων λόγω πολλαπλών διορθώσεων (ψευδώς θετικά). Παρόλα αυτά, ένα σημαντικό ποσοστό άλλων πραγματικών πολυμορφισμών δεν έχει ακόμα εντοπιστεί σε αυτό το όριο λόγω έλλειψης ισχύος (ψευδώς αρνητικά). Εκτιμάται ότι το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής διακύμανσης ενός φαινοτύπου μπορεί να ταυτοποιηθεί με ακόμα μεγαλύτερα μεγέθη δείγματος στο πλαίσιο προσπαθειών που συνδυάζουν μεθοδολογία GWAS και μεθοδολογία αντικατάστασης ελλειπουσών τιμών (64).

#### 1.2.3.2. Η μελέτη UK Biobank

Η UK Biobank είναι μία μεγάλη, προοπτική, πληθυσμιακή μελέτη κοόρτης στη Μεγάλη Βρετανία με στόχο τη διερεύνηση του ρόλου των περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στην αιτιολογία σημαντικών ασθενειών στη μέση προς προχωρημένη ηλικία, όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις, εγκεφαλικό επεισόδιο, διαβήτης, αρθρίτιδα, οστεοπόρωση, οφθαλμικές διαταραχές, κατάθλιψη και άνοια (65). Το χρονικό διάστημα 2006 έως 2010, κλήθηκαν να συμμετάσχουν άτομα ηλικίας 40-69 ετών που ήταν εγγεγραμμένα στην Εθνική Υπηρεσία Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας (United Kingdom National Health Service, UK NHS) και ζούσαν έως και 25 μίλια από ένα από τα 22 κέντρα αξιολόγησης της μελέτης. Εστάλησαν περίπου 9,2 εκατομμύρια προσκλήσεις και στρατολογήθηκαν περισσότεροι από

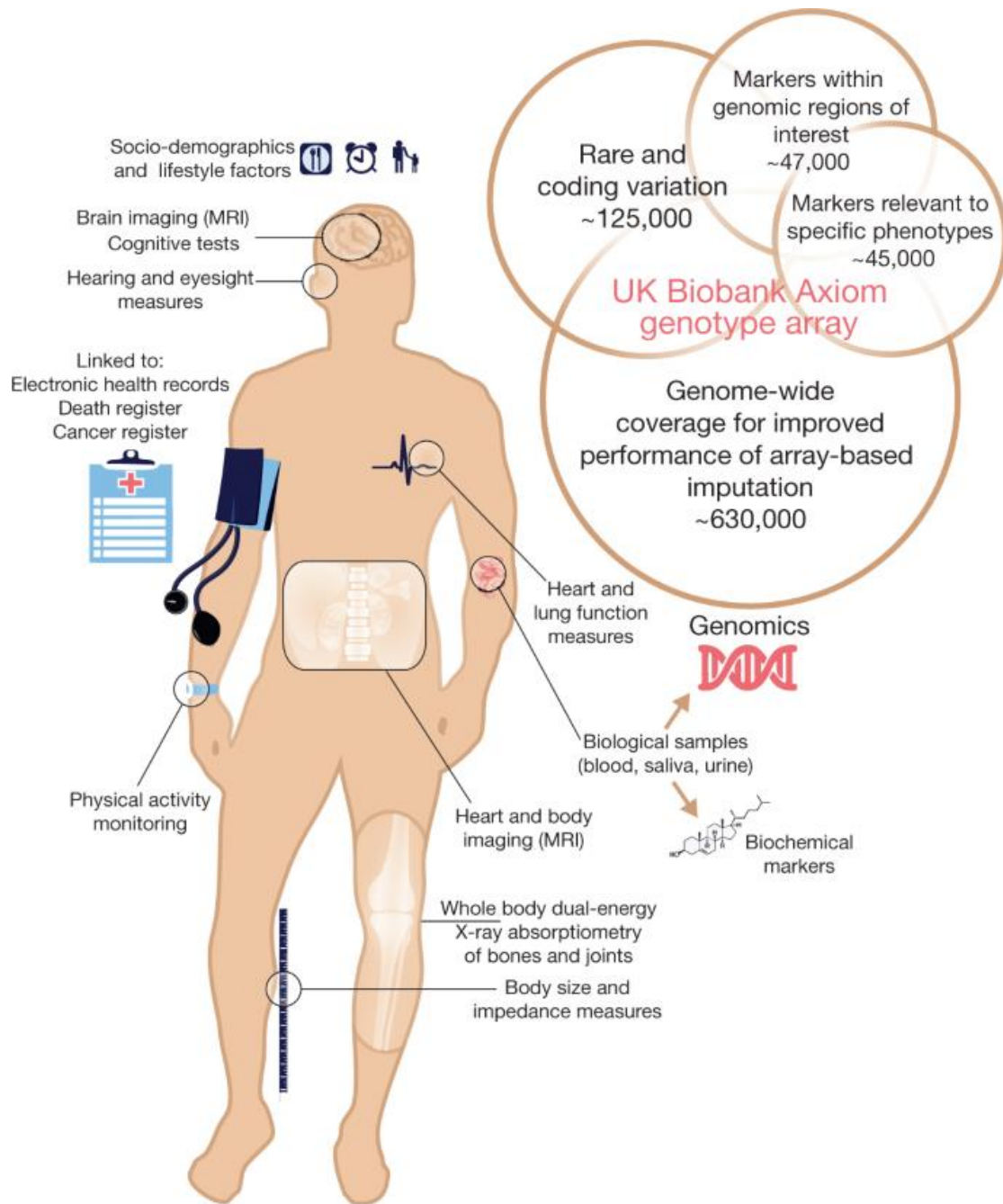
500.000 συμμετεχόντων (ποσοστό απόκρισης 5,5%, μέση ηλικία 56,5 έτη, 54,4% γυναίκες, 94,4% λευκή φυλή).

Οι αρχικές επισκέψεις διήρκεσαν περίπου 90 λεπτά και περιλάμβαναν 6 στάδια: συγκατάθεση, συμπλήρωση ερωτηματολογίου σε οθόνη αφής (πληροφορίες για κοινωνικούς και δημογραφικούς παράγοντες, τρόπο ζωής, ιατρικό ιστορικό), προφορική συνέντευξη, μετρήσεις οφθαλμών, ανθρωπομετρικές μετρήσεις και συλλογή βιολογικών δειγμάτων (αίμα, ούρα, σίελο) (**Εικόνα 7**) (65). Η μακροχρόνια παρακολούθηση των εκβάσεων πραγματοποιείται μέσω σύνδεσης με τα εθνικά δεδομένα υγείας και με διαδικτυακά ερωτηματολόγια. Το χρονικό διάστημα 2012 έως 2013, πραγματοποιήθηκε επαναληπτική αξιολόγηση των ίδιων παραμέτρων σε περίπου 20,000 συμμετέχοντες.

Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα πάνελ αναφοράς (περιλαμβάνοντας δεδομένα GWAS και δεδομένα εξωνίων), καθώς επίσης με εφαρμογή της μεθοδολογίας αντικατάστασης ελλειπουσών τιμών με βάση τα δεδομένα αλληλούχισης από τα προγράμματα 1000 Genomes και UK10K (66, 67). Σημειώνεται ότι η UK Biobank περιέχει γενετικά δεδομένα από 488.377 συμμετέχοντες (65).

Η UK Biobank έχει λάβει ηθική έγκριση από την Εθνική Υπηρεσία Δεοντολογίας Έρευνας του NHS (17 Ιουνίου 2011, Ref 11/NW/0382). Επιπρόσθετα, οι

διαδικασίες της μελέτης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ηθικές αρχές για την ιατρική έρευνα της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν γραπτή συναίνεση για τη συμμετοχή τους.



**Εικόνα 7.** Περιγραφή των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στη μελέτη UK Biobank.

Πηγή: Bycroft C, Freeman C, Petkova D, Band G, Elliott LT, Sharp K, Motyer A, Vukcevic D, Delaneau O, O'Connell J, Cortes A, Welsh S, Young A, Effingham M, McVean G, Leslie S, Allen N, Donnelly P, Marchini J. The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature*. 2018 Oct;562(7726):203-209.



### 1.2.3.3. Κοινοί πολυμορφισμοί υπεύθυνοι για την οστεοπόρωση

Την τελευταία δεκαετία πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες GWA στο πεδίο της οστεοπόρωσης, καθώς επίσης μετα-αναλύσεις μελετών GWA σε πληθυσμούς με ολόένα αυξανόμενα μεγέθη και έχουν εντοπιστεί περισσότεροι από 500 γενετικοί τόποι για τη BMD (68-81).

Το 2008, 2 μελέτες GWA εντόπισαν συνολικά 5 πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τη BMD στο γενικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα, οι Richards *et al.* (68) περιέγραψαν 2 πολυμορφισμούς στα γονίδια *LRP5* και *TNFRSF11B* (OPG) σε 8.557 άτομα. Επιπλέον, οι Styrkársdóttir *et al.* (69) εντόπισαν 4 πολυμορφισμούς στα γονίδια *TNFRSF11B* (OPG), *ESR1*, *ZBTB40* και στη γενετική περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) σε 13.786 άτομα. Η ίδια ομάδα αύξησε το μέγεθος δείγματος το επόμενο έτος (15.375 άτομα) και εντόπισε πρόσθετους BMD πολυμορφισμούς που αντιστοιχούσαν στα γονίδια *TNFRSF11A* (RANK), *SOST*, *MARK3* και *SP7* (osterix) (82). Το τελευταίο γονίδιο (*SP7*) περιγράφεται επίσης στην πρώτη BMD GWAS σε παιδιά (5.275 άτομα) (83). Επιπρόσθετα, οι Medina Gomez *et al.* (84) ταυτοποίησαν πολυμορφισμούς στο γονίδιο *WNT16* που σχετίζονται με τη BMD στα παιδιά.

Η πρώτη μετα-ανάλυση του συνασπισμού GEFOS πραγματοποιήθηκε το 2009 (19.195 άτομα) και εντόπισε 13 νέους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τη BMD (70), ενώ ακολούθησε μία δεύτερη μετα-ανάλυση (32.961 άτομα στη φάση ανακάλυψης) η οποία περιέγραψε 32 νέους BMD πολυμορφισμούς (83.894 άτομα συνολικά) (73). Επιπλέον, οι Medina Gomez *et al.* (79) πραγματοποίησαν το 2018

μετα-ανάλυση 30 μελετών GWA (66.628 άτομα συνολικά) και εντόπισαν 36 νέους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τη BMD.

Τρεις πρόσφατες μελέτες χρησιμοποίησαν δεδομένα της μελέτης UK Biobank και μελέτησαν την εκτιμώμενη BMD (estimated BMD, eBMD) πτέρνας. Στην πρώτη μελέτη οι Kemp *et al.* (78) εντόπισαν 203 γενετικούς τόπους (153 νέοι) που σχετίζονται με την eBMD (142.487 άτομα) και στη συνέχεια ο αριθμός αυτός αυξήθηκε σε 518 γενετικούς τόπους (301 νέοι) (81). Μία επιπρόσθετη μελέτη εντόπισε 899 νέους BMD γενετικούς τόπους (613 νέοι), εφαρμόζοντας όμως λιγότερο αυστηρή ανάλυση λαμβάνοντας υπόψη τα πρωταρχικά ευρήματα (conditional analysis) (85).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των μελετών GWA έχει μελετήσει συχνούς πολυμορφισμούς με συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου (Minor Allele Frequency, MAF) >5%, εξηγώντας 10-20% της διακύμανσης των οστικών φαινοτύπων. Ωστόσο, πολλές πληροφορίες σχετικά με τη διακύμανση της BMD παραμένουν άγνωστες.

#### 1.2.3.4. Σπάνιοι πολυμορφισμοί υπεύθυνοι για την οστεοπόρωση

Μία προσέγγιση διερεύνησης της ελλείπουσας κληρονομησιμότητας της BMD είναι η μελέτη σπάνιων πολυμορφισμών σε άτομα με εξαιρετικά χαμηλή ή υψηλή BMD. Χρησιμοποιώντας μεθοδολογία WGS και αντικατάσταση ελλειπουσών τιμών, ένας σπάνιος νέος πολυμορφισμός (MAF=0,17%) συσχετίστηκε με χαμηλή BMD (4.931 άτομα με χαμηλή BMD και 69.034 άτομα χωρίς χαμηλή BMD) ως αποτέλεσμα μετάλλαξης στο γονίδιο *LGR4* (86). Μερικά χρόνια αργότερα, η ίδια ομάδα

χρησιμοποιώντας επίσης μεθοδολογία WGS και αντικατάσταση ελλειπουσών τιμών, εντόπισε 2 νέες σπάνιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *COL1A2* που σχετίζονται με χαμηλή BMD (2.984 άτομα με χαμηλή BMD και 206.675 χωρίς χαμηλή BMD) σε άτομα χωρίς ατελή οστεογένεση.

Το 2018, οι Gregson *et al.* (87) μελέτησαν 240 άτομα με εξαιρετικά υψηλή BMD ( $Z\text{-score} \geq 3,2$ ), καθώς επίσης 1.955 γυναίκες με υψηλή BMD (1.055 άτομα) ή χαμηλή BMD (900 άτομα). Βρέθηκαν 2 νέοι πολυμορφισμοί κοντά στο γονίδιο *NPR3* (MAF=0,33%) και το γονίδιο *SPON1* (MAF=0,17%) που σχετίζονται με τη BMD. Επιπρόσθετα, οι Zheng *et al.* (75) χρησιμοποίησαν μεθοδολογία WGS και εντόπισαν ένα νέο σπάνιο πολυμορφισμό στο γονίδιο *EN1* που σχετίζονται με τη BMD (53.236 άτομα).

#### 1.2.3.5. Μονογονιδιακές μορφές της οστεοπόρωσης

Έχουν περιγραφεί αρκετές μονογονιδιακές μορφές οστεοπόρωσης στις οποίες η νόσος προκαλείται από μία μόνο μετάλλαξη σε ένα γονίδιο που έχει σημαντικό ρόλο στο σκελετό, για παράδειγμα στη σύνθεση πρωτεΐνης της θεμέλιας ουσίας, την ομοιοστασία των μετάλλων ή σε άλλα μονοπάτια σηματοδότησης που είναι σημαντικά για την σκελετική ομοιοστασία (6). Ωστόσο πρόκειται για σπάνιες διαταραχές των οστών και οι υπεύθυνες μεταλλάξεις εξηγούν μόνο ένα μικρό ποσοστό διακύμανσης της BMD και του κινδύνου οστεοπόρωσης.

Η ατελής οστεογένεση είναι η πιο κοινή μονογονιδιακή διαταραχή που συνοδεύεται με σκελετική ευθραστότητα. Συνήθως προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια *COL1A1* ή *COL1A2* που κωδικοποιούν κολλαγόνο τύπου I το οποίο αποτελεί

την κύρια πρωτεΐνη της οστικής θεμέλιας ουσίας. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά των διάφορων οστικών μονοπατιών σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσουν σε φαινοτύπους που σχετίζονται με σκελετική ευθραυστότητα πρώιμης έναρξης ή αυξημένη οστική απώλεια. Ένα από τα πιο μελετημένα γονίδια που σχετίζονται με την οστεοπόρωση είναι το γονίδιο *LRP5* που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα που εμπλέκεται στο μονοπάτι WNT. Απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *LRP5* προκαλούν το σύνδρομο οστεοπόρωση – ψευδογλίωμα (osteoporosis – pseudoglioma syndrome) που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και χαρακτηρίζεται από σοβαρή οστεοπόρωση στην παιδική ηλικία και τύφλωση (88).

Επιπρόσθετα, ελαττώματα στις ρυθμιστικές οδούς ομοιοστασίας του ασβεστίου και του φωσφόρου ή στην ίδια τη διαδικασία οστικής επιμετάλλωσης μπορεί να οδηγήσουν σε ποικίλου βαθμού οστική ευθραυστότητα. Η πιο σοβαρή από αυτές είναι η υποφωσφατασία που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης. Κυμαίνεται κλινικά από σχεδόν πλήρη απώλεια της σκελετικής επιμετάλλωσης και περιγεννητικό θάνατο έως ήπια οστεομαλακία έναρξης στην ενήλικη ζωή (89).

#### 1.2.3.6. Άλλοι πολυμορφισμοί υπεύθυνοι για την οστεοπόρωση

Επιπρόσθετοι πολυμορφισμοί μπορούν να επηρεάσουν τη διακύμανση της BMD, όπως για παράδειγμα οι ποικιλομορφίες επαναληπτικών ακολουθιών (Copy Number Variations, CNVs) (90-92), καθώς επίσης επιγενετικές αλλαγές όπως η μεθυλίωση DNA (93-95) ή τα microRNAs (96, 97).

### 1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑ

#### 1.3.1. Εισαγωγή στη γενετική πλειοτροπία

Από τη δημοσίευση της πρώτης GWAS το 2005 (98), έχουν δημοσιευτεί περισσότερες από 3.000 GWAS για περισσότερους από 1.000 φαινοτύπους και δεκάδες χιλιάδες πολυμορφισμούς (99). Φαίνεται ότι η πλειοψηφία των φαινοτύπων επηρεάζεται από πολλούς πολυμορφισμούς ο καθένας με μικρή επίδραση (61, 100). Επιπλέον, πολλοί πολυμορφισμοί σχετίζονται πλειοτροπικά με πολλαπλούς, μερικές φορές φαινομενικά διαφορετικούς, φαινοτύπους.

Ο όρος πλειοτροπία (pleiotropy) προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις πλεῖον (ουδέτερο του πλείων) και τροπία (<τρόπος<τρέπω). Για πρώτη φορά το 1866 ο Gregor Mendel παρατήρησε ότι ορισμένα χαρακτηριστικά του φυτού μπιζελιού (χρώμα καρπού, χρώμα λουλουδιού, θέση λουλουδιού) φαινόταν να κληρονομούνται μαζί. Παρόλα αυτά, η έννοια της πλειοτροπίας περιγράφηκε επίσημα αρκετά χρόνια αργότερα, το 1910, από το Γερμανό γενετιστή Ludwig Plate (101). Ο αρχικός ορισμός του Plate για την πλειοτροπία ήταν ο εξής: *“Καλώ πλειοτροπική μία κληρονομήσιμη μονάδα αν πολλά χαρακτηριστικά εξαρτώνται από αυτή. Αυτά τα χαρακτηριστικά στη συνέχεια θα εμφανίζονται πάντα μαζί και μπορεί επομένως να εμφανίζονται συσχετισμένα”*. Αυτός ο ορισμός χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα για να περιγράψει το βασικό μηχανισμό δράσης της πλειοτροπίας. Σημειώνεται ότι προτού η γενετική αρχίσει να κερδίζει έδαφος, η πλειοτροπία μελετήθηκε σε μοντέλα οργανισμών και σε πιο θεωρητικό επίπεδο στην εξελικτική βιολογία.

Η γενετική πλειοτροπία αναφέρεται στο φαινόμενο κατά το οποίο ένας πολυμορφισμός σχετίζεται με 2 ή περισσότερους φαινοτύπους (ασθένειες ή ποσοτικά χαρακτηριστικά) (102). Τα ακόλουθα κριτήρια αποκλεισμού έχουν προταθεί για την απόκτηση πιο συντηρητικής εκτίμησης της πλειοτροπίας που δεν επηρεάζεται από έντονα σχετιζόμενους φαινοτύπους (103): i) οι φαινότυποι σχετίζονται παθοφυσιολογικά (π.χ. συγκεντρώσεις ουρικού οξέος στον ορό και ουρική αρθρίτιδα), ii) ένας φαινότυπος είναι υποσύνολο του άλλου (π.χ. νόσος του Crohn και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου), iii) ένας φαινότυπος χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του άλλου [π.χ. συγκεντρώσεις λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein, LDL) και τριγλυκεριδίων], iv) οι φαινότυποι είναι παρόμοιοι ή έντονα σχετιζόμενοι ώστε να αποτελούν μέτρα του ίδιου γενετικού αποτελέσματος (π.χ. BMD στη σπονδυλική στήλη και το ισχίο, ασβέστιο και φώσφορος ορού, ειδικό προστατικό αντιγόνο ορού και καρκίνος προστάτη), v) ο ένας φαινότυπος είναι γνωστός αιτιακός (causal) παράγοντας κινδύνου για τον άλλο (συγκεντρώσεις LDL ορού και έμφραγμα μυοκαρδίου).

### **1.3.2. Έκταση της γενετικής πλειοτροπίας**

Σε μία προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού της έκτασης της πλειοτροπίας, πραγματοποιήθηκε συστηματική αξιολόγηση όλων των πολυμορφισμών από μελέτες GWA που δημοσιεύθηκαν έως το 2011 και σχετίζονταν με περισσότερους από έναν φαινοτύπους (103). Βρέθηκαν πλειοτροπικά στοιχεία για 233 (16,9%) γονίδια και 77 (4,6%) SNPs που περιλαμβάνονταν στον National Human Genome Research - European Bioinformatics Institute (NHGRI-EBI) Κατάλογο, ο οποίος αποτελεί συλλογή

όλων των δημοσιευμένων μελετών GWA που περιγράφουν τις συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών και φαινοτύπων σε επίπεδο  $p\text{-value} < 10^{-5}$  (99, 104).

Τα πλειοτροπικά SNPs ήταν συχνότερα σε περιοχές εξωνίων (14,5% έναντι 4,9%) και λιγότερο συχνά μεταξύ των γονιδίων (15,8% έναντι 23,6%). Τα δεδομένα δεν υποστηρίζουν την αρχική υπόθεση ότι τα πλειοτροπικά SNPs είναι πιθανότερο να βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές σε σχέση με μη πλειοτροπικά SNPs. Αποδείχθηκε επίσης ότι τα πλειοτροπικά γονίδια είναι μακρύτερα από τα μη πλειοτροπικά γονίδια. Πράγματι τα πλειοτροπικά γονίδια ενδέχεται να κωδικοποιούν αυξημένο αριθμό πρωτεϊνών οι οποίες με τη σειρά τους είναι υπεύθυνες για πολλαπλές λειτουργίες. Επίσης, τα μακρύτερα γονίδια τείνουν να περιέχουν περισσότερους πολυμορφισμούς με ταυτόχρονη αύξηση της πιθανότητας για ορισμένους από αυτούς να εμπλέκονται σε διαφορετικές λειτουργίες.

Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε επικαιροποίηση των στοιχείων έκτασης της πλειοτροπίας, αξιολογώντας 4.155 GWAS που περιλάμβαναν 2.965 φαινοτύπους (<https://atlas.ctglab.nl>) (105). Το μέσο μέγεθος δείγματος για τις δεκτές μελέτες GWA ήταν 56.250 άτομα με μέγιστη τιμή 898.130 άτομα για το φαινότυπο διαβήτη τύπου 2. Για κάθε φαινότυπο, επιλέχθηκε η GWAS με το μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος με αποτέλεσμα να συμπεριληφθούν 558 GWAS που αναφέρονταν σε 558 φαινοτύπους.

Βρέθηκε ότι οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με κάποιο φαινότυπο καλύπτουν περισσότερο από το ήμισυ του γονιδιώματος (60,1%) και το 90% αυτών αλληλεπικαλύπτονται με γενετικούς τόπους από άλλους διαφορετικούς φαινοτύπους. Οι πιθανοί αιτιακοί πολυμορφισμοί παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση σε κωδικοποιούσες, ρυθμιστικές και γειτονικές περιοχές (flanking regions). Βρέθηκε

επίσης ότι η πλειοτροπία σε επίπεδο γενετικού τόπου είναι αρκετά συχνή (90%), ενώ σε επίπεδο γονιδίου και πολυμορφισμού είναι λιγότερο συχνή (63% και 31%, αντίστοιχα). Τα γονίδια και οι πολυμορφισμοί με υψηλότερα επίπεδα πλειοτροπίας ήταν λιγότερο ειδικά όσον αφορά τη γονιδιακή έκφραση το οποίο υποδηλώνει ότι πιθανώς εμπλέκονται σε γενικές βιολογικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της μεταγραφής.

### 1.3.3. Τύποι γενετικής πλειοτροπίας

Σύμφωνα με τους Solovieff *et al.* (102), έχουν περιγραφεί 3 διαφορετικοί τύποι πλειοτροπίας: βιολογική (biological), μεσολαβούμενη (mediated) και ψευδής (spurious), οι οποίοι είναι σημαντικό να διακριθούν επειδή σχετίζονται με διαφορετικούς μοριακούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς.

Βιολογική πλειοτροπία παρατηρείται όταν ένας πολυμορφισμός έχει άμεση επίδραση σε περισσότερους από ένα φαινότυπο. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να παρατηρηθεί πλειοτροπία σε επίπεδο αλληλομόρφου οπότε ένας αιτιακός πολυμορφισμός σχετίζεται με πολλαπλούς φαινοτύπους (**Εικόνα 8a**) ή σε επίπεδο γονιδίου (ή γενετικής περιοχής) οπότε πολλαπλοί πολυμορφισμοί στο ίδιο γονίδιο (ή γενετική περιοχή) σχετίζονται με διαφορετικούς φαινοτύπους (**Εικόνα 8b,c**).

Κατά τους Solovieff *et al.* (102), μεσολαβούμενη πλειοτροπία παρατηρείται όταν ένας πολυμορφισμός σχετίζεται με ένα φαινότυπο ο οποίος με τη σειρά του σχετίζεται με ένα δεύτερο φαινότυπο (**Εικόνα 8d**). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η μεσολαβούμενη πλειοτροπία θεωρείται αληθής πλειοτροπία, ενώ στην πραγματικότητα έχει καθιερωθεί ότι δεν αποτελεί αληθή μορφή. Σημειώνεται ότι το

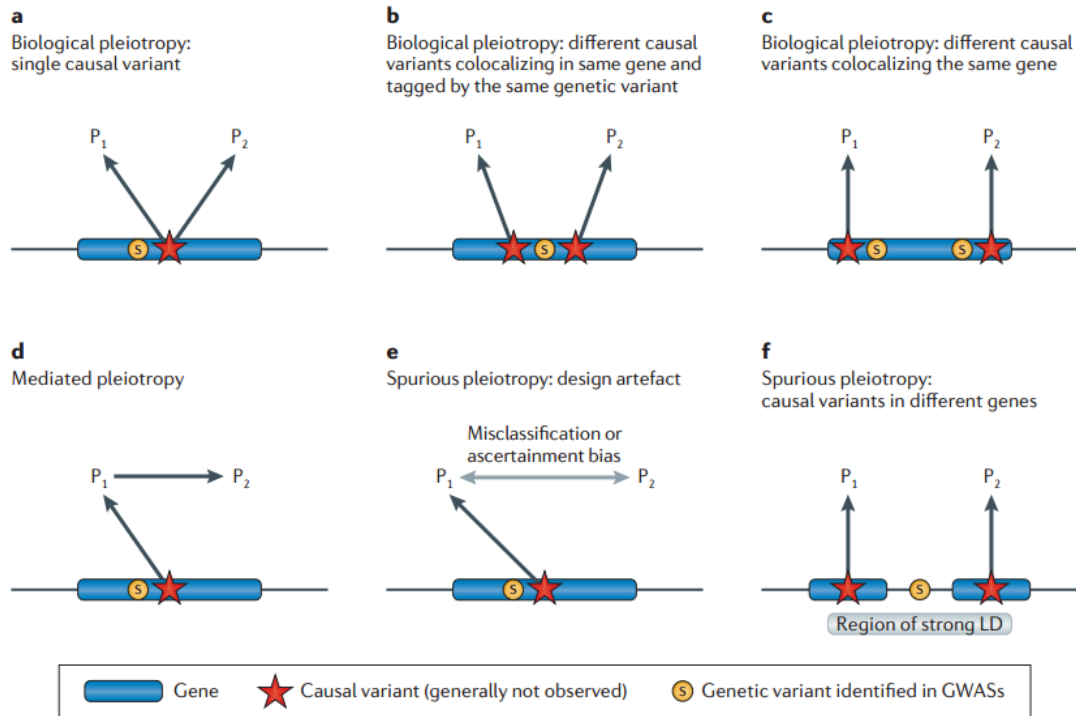


ανωτέρω μοντέλο σχέσης υποθέτουν οι μελέτες μεντελιανής τυχαιοποίησης (106, 107).

Ψευδής πλειοτροπία παρατηρείται όταν ένας πολυμορφισμός σχετίζεται ψευδώς με πολλούς φαινοτύπους λόγω διάφορων σφαλμάτων. Αυτά περιλαμβάνουν ελαττώματα στις μελέτες που εντοπίζουν τις πλειοτροπικές συσχετίσεις, όπως σφάλμα μεροληπτικής επιλογής συμμετεχόντων (ascertainment bias), δηλαδή στρατολόγηση ατόμων με μία ασθένεια αυξάνει την πιθανότητα παρουσίας μίας δεύτερης διαφορετικής ασθένειας επειδή τα άτομα που πάσχουν από 2 ασθένειες είναι πιο πιθανό να αναζητήσουν θεραπεία από εκείνους που πάσχουν από μία. Επιπλέον, η ψευδής πλειοτροπία μπορεί να περιλαμβάνει εσφαλμένη ταξινόμηση των φαινοτύπων (π.χ. σχιζοφρένεια και διπολική διαταραχή) ή κοινά άτομα χωρίς τον υπό εξέταση φαινότυπο (shared controls) (**Εικόνα 8e**).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε μελέτες GWA είναι πιθανό να μην είναι αιτιακοί. Αντίθετα, φαίνεται να σχετίζονται με το φαινότυπο επειδή βρίσκονται σε ισχυρή ανισοροπία σύνδεσης (LD) με τον πραγματικά αιτιακό πολυμορφισμό, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε ψευδή πλειοτροπικά ευρήματα (**Εικόνα 8f**). Επιπρόσθετα, αποτελεί κοινή προσέγγιση ο σχολιασμός (annotation) του πλησιέστερου γονιδίου στον πολυμορφισμό με τη χαμηλότερη τιμή p-value ως το πιθανότερο αιτιακό γονίδιο. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η φυσική απόσταση ενός πολυμορφισμού από ένα γονίδιο δεν αποτελεί ένδειξη αιτιότητας. Για αυτό το λόγο, έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός στατιστικών μεθόδων, καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε λεπτομερούς χαρτογράφησης

(fine-mapping) της περιοχής που περιλαμβάνει έναν πλειοτροπικό πολυμορφισμό προκειμένου να εντοπιστεί η παρουσία ψευδούς πλειοτροπίας (108).



**Εικόνα 8.** Τύποι γενετικής πλειοτροπίας.

Πηγή: Solovieff N, Cotsapas C, Lee PH, Purcell SM, Smoller JW. Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies. *Nat Rev Genet.* 2013 Jul;14(7):483-95.

#### **1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η αποσαφήνιση της αιτιολογίας της οστεοπόρωσης μέσω μελέτης της γενετικής πλειοτροπίας της νόσου. Η διδακτορική διατριβή επικεντρώνεται σε διαταραχές των οστών όπως αυτές εκφράζονται μέσω των φαινοτύπων της οστικής πυκνότητας και της οστεοπόρωσης. Η επιλογή μελέτης της οστικής πυκνότητας έγινε επειδή αποτελεί την κύρια παράμετρο διαχείρισης της οστεοπόρωσης, της πιο συχνής διαταραχής των οστών που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων χαμηλής βίας, σημαντικό οικονομικό κόστος και επηρεασμένη ποιότητα ζωής. Ειδικότερα, ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η αποτίμηση των πλειοτροπικών γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με ελαττωμένη οστική πυκνότητα και μη οστικές νόσους ή χαρακτηριστικά (φαινότυποι) μέσω ανασκόπησης της βιβλιογραφίας και μέσω μελέτης της πλειοτροπίας με ευρεία σάρωση του γονιδιώματος (genome-wide pleiotropy scan)



## **2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑ ΟΣΤΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ: ΔΙΔΑΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ**

#### **2.1.1. Εισαγωγή – Σκοπός**

Αν και οι σκελετικές ασθένειες περιλαμβάνουν ένα πλήθος φαινοτύπων, η οστεοπόρωση αποτελεί την πιο συχνή μεταβολική διαταραχή των οστών, με σημαντική επίπτωση στην ποιότητα ζωής, μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης και σημαντικό οικονομικό κόστος. Η BMD αποτελεί την κύρια παράμετρο για την αξιολόγηση και διαχείριση της οστεοπόρωσης.

Η γενετική πλειοτροπία περιγράφει τη συσχέτιση ενός πολυμορφισμού με 2 ή περισσότερους φαινοτύπους στους οποίους ασκεί άμεση επίδραση. Πληθώρα μελετών GWA έχουν δημοσιευτεί την τελευταία δεκαετία προσπαθώντας να περιγράψουν το γενετικό υπόβαθρο των διάφορων οστικών φαινοτύπων και να αξιολογήσουν τις πλειοτροπικές συσχετίσεις αυτών των φαινοτύπων με άλλες ασθένειες ή χαρακτηριστικά.

Συνεπώς, ο σκοπός της πρώτης μελέτης της διδακτορικής διατριβής είναι η πραγματοποίηση ανασκόπησης της βιβλιογραφίας και αποτίμηση των πρόσφατων δεδομένων γενετικής πλειοτροπίας για οστικούς φαινοτύπους (κυρίως σχετιζόμενοι με τη BMD ή την οστεοπόρωση) εντός και εκτός του μυοσκελετικού συστήματος.

## **2.1.2. Μέθοδοι**

### *2.1.2.1. Αναζήτηση βιβλιογραφίας*

Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση της βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων PubMed μέχρι τον Αύγουστο 2019 με βάση τον ακόλουθο αλγόριθμο: genetic\* AND (BMD OR bone OR osteoporosis). Έγιναν δεκτές μελέτες GWA οι οποίες δημοσιεύτηκαν μετά το 2014 και οι οποίες μελετούσαν την παρουσία γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ 2 ή περισσότερων φαινοτύπων (ασθένειες ή χαρακτηριστικά), ένας εκ των οποίων ήταν η BMD ή η οστεοπόρωση γενικότερα.

### *2.1.2.2. Πλειοτροπικές αναλυτικές μέθοδοι*

Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί για τον έλεγχο της πλειοτροπικής συσχέτισης μεταξύ ενός πολυμορφισμού και πολλαπλών φαινοτύπων (102, 109, 110). Μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες με βάση το επίπεδο στο οποίο αξιολογείται η γενετική αλληλοεπικάλυψη: σε επίπεδο γονιδιώματος, γενετικής περιοχής ή πολυμορφισμού. Βάσει του υποκείμενου στατιστικού πλαισίου, μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε μονομεταβλητές (univariate) ή πολυμεταβλητές (multivariate) μεθόδους.

Οι μονομεταβλητές προσεγγίσεις αναλύουν κάθε φαινότυπο ξεχωριστά σε διαφορετικούς πληθυσμούς και στη συνέχεια συνδυάζουν τα συνοπτικά μέτρα επίδρασης (summary statistics), με αποτέλεσμα να μην περιορίζονται από ζητήματα που σχετίζονται με την κοινή χρήση ατομικών δεδομένων (individual-level data). Επιπρόσθετα, καθώς οι επιμέρους γενετικές επιδράσεις για τους περισσότερους σύνθετους φαινοτύπους είναι μικρές, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων από

μελέτες διαφορετικών φαινοτύπων μπορεί να αυξήσει την ισχύ ανίχνευσης πλειοτροπικών συσχετίσεων.

Ωστόσο, η διαθεσιμότητα μεγάλης έκτασης γενετικών δεδομένων για πολλαπλούς φαινοτύπους επιτρέπει την εφαρμογή πολυμεταβλητών μεθόδων (111). Αυτές οι μέθοδοι αναλύουν από κοινού τη συσχέτιση ενός πολυμορφισμού με πολλαπλούς φαινοτύπους σε ένα ενοποιημένο πλαίσιο. Δεδομένου ότι απαιτούν την αξιολόγηση όλων των φαινοτύπων στο ίδιο άτομο, είναι κυρίως κατάλληλες για κοόρτες ή συγχρονικές μελέτες. Αυτό συνήθως δεν είναι εφικτό για φαινοτύπους με χαμηλό επιπολασμό οι οποίες μελετώνται κυρίως σε μελέτες δείκτου-ελέγχου.

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται ορισμένες αντιπροσωπευτικές πλειοτροπικές αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στον τομέα γενετικής επιδημιολογίας της BMD και της οστεοπόρωσης και οι οποίες έχουν εφαρμοστεί στις γενετικές μελέτες που περιγράφονται στη δεύτερη μελέτη της διατριβής.

#### 2.1.2.2.1. Μέθοδοι σε επίπεδο γονιδιώματος

Πριν την αξιολόγηση συγκεκριμένων πλειοτροπικών συσχετίσεων, οι μέθοδοι σε επίπεδο γονιδιώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αρχική αξιολόγηση της γενετικής αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των μελετούμενων φαινοτύπων.

**Πολυγονιακό σκορ κινδύνου (Polygenic Risk Score, PRS):** Ο γενετικός κίνδυνος ενός ατόμου να αναπτύξει ένα φαινότυπο μπορεί να εκφραστεί ως PRS (112). Οι πολυμορφισμοί που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή αυτής της βαθμολογίας επιλέγονται με βάση, μεταξύ άλλων παραμέτρων, της ισχυρής σχέσης με τον φαινότυπο υπό μελέτη. Μετά την κατασκευή και την επικύρωση του PRS, μπορεί να

πραγματοποιηθούν πιθανές συσχετίσεις με άλλους φαινοτύπους. Πλειοτροπικές προσεγγίσεις που βασίζονται σε PRS εφαρμόστηκαν σε 3 μελέτες που περιλαμβάνονται στην ανασκόπηση (113-115).

**Γενετική συσχέτιση (genetic correlation):** Η γενετική συσχέτιση αντιπροσωπεύει μία ποσοτική παράμετρο που υπολογίζει τη γενετική σχέση μεταξύ ζευγών φαινοτύπων (116). Μία σχεδόν μηδενική εκτίμηση γενετικής συσχέτισης μεταξύ 2 φαινοτύπων δε σημαίνει ότι δεν υπάρχουν κοινοί γενετικοί τόποι αλλά ότι δε συμφωνούν οι κατευθύνσεις των εκτιμώμενων επιδράσεων. Αν εκτιμηθεί μη μηδενική γενετική συσχέτιση μεταξύ 2 φαινοτύπων, τότε μπορούν να πραγματοποιηθούν περαιτέρω αναλύσεις (παρατίθενται παρακάτω) για τον εντοπισμό κοινών πολυμορφισμών. Μία δημοφιλής μονομεταβλητή μέθοδος για την εκτίμηση της γενετικής συσχέτισης είναι η παλινδρόμηση για το σκορ ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium Score, LDSC) (117, 118). Χρησιμοποιεί συνοπτικά μέτρα επίδρασης και λαμβάνει υπόψη πιθανή αλληλοεπικάλυψη των πληθυσμών μεταξύ διαφορετικών μελετών αλλά απαιτεί πολύ μεγάλα μεγέθη δείγματος. Η βάση δεδομένων LD Hub η οποία αποτελεί βάση συνοπτικών μέτρων επίδρασης, καθώς και διαδικτυακή πλατφόρμα ανάλυσης για LDSC, επιτρέπει συγκρίσεις μεταξύ διάφορων φαινοτύπων ((119).

Η ευρυγονιδιωματική ανάλυση πολυπαραγοντικών νοσημάτων (Genome-wide Complex Trait Analysis, GCTA) είναι μία άλλη πολυμεταβλητή μέθοδος για εκτίμηση της γενετικής συσχέτισης (120). Εκτιμάει τη διακύμανση που εξηγείται από όλα τα SNPs σε ένα χρωμόσωμα ή σε όλο το γονιδίωμα για ένα συγκεκριμένο φαινότυπο αντί να ελέγχεται η συσχέτιση ενός συγκεκριμένου SNP με τον φαινότυπο



υπό μελέτη. Η μέθοδος γενετικής συσχέτισης εφαρμόστηκε σε διάφορες μελέτες της ανασκόπησης (113, 121-127).

**ccFDR:** Το δεσμευμένο ποσοστό ψευδών ευρημάτων (conditional False Discovery Rate, cFDR) είναι μία μονομεταβλητή μέθοδος που ελέγχει τη συσχέτιση διαφόρων SNPs με ένα συγκεκριμένο φαινότυπο λαμβάνοντας υπόψη το βαθμό συσχέτισης με έναν άλλο φαινότυπο (128). Συνδυάζει τα συνοπτικά μέτρα επίδρασης από 2 ανεξάρτητες GWAS 2 σχετιζόμενων φαινοτύπων για τον υπολογισμό του cFDR για κάθε φαινότυπο. Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό συσχέτισης μεταξύ 2 φαινοτύπων, υπολογίζεται το από κοινού δεσμευμένο ποσοστό ψευδών ευρημάτων (conjunctional cFDR, ccFDR) που αποτελεί το μέγιστο cFDR στις 2 κατευθύνσεις. Ένας αριθμός μελετών που περιλαμβάνονται στην ανασκόπηση εφάρμοσαν αυτή τη μέθοδο (129-135).

**Πολυμεταβλητή GWAS:** Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ πολυμορφισμών και πολλαπλών φαινοτύπων. Αξιοσημείωτη είναι η μέθοδος empirical-weighted Linear-Combined (eLC) επειδή πραγματοποιεί διμεταβλητή (bivariate) GWAS επιτρέποντας μικτές κατευθύνσεις της επίδρασης (122). Τρεις μελέτες που περιγράφονται στην ανασκόπηση πραγματοποίησαν διμεταβλητή GWAS (122, 136, 137).

**GWAS look-up:** Σε GWAS look-up μελέτες, οι πολυμορφισμοί που σχετίζονται με άλλους φαινοτύπους σε προηγούμενες GWAS ελέγχονται για συσχέτιση με το φαινότυπο υπό μελέτη. Τέσσερις μελέτες που περιλαμβάνονται στην ανασκόπηση εφάρμοσαν αυτή τη μέθοδο (81, 125, 138, 139).

#### 2.1.2.2.2. Μέθοδοι σε επίπεδο γενετικής περιοχής

Αυτές οι μέθοδοι οργανώνουν τους πολυμορφισμούς σε ομάδες βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων, όπως ομάδες απλοτύπων (LD blocks) ή όρια των γονιδίων και στη συνέχεια ελέγχουν για πιθανές πλειοτροπικές συσχετίσεις σε κάθε ομάδα. Πλεονέκτημα αυτών των προσεγγίσεων είναι ότι μειώνουν το σφάλμα πολλαπλών συγκρίσεων που προκύπτει από αναλύσεις σε επίπεδο πολυμορφισμού.

**Ταυτόχρονη ανάλυση γειτονικών πολυμορφισμών (colocalization analysis):** Αυτή η μέθοδος είναι ιδανική για περαιτέρω αξιολόγηση της πιθανής πλειοτροπίας, δηλαδή αν ο ίδιος αιτιακός πολυμορφισμός είναι υπεύθυνος για το πλειοτροπικό αποτέλεσμα ή αν οφείλεται σε ξεχωριστούς αιτιακούς πολυμορφισμούς κοντά ο ένας στον άλλο (140). Πολλές από αυτές τις προσεγγίσεις απαιτούν συνοπτικά μέτρα επίδρασης για μία γενετική περιοχή που περιλαμβάνει τον υπό μελέτη πολυμορφισμό και για τους 2 υπό εξέταση φαινοτύπους. Μία μελέτη που συμπεριλήφθηκε στην ανασκόπηση πραγματοποίησε τη συγκεκριμένη μέθοδο (123).

#### 2.1.2.2.3. Μέθοδοι σε επίπεδο πολυμορφισμού

Δεδομένου ότι αυτές οι μέθοδοι εξετάζουν ξεχωριστά κάθε πολυμορφισμό, παρέχουν την υψηλότερη ανάλυση. Η γενετική ανάλυση που ενσωματώνει δεδομένα πλειοτροπίας και σχολιασμού (Genetic analysis incorporating Pleiotropy and Annotation, GPA) είναι μία μονομεταβλητή μέθοδος που ενσωματώνει ταυτόχρονα πολλαπλά δεδομένα GWAS και δεδομένα σχολιασμού (141). Η GPA πραγματοποιήθηκε σε μία μελέτη στην ανασκόπηση (133), σε συνδυασμό με τη μέθοδο ccFDR.

### 2.1.3. Αποτελέσματα

Τα διαθέσιμα γενετικά δεδομένα πλειοτροπίας της BMD μπορούν να ταξινομηθούν σε 2 κατηγορίες: πλειοτροπία εντός και πλειοτροπία εκτός του μυοσκελετικού συστήματος. Οι πιο πρόσφατες αντιπροσωπευτικές μελέτες συνοψίζονται στους **Πίνακες 2 και 3**, αντίστοιχα, καθώς και στην **Εικόνα 9**.

#### 2.1.3.1. Πλειοτροπία εντός του μυοσκελετικού συστήματος

Η μεγαλύτερη μελέτη εκτίμησης των πολυμορφισμών που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση κατάγματος πραγματοποιήθηκε από τους Trajanoska *et al.* (121). Σε αυτή τη μεγάλης έκτασης GWAS μετα-ανάλυση (περισσότερα από 500.000 άτομα και 185.000 περιπτώσεις κατάγματος), εντοπίστηκαν 15 πολυμορφισμοί για το κάταγμα οι οποίοι συσχετίστηκαν επίσης με την BMD. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η γενετική συσχέτιση του κατάγματος με 15 φαινοτύπους, συμπεριλαμβανόμενων των FN-BMD, LS-BMD, δύναμης δραγμού, ρευματοειδούς αρθρίτιδας και των επιπέδων στον ορό της 25-υδροξυβιταμίνης D (25OH βιταμίνη D). Διαπιστώθηκε ότι οι πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την BMD συσχετίστηκαν ισχυρά και αντίστροφα με τον κίνδυνο κατάγματος (η γενετική συσχέτιση ήταν -0,59 για τους FN-BMD πολυμορφισμούς,  $p\text{-value}=2 \times 10^{-24}$  και -0,53 για τους LS-BMD πολυμορφισμούς,  $p\text{-value}=1 \times 10^{-20}$ ).

Μία άλλη πρόσφατη μελέτη GWA σε 426.824 άτομα της UK Biobank, εντόπισε 518 γενετικούς τόπους (301 νέοι) σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  που εξηγούσαν το 20% διακύμανσης της BMD (81). Η ίδια μελέτη εντόπισε 13 γενετικούς τόπους κατάγματος σε περίπου 1,2 εκατομμύρια άτομα, πραγματοποιώντας GWAS που συνδύαζε τις μελέτες UK Biobank και 23andMe, οι οποίοι συνδέονταν επίσης με την BMD. Στη

συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων, καθώς επίσης απαλείψεις (knockouts) σε γονίδια στόχους ποντικών με αποτέλεσμα την εμφάνιση σκελετικών ανωμαλιών. Ειδικότερα, η απάλειψη του γονιδίου *DAAM2* οδήγησε σε αυξημένη πορωσιμότητα του οστικού φλοιού, μείωση της οστικής αντοχής και μειωμένη μεταλλοποίηση.

Επιπλέον, οι Medina-Gomez *et al.* (122) πραγματοποίησαν διμεταβλητή GWAS μετα-ανάλυση σε 10.414 παιδιά και εντόπισαν 8 πλειοτροπικούς γενετικούς τόπους για τους φαινοτύπους BMD και άλιπη σωματική μάζα (total-body lean mass). Από αυτούς, ο 17p11.2 ήταν ένας νέος γενετικός τόπος που δεν σχετίζονταν προηγουμένως με τους ανωτέρω φαινοτύπους. Λειτουργικά δεδομένα πρότειναν το γονίδιο *SREBF1* ως το πιο πιθανό γονίδιο υπεύθυνο για την ανωτέρω συσχέτιση. Το *SREBF1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SREBP-1, έναν μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση οστεοβλαστών και μυοβλαστών. Αυτή η μελέτη καταδεικνύει την αύξηση της ισχύος που επιτυγχάνεται κατά τη χρήση της διμεταβλητής προσέγγισης σε σύγκριση με την εξέταση κάθε φαινοτύπου ξεχωριστά, ειδικά για τις περιπτώσεις που ο υπεύθυνος πολυμορφισμός ασκεί αντίθετα αποτελέσματα στους εμπλεκόμενους φαινοτύπους.

Οι Hackinger *et al.* (123) πραγματοποίησαν την πρώτη μελέτη συσχέτισης της BMD και της οστεοαρθρίτιδας σε όλο το γονιδίωμα, χρησιμοποιώντας δεδομένα από τις 2 μεγαλύτερες GWAS αυτών των φαινοτύπων (GEFOS και arcOGEN, αντίστοιχα). Διαπιστώθηκαν 2 νέοι πολυμορφισμοί σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ , οι οποίοι ήταν ιντρόνια στο γονίδιο *SMAD3*. Το *SMAD3* είναι σημαντικό για την αναδιαμόρφωση των οστών και τη συντήρηση του χόνδρου. Λειτουργική ανάλυση επιβεβαίωσε έκφραση

του γονιδίου *SMAD3* στο χόνδρο γόνατος και ισχίου. Μία άλλη μελέτη εφάρμοσε τη μέθοδο ccFDR στα δεδομένα από μία μεγάλη GWAS για τη FN-BMD (53.236 άτομα) και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (80.799 άτομα) (129). Εντοπίστηκαν 30 νέοι κοινοί πολυμορφισμοί μεταξύ των 2 φαινοτύπων, 18 εκ των οποίων βρίσκονταν στην MHC περιοχή η οποία είναι σημαντική για το ανοσοποιητικό σύστημα και την υγεία των οστών.

Επιπλέον, οι Zhou *et al.* (113) μελέτησαν την ύπαρξη γενετικής συσχέτισης μεταξύ BMD και εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (Lumbar Disc Degeneration, LDD) σε Ευρωπαίους και Ασιάτες. Διαπίστωσαν ότι το PRS της LS-BMD σχετίζονταν σημαντικά με την LDD. Η μελέτη ανέδειξε επίσης θετική γενετική συσχέτιση μεταξύ LS-BMD και οστεοαρθρίτιδας, μία άλλη εκφυλιστική νόσο που έχει κοινά χαρακτηριστικά με την LDD. Τέλος, μία πολύ πρόσφατη ανασκόπηση συνοψίζει τα δεδομένα σχετικά με την γενετική συσχέτιση οστών και μυών στον άνθρωπο και περιγράφει πολλούς GWAS αλληλεπικαλυπτόμενους γενετικούς τόπους (142).

Συμπερασματικά, πρόσφατες μελέτες προτείνουν την παρουσία γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ της BMD και άλλων μυοσκελετικών φαινοτύπων, όπως κάταγμα, οστεοαρθρίτιδα, εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, άλιπη σωματική μάζα και ρευματοειδής αρθρίτιδα.

**Πίνακας 2.** Αντιπροσωπευτικές μελέτες γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ BMD και άλλων οστικών φαινοτύπων.

Συγγραφείς (Έτος)	Πλειοτροπικά γονίδια	Οστικός(οί) φαινότυπος(οι) αναφοράς	Άλλοι οστικοί φαινότυποι	Παρουσία πλειοτροπίας	Μέθοδος
Morris <i>et al.</i> (2019)	<i>AQP1, CCDC170, FAM210A, FGFR1, LINC01700, MBL2, PPP6R3, RSPO3, SLC8A1, SOST, STARD3NL, TMEM135, WNT16</i>	BMD (πτέρνα)	Κάταγμα	+	GWAS look-up
Trajanoska <i>et al.</i> (2018)	ΔΕ	BMD (FN, LS), δύναμη δραγμού, 25OH βιταμίνη D στον ορό, ρευματοειδής αρθρίτιδα	Κάταγμα	<sup>1+</sup>	Γενετική συσχέτιση (LDSC)
Zhou <i>et al.</i> (2018)	ΔΑ	BMD (FN, LS)	Εκφύλιση μεσοσπονδύλιου δίσκου στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, οστεοαρθρίτιδα	<sup>2+</sup>	PRS, γενετική συσχέτιση (LDSC)
Medina-Gomez <i>et al.</i> (2017)	<i>CPED1, GALNT3, LRP5, MEPE, PPP6R3, RIN3, SREBF1, TNFSF11, TOM1L2, WNT4, WNT16</i>	BMD (ολόκληρο το σώμα εκτός κεφαλής) στα παιδιά	Άλιπη σωματική μάζα στα παιδιά	+	Γενετική συσχέτιση (GCTA, LDSC), διμεταβλητή GWAS
Hackinger <i>et al.</i> (2017)	<sup>3</sup> Πολλαπλά γονίδια	BMD (FN, LS)	Οστεοαρθρίτιδα (ισχίο, γόνατο, συνδυασμός)	<sup>4+</sup>	Γενετική συσχέτιση (LDSC), ταυτόχρονη ανάλυση γειτονικών πολυμορφισμών
Zhou <i>et al.</i> (2017)	<i>BAT5, BOLL, BRD2, C2, C6orf10, C6orf125, EHD2, ETS1, FLI1, GRM4, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DQB2, INPP4B, LOC100132252, LY6G5C, MARS2, NOTCH4, PLCL1, PPP1R2P1, PTPN11, RFTN2, SKIV2L</i>	BMD (FN)	Ρευματοειδής αρθρίτιδα	+	ccFDR

**Συντομογραφίες:** BMD: Bone Mineral Density - οστική πυκνότητα, ccFDR: conjunctinal conditional False Discovery Rate - από κοινού δεσμευμένο ποσοστό ψευδών ευρημάτων, FN: Femoral Neck – αυχένιας κεφαλής μηριαίου οστού, GCTA: Genome-wide Complex Trait Analysis - ευρυγονιδιωματική ανάλυση πολυπαραγοντικών νοσημάτων, GWAS: Genome Wide Association Study – μελέτη ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος, LDSC: Linkage Disequilibrium Score - σκορ ανισορροπίας σύνδεσης, LS: Lumbar Spine – οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης, PRS: Polygenic Risk Score - πολυγονιδιακό σκορ κινδύνου, 25OH βιταμίνη D: 25-υδροξυβιταμίνη D, ΔΑ: δεν αναφέρεται, ΔΕ: δεν εφαρμόζεται.

#### **Σημειώσεις:**

<sup>1</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για κάταγμα - BMD (FN) και κάταγμα - BMD (LS).

<sup>2</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για BMD (LS) - εκφύλιση μεσοσπονδύλιου δίσκου στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και BMD (LS) - οστεοαρθρίτιδα.

<sup>3</sup>Τα πλειοτροπικά γονίδια αναφέρονται στον αντίστοιχο Συμπληρωματικό Πίνακα 6 του άρθρου των Hacking *et al.*

<sup>4</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για α) γενετική συσχέτιση (LDSC): BMD (LS) – οστεοαρθρίτιδα (συνδυασμός), β) ταυτόχρονη ανάλυση γειτονικών πολυμορφισμών: BMD (LS) – οστεοαρθρίτιδα (ισχίο, γόνατο, συνδυασμός), BMD (FN) – οστεοαρθρίτιδα (ισχίο, γόνατο).

Το σύμβολο “+” αντιπροσωπεύει παρουσία στατιστικά σημαντικών ευρημάτων υπέρ της ύπαρξης πλειοτροπίας μεταξύ των μελετούμενων φαινοτύπων, ενώ το σύμβολο “-” αντιπροσωπεύει απουσία στατιστικά σημαντικών ευρημάτων.

### 2.1.3.2. Πλειοτροπία εκτός του μυοσκελετικού συστήματος

#### 2.1.3.2.1. Παχυσαρκία

Οι Lee *at al.* (124) αξιολόγησαν τις συσχετίσεις διάφορων δεικτών παχυσαρκίας, όπως δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) και περιφέρεια μέσης προσαρμοσμένη για τον BMI (BMI-adjusted Waist Circumference, aWC), με τη BMD. Βρέθηκε ότι ο BMI, αλλά όχι η aWC, σχετίζονταν θετικά με τη BMD των φερόντων βάρους (weight bearing, WB) οστών, των μη-WB οστών και της πτέρνας αλλά όχι με τα οστά του κρανίου. Επιπρόσθετα, μία μελέτη GWA στόχευσε στον εντοπισμό πλειοτροπικών συσχετίσεων μεταξύ του λόγου περιφέρεια μέσης ισχίου (Waist Hip Ratio, WHR) και άλλων φαινοτύπων μέσω αναζήτησης στον NHGRI-EBI Κατάλογο και ανίχνευσε ένα πλειοτροπικό σήμα με τη BMD (138).

Μία άλλη μελέτη εφάρμοσε τη μέθοδο ccFDR σε GWAS δεδομένα για τον εντοπισμό κοινών πολυμορφισμών μεταξύ των φαινοτύπων FN-BMD και BMI ή FN-BMD και WHR (131). Βρέθηκαν 7 δυνητικά πλειοτροπικά γονίδια, με 3 από αυτά (*PUM1*, *PRDM6*, *XXYL1*), να μην έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες οστών ή παχυσαρκίας. Παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση του γονιδίου *PUM1* σε κύτταρα που σχετίζονται με την οστεοπόρωση (B λεμφοκύτταρα) και σε κύτταρα που σχετίζονται με την παχυσαρκία (λιποκύτταρα). Επίσης, η μέθοδος ανάλυση δικτύων σταθμισμένης συνέκφρασης γονιδίων (Weighted Genes Co-expression Network Analysis, WGCNA) έδειξε ότι το γονίδιο *PUM1* σχετίζεται με γνωστά γονίδια της οστεοπόρωσης (*AKAP11*, *JAG1*, *SPTBN1*).



#### 2.1.3.2.2. Καρδιαγγειακές παθήσεις και σχετιζόμενοι παράγοντες κινδύνου

Οι Hu *et al.* μελέτησαν τη γενετική συσχέτιση μεταξύ του διαβήτη τύπου 2 (Type 2 Diabetes, T2D) και της οστεοπόρωσης (130), η οποία προτάθηκε από παλαιότερες, λιγότερο ισχυρές μελέτες (143). Εφαρμόζοντας τη μέθοδο ccFDR, συνδυάστηκαν δεδομένα από ανεξάρτητες GWAS μετα-αναλύσεις και ταυτοποιήθηκαν 4 δυνητικά πλειοτροπικοί πολυμορφισμοί μεταξύ FN-BMD και T2D (γονίδια *PLEKHA1*, *TCF7L2*, *GNG12-AS1*, *WLS*, *PIFO*, *PGCP1*). Η λειτουργική ανάλυση πρότεινε το γονίδιο *PLEKHA1* ως ένα σημαντικό δυνητικά πλειοτροπικό γονίδιο. Συγκεκριμένα, βρέθηκε διαφορετική έκφραση του γονιδίου *PLEKHA1* μεταξύ των 2 ομάδων κυκλοφορούντων μονοκυττάρων (άτομα με υψηλή και χαμηλή BMD) και μονοπύρηνων κύτταρων του περιφερικού αίματος (άτομα με διαβήτη και χωρίς διαβήτη). Η ανάλυση WGCNA έδειξε επίσης ότι τα γονίδια *PLEKHA1* και *TCF7L2* σχετίζονταν λειτουργικά με γνωστά γονίδια της οστεοπόρωσης και του T2D.

Μία άλλη μελέτη εφάρμοσε τις μεθόδους ccFDR και GPA για τον έλεγχο πλειοτροπίας μεταξύ FN-BMD και λιπιδίων του πλάσματος (133). Ταυτοποιήθηκαν 3 δυνητικά πλειοτροπικά SNPs, με τα γονίδια *TRPS1* και *NLRC5* τα οποία εμπλέκονται στα μονοπάτια NF-κB και Wnt, όπως επίσης στη φλεγμονή και σε ανοσολογικές διαδικασίες, να σχετίζονται με αμφοτέρους τους φαινοτύπους. Χρησιμοποιώντας και πάλι τη μέθοδο ccFDR αναλύθηκαν δεδομένα από 2 μεγάλες GWAS για τη LS-BMD και τη στεφανιαία νόσο (Coronary Artery Disease, CAD) και εντοπίστηκαν 7 πλειοτροπικά SNPs (135). Σημειώνεται ότι ορισμένα από τα αντίστοιχα γονίδια (*RAI1*, *TOM1L2*, *ADAMTS2*, *TCERG1L*) σχετίζονται με τον οστίτη ιστό και/ή τη CAD και μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πλειοτροπία αυτών των φαινοτύπων.

Μία άλλη εκδήλωση ενός διαταραγμένου οστικού μεταβολισμού είναι η ασβεστοποίηση των αγγείων. Έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες με μέτρια έως σοβαρή ασβεστοποίηση της κοιλιακής αορτής έχουν υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση κατάγματος και μειωμένη BMD ισχίου (144). Επιπλέον, γενετικές μελέτες διαπίστωσαν αλληλεπικαλυπτόμενους πολυμορφισμούς μεταξύ BMD φαινοτύπων και ασβεστοποίηση της αορτής (*MEF2C*, *ATXN7L1*, *ANKRD7*, *TNFRSF11B*, *CNTLN*, *ANK3*) (145) ή ασβεστοποίηση των στεφανιαίων αγγείων (*NRG1*, *C10orf76*) (146).

#### 2.1.3.2.3. Ανάπτυξη

Η μελέτη των Greenbaum *et al.* εφάρμοσε τη μέθοδο ccFDR και ανίχνευσε 18 πλειοτροπικά SNPs για τους φαινοτύπους ύψος και FN-BMD, 4 από τα οποία δεν είχαν αναφερθεί σε προηγούμενες GWAS (132). Αυτά τα SNPs εντοπίστηκαν στους γενετικούς τόπους 1p36.22 (*KIF1B*), 7p21.1 (*FERD3L*, *TWISTNB*), 10q26.13 (*BTBD16*, *PLEKHA1*) και 16p12.3 (*GPR139*, *GP2*). Σημειώνεται ότι οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *KIF1B* μπορεί να συμβάλουν στη διακύμανση της BMD επηρεάζοντας την έκφραση της πρωτεΐνης MT1-MMP και του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor beta, TGFβ). Επίσης, τα γονίδια *FERD3L* and *TWISTNB* έχουν σχετιστεί με κρανιοσυνοστώσεις.

Μία διμεταβλητή GWAS έλεγξε τη συσχέτιση της BMD και της ηλικίας εμμηναρχής σε έναν πληθυσμό Κινέζων γυναικών, ακολουθούμενη από επικύρωση των αποτελεσμάτων σε ανεξάρτητες κοόρτες Καυκάσιων, Αφροαμερικάνων και/ή Ισπανών-Αμερικάνων γυναικών (137). Ταυτοποιήθηκαν 4 SNPs στο γονίδιο *ATP6V1G1* και ένα SNP στο γονίδιο *ABCB1* που σχετίστηκαν με την ηλικία εμμηναρχής και τη BMD (σπονδυλικής στήλης, ισχίου). Μία άλλη μελέτη έλεγξε την ύπαρξη

συσχέτισης μεταξύ γενετικών τόπων που επηρεάζουν την ηλικία κατά την εφηβεία και της BMD σε πολλαπλά σημεία του σκελετού σε υγιή παιδιά (114). Βρέθηκε ότι ο γενετικός κίνδυνος για καθυστέρηση της εφηβείας σχετίστηκε με χαμηλότερη LS-BMD και στα 2 φύλα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η σπονδυλική στήλη είναι πλούσια σε δοκιδώδη οστίτη ιστό και είναι ιδιαίτερα ευπροσάρμοστη κατά την εφηβεία.

#### 2.1.3.2.4. Διατροφικές συνήθειες και συνήθειες ζωής

Η πρώτη διμεταβλητή GWAS για τη BMD και την κατανάλωση αλκοόλ πρότεινε 4 πιθανά πλειοτροπικά γονίδια (*DYNC2H1*, *GRIK4*, *IL1RN*, *OPRM1*) (136). Επιπρόσθετα, οι Matoba *et al.* (125) πραγματοποίησαν μία ανάλυση γενετικής συσχέτισης και μία μελέτη GWA χρησιμοποιώντας τους φαινοτύπους που είναι διαθέσιμοι στον NHGRI-EBI Κατάλογο, καθώς και πρόσθετα GWAS δεδομένα και δε βρήκαν συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και οστεοπόρωσης.

#### 2.1.3.2.5. Άλλοι φαινότυποι

Στη μεγαλύτερη GWAS για τη νεφρική λειτουργία (μέγεθος δείγματος μεγαλύτερο από ένα εκατομμύριο συμμετέχοντες), οι Wuttke *et al.* (126) δεν παρατήρησαν γενετική συσχέτιση μεταξύ του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) και του αζώτου ουρίας αίματος (Blood Urea Nitrogen, BUN) με τη BMD σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ . Μία άλλη μελέτη εφάρμοσε τη μέθοδο ccFDR στα δεδομένα από 2 ανεξάρτητες GWAS και εντόπισε 7 πλειοτροπικά SNPs για τους φαινοτύπους BMD και καρκίνο του μαστού (134). Τα

γονίδια *CCDC170*, *ESR1*, *RANKL*, *CPED1* and *MEOX1* προτάθηκε ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανωτέρω πλειοτροπία.

Οι van Vliet *et al.* προσπάθησαν να προσδιορίσουν αν οι χαμηλές συγκεντρώσεις της θυρεοτρόπου ορμόνης (Thyroid Stimulating Hormone, TSH) σχετίζονται με την BMD (139). Για αυτό το λόγο εξέτασαν αν πολυμορφισμοί στο γονίδιο του υποδοχέα της TSH (*TSHR*), καθώς και πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την έκφραση του *TSHR* σχετίζονταν με την BMD αλλά δε βρήκαν σημαντική συσχέτιση. Επιπλέον, οι Grassmann *et al.* έλεγξαν την ύπαρξη γενετικής συσχέτισης μεταξύ της σχετιζόμενης με την ηλικία εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (Age-related Macular Degeneration, AMD) και άλλων σύνθετων φαινοτύπων και διαπίστωσαν ότι ο αυξημένος κίνδυνος για AMD σχετίζονταν με χαμηλότερη BMD (115). Τέλος, μία άλλη μελέτη περιέγραψε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ ανδρογενούς αλωπεκίας και BMD (127).

Συνοψίζοντας, πρόσφατες μελέτες προτείνουν την παρουσία γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ της BMD και διάφορων φαινοτύπων εκτός του μυοσκελετικού συστήματος, όπως παχυσαρκία, διαβήτης τύπου 2, λιπίδια πλάσματος, στεφανιαία νόσος, ηλικία κατά την εφηβεία, ηλικία εμμηναρχής, ύψος, κατανάλωση αλκοόλ, ανδρογενής αλωπεκία, καρκίνος μαστού και εκφύλιση ωχράς κηλίδας.

**Πίνακας 3.** Αντιπροσωπευτικές μελέτες γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ BMD και φαινοτύπων άλλων συστημάτων.

Συγγραφείς (Έτος)	Πλειοτροπικά γονίδια	Οστικός(οί) φαινότυπος(οι) αναφοράς	Άλλος(οι) φαινότυπος(οι)	Παρουσία πλειοτροπίας	Μέθοδος
<b>Παχυσαρκία</b>					
Lee <i>et al.</i> (2019)	ΔΕ	BMD, BMC, aBMC, οστική επιφάνεια (οστά φερόντων και μη φερόντων βάρους, κρανίο, πτέρνα)	BMI, aWC, WC, λιπώδης μάζα, άλιπη σωματική μάζα, %λίπος	<sup>1+</sup>	Γενετική συσχέτιση (LDSC)
Kaur <i>et al.</i> (2019)	<i>HOXC6</i>	BMD (FN, LS)	WHR προσαρμοσμένη για τον BMI	+	GWAS look-up
Hu <i>et al.</i> (2018)	<i>DNM3, MARK3, PRDM6, PUM1, TRPS1, XXYLT1, ZNF423</i>	BMD (FN)	BMI, WHR	+	ccFDR
<b>Καρδιαγγειακή νόσος και σχετιζόμενοι παράγοντες κινδύνου</b>					
Hu <i>et al.</i> (2018)	<i>GNG12-AS1, PGCP1, PIFO, PLEKHA1, TCF7L2, WLS</i>	BMD (FN)	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	+	ccFDR
Lin <i>et al.</i> (2018)	<i>C6orf10, LOC101929163, NLRC5, TRPS1</i>	BMD (FN)	Ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, LDL	+	ccFDR, GPA
Peng <i>et al.</i> (2017)	<i>ADAMTS2, FLJ46300, LOC389970, PEMT, RAI1, TCERG1L, TOM1L2, ZWINT</i>	BMD (FN, LS, αντιβράχιο)	Στεφανιαία νόσος	<sup>2+</sup>	ccFDR
<b>Ανάπτυξη</b>					
Cousminer <i>et al.</i> (2018)	<sup>3</sup> Πολλαπλά γονίδια	BMD (FN, LS, ολικό ισχίο, άπω αντιβράχιο)	Ηλικία κατά την εφηβεία (ηλικία	<sup>4+</sup>	PRS

Greenbaum <i>et al.</i> (2017)	<i>BTBD16, CYP19A1, DMP1, DNM3, EPDR, FERD3L, FUBP3, GPR139, GP2, IBSP, JAG1, KIF1B, MARK3, MEOX1, MEF2C-AS1, MIR3660, PLEKHA1, PRKAR1A, SMAD3, SOST, SPTBN1, STARD3NL, TWISTNB</i>	BMD (FN)	εμμηναρχής για κορίτσια, ηλικία μεταφώνησης για αγόρια)	Υψος	+	ccFDR
Tan <i>et al.</i> (2015)	<i>ABCB1, ATP6V1G1</i>	BMD (ισχίο, LS)		Ηλικία εμμηναρχής	+	Διμεταβλητή GWAS
<b>Διατροφικές συνήθειες και συνήθειες ζωής</b>						
Matoba <i>et al.</i> (2019)	ΔΑ	Οστεοπόρωση		Κάπνισμα	-	GWAS look-up, γενετική συσχέτιση (LDSC)
Lu <i>et al.</i> (2017)	<i>DYNC2H1, GRIK4, IL1RN, OPRM1</i>	BMD (ισχίο, σπονδυλική στήλη, ολόκληρο το σώμα)		Κατανάλωση αλκοόλ	+	Διμεταβλητή GWAS
<b>Άλλοι φαινότυποι</b>						
Wuttke <i>et al.</i> (2019)	ΔΕ	BMD (FN, LS, πτέρνα, αντιβράχιο), κάταγμα (καρπός, οστά άνω άκρου, αστράγαλος, άλλα οστά)		eGFR, BUN	-	Γενετική συσχέτιση (LDSC)

Yap <i>et al.</i> (2018)	ΔΕ	BMD (LS, πτέρνα)	Ανδρογενής αλωπεκία	+	Γενετική συσχέτιση (LDSC)
van Vliet <i>et al.</i> (2018)	TSHR	BMD (FN, LS)	Θυρεοτρόπος ορμόνη	-	GWAS look-up
Peng <i>et al.</i> (2017)	CCDC170, CPED1, ESR1, FABP3P2, LOC100128016, LOC100132664, LOC390844, MEOX1, TNFSF11,	BMD (FN, LS)	Καρκίνος μαστού	+	ccFDR
Grassmann <i>et al.</i> (2017)	ΔΑ	BMD (FN, LS)	Εκφύλιση ωχράς κηλίδας σχετιζόμενη με την ηλικία	<sup>5</sup> +	PRS

**Συντομογραφίες:** aBMC: area-adjusted Bone Mineral Content – οστική μάζα προσαρμοσμένη για την επιφάνεια, aWC: BMI-adjusted Waist Circumference - περιφέρεια μέσης προσαρμοσμένη για τον BMI, BMC: Bone Mineral Content – οστική μάζα, BMD: Bone Mineral Density - οστική πυκνότητα, BMI: Body Mass Index – δείκτης μάζας σώματος, BUN: Blood Urea Nitrogen - άζωτο ουρίας αίματος, ccFDR: conjunctive conditional False Discovery Rate - από κοινού δεσμευμένο ποσοστό ψευδών ευρημάτων, eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate - εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης, FN: Femoral Neck – αυχένιας κεφαλής μηριαίου οστού, GWAS: Genome Wide Association Study – μελέτη ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος, GPA: Genetic analysis incorporating Pleiotropy and Annotation - γενετική ανάλυση που ενσωματώνει δεδομένα πλειοτροπίας και σχολιασμού, HDL: High Density Lipoprotein - λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, LDL: Low Density Lipoprotein - λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, LDSC: Linkage Disequilibrium Score - σκορ ανισορροπίας σύνδεσης, LS: Lumbar Spine – οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης, PRS: Polygenic Risk Score - πολυγονιδιακό σκορ κινδύνου, WC: Waist Circumference – περιφέρεια μέσης, WHR: Waist Hip Ratio - λόγος περιφέρειας μέσης ισχίου, ΔΑ: δεν αναφέρεται, ΔΕ: δεν εφαρμόζεται.

#### Σημειώσεις:

<sup>1</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για α) γενετική συσχέτιση: BMD (οστά φερόντων και μη φερόντων βάρους) – BMI, BMD (οστά φερόντων και μη φερόντων βάρους) – WC, BMD (οστά φερόντων και μη φερόντων βάρους) – λιπώδης μάζα, BMD (οστά φερόντων και μη φερόντων βάρους) – άλιπη σωματική μάζα, BMD (οστά φερόντων και μη φερόντων βάρους) – %λίπος και β) LDSC: BMD (πτέρνα) - BMI.

<sup>2</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για BMD (LS) – στεφανιαία νόσο.

<sup>3</sup>Τα πλειοτροπικά γονίδια αναφέρονται στους αντίστοιχους Συμπληρωματικούς Πίνακες 2 και 3 (333 SNPs για την ηλικία εμμηναρχής, 49 SNPs για την ηλικία μεταφώνησης).

<sup>4</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για BMD (LS) – ηλικία κατά την εφηβεία.

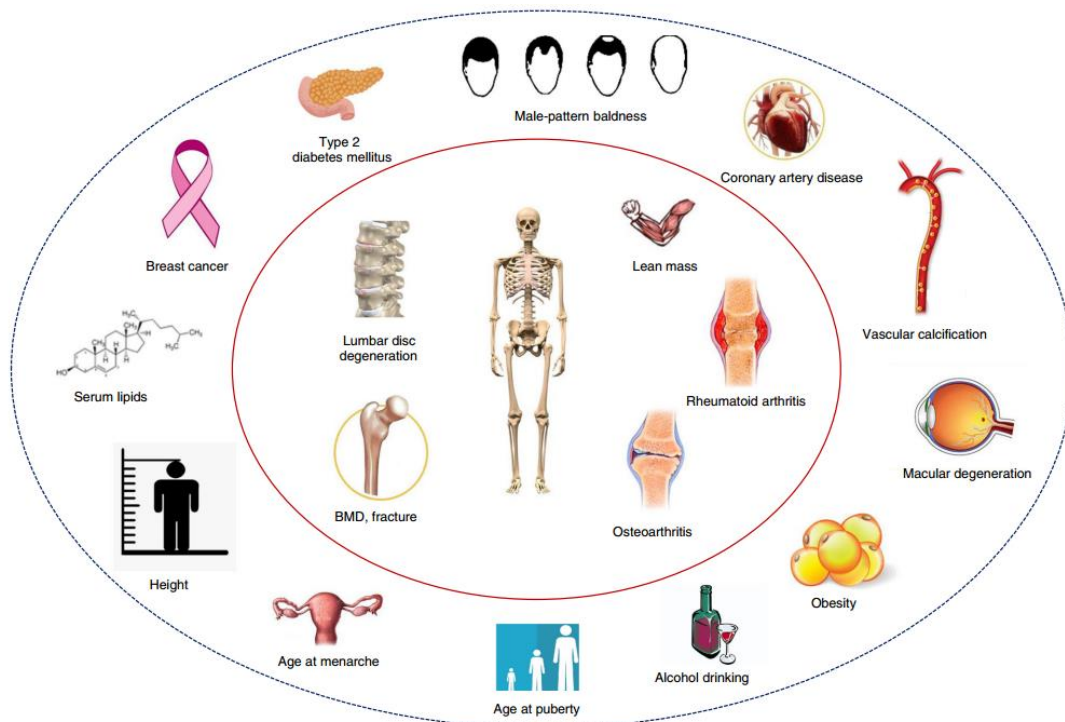
<sup>5</sup>Σημαντικά αποτελέσματα για BMD (FN) - εκφύλιση ωχράς κηλίδας σχετιζόμενη με την ηλικία.

Το σύμβολο “+” αντιπροσωπεύει παρουσία στατιστικά σημαντικών ευρημάτων υπέρ της ύπαρξης πλειοτροπίας μεταξύ των μελετούμενων φαινοτύπων, ενώ το σύμβολο “-” αντιπροσωπεύει απουσία στατιστικά σημαντικών ευρημάτων.



### 2.1.3.3. Πλειοτροπικά αποτελέσματα ειδικά για τον πληθυσμό

Υπάρχουν γενετικά δεδομένα που εξηγούν τα ειδικά για τον πληθυσμό πλειοτροπικά αποτελέσματα με βάση διάφορες παραμέτρους. Συγκεκριμένα, μία μελέτη εξέτασε τη σχέση μεταξύ πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ηλικία κατά την εφηβεία και την BMD (114). Διαπιστώθηκε ότι ο κίνδυνος για καθυστέρηση έναρξης της εφηβείας σχετίζονταν με χαμηλότερη LS-BMD, με τη συσχέτιση να είναι ισχυρότερη στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια (κορίτσια:  $\beta=-0,088$ ,  $p\text{-value}=0,0097$  και αγόρια:  $\beta=-0,068$ ,  $p\text{-value}=0,039$ ). Επιπλέον, η μελέτη των Lu *et al.* (136) παρείχε πιθανούς πλειοτροπικούς ρόλους του γονιδίου *GRIK4* σε άντρες και των γονιδίων *OPRM1* και *IL1RN* σε γυναίκες όσον αφορά τη συσχέτιση BMD και κατανάλωση αλκοόλ. Συγκεκριμένα, 2 πολυμορφισμοί στο γονίδιο *GRIK4* σχετίστηκαν με τη BMD ισχίου, σπονδυλικής στήλης, WB οστών και την κατανάλωση αλκοόλ στους άντρες, ενώ 3 πολυμορφισμοί στο γονίδιο *OPRM1* και 9 πολυμορφισμοί στο γονίδιο *IL1RN* σχετίστηκαν με όλους τους BMD φαινοτύπους και την κατανάλωση αλκοόλ στις γυναίκες.



**Εικόνα 9.** Φαινότυποι που εμπλέκονται στη γενετική πλειοτροπία της BMD εντός και εκτός του μυοσκελετικού συστήματος με βάση μελέτες GWA.

**Συνομογραφίες:** BMD: Bone Mineral Density - οστική πυκνότητα.

#### 2.1.4. Συζήτηση

Σε αυτήν την ανασκόπηση περιγράφηκαν πρόσφατες μελέτες GWA σχετικά με την κοινή γενετική συσχέτιση μεταξύ της BMD ή της οστεοπόρωσης και διάφορων φαινοτύπων εντός του μυοσκελετικού συστήματος (π.χ. κάταγμα, οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, άλιπη σωματική μάζα) και εκτός του μυοσκελετικού συστήματος (π.χ. παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, λιπίδια πλάσματος, καρδιαγγειακές παθήσεις, παράμετροι ανάπτυξης).

Σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν γενετικές μελέτες πλειοτροπίας για περισσότερους από 2 φαινοτύπους ταυτόχρονα που περιλαμβάνουν τη BMD ή την οστεοπόρωση. Είναι απαραίτητες επομένως πολυμεταβλητές αναλύσεις για την

κατανόηση των πολύπλοκων σχέσεων μεταξύ των σύνθετων φαινοτύπων. Προτείνεται οι υπόλοιποι μυοσκελετικοί φαινότυποι να αναλύονται με παρόμοιο τρόπο, λαμβάνοντας υπόψη την πλειοτροπία εντός και εκτός του σκελετού.

Συμπερασματικά, η πρώτη μελέτη της διδακτορικής διατριβής αναδεικνύει την παρουσία ενδείξεων γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ μυοσκελετικών και μη φαινοτύπων και της BMD ή της οστεοπόρωσης η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

## 2.2. ΣΑΡΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΕΥΡΕΣΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΜΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ

### 2.2.1. Εισαγωγή – Σκοπός

Παρά την εντυπωσιακή πρόοδο στον τομέα γενετικής της οστεοπόρωσης, πολλά στοιχεία του γενετικού υποβάθρου της νόσου παραμένουν άγνωστα (missing heritability). Αυτό οφείλεται εν μέρει σε παράγοντες που σχετίζονται με την ίδια την ασθένεια π.χ. φαινοτυπική μεταβλητότητα (ενδοφαινότυποι) (147), αλλά και στη χρήση του αυστηρού ορίου  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  το οποίο καθιστά δύσκολη την εύρεση πολλών “αληθινών” πολυμορφισμών με μικρούς γενετικούς κινδύνους οι οποίοι συμβάλλουν στο συνολικό φαινότυπο (148).

Η πιο πρόσφατη και ολοκληρωμένη προσπάθεια περιγραφής του γενετικού υποβάθρου της BMD πραγματοποιήθηκε από τους Morris *et al.* (81) σε 426.824 άτομα της UK Biobank. Οι συγγραφείς περιέγραψαν 518 γενετικούς τόπους (301 νέοι) και εξήγησαν 20% διακύμανσης της BMD. Η εύρεση νέων πολυμορφισμών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω περαιτέρω αύξησης του μεγέθους δείγματος ή εφαρμογής συμπληρωματικών προσεγγίσεων, όπως μελέτη των αλληλεπιδράσεων γονιδίων – περιβάλλοντος, των αλληλεπιδράσεων γονιδίων μεταξύ τους ή μελέτη της γενετικής πλειοτροπίας (110, 118).

Ένα σημαντικό αρχικό βήμα στη διαδικασία εύρεσης νέων πλειοτροπικών πολυμορφισμών είναι ο έλεγχος των πολυμορφισμών που έχει ήδη βρεθεί ότι σχετίζονται με έναν ή περισσότερους φαινοτύπους στο πλαίσιο μελετών GWA για συσχέτιση με το φαινότυπο υπό μελέτη (GWAS look-up) πραγματοποιώντας ευρεία

σάρωση του γονιδιώματος (genome-wide pleiotropy scan) και εφαρμογή προσέγγισης ανακάλυψης (discovery) και επικύρωσης (replication). Μία τέτοια προσέγγιση έχει ήδη εφαρμοστεί για τον έλεγχο πλειοτροπικών συσχετίσεων για διάφορους φαινοτύπους εκτός της οστεοπόρωσης (149-151).

Συνεπώς, σκοπός της δεύτερης μελέτης της διδακτορικής διατριβής είναι η εύρεση και περιγραφή πλειοτροπικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με τη BMD και μη οστικούς φαινοτύπους οι οποίοι θα θέσουν τα θεμέλια για την αποκάλυψη πιθανών κοινών μονοπατιών μέσω των οποίων δρουν αυτοί οι πολυμορφισμοί.

## **2.2.2. Μέθοδοι**

### *2.2.2.1. Επιλογή μη οστικών πολυμορφισμών*

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι αναγνωρισμένοι πολυμορφισμοί σε ολόκληρο το φάσμα των φαινοτύπων πραγματοποιώντας αναζήτηση στον NHGRI-EBI Κατάλογο, με τελευταία ενημέρωση την 14<sup>η</sup> Δεκεμβρίου 2017. Εξαιρέθηκαν πολυμορφισμοί με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:  $p\text{-value} > 5 \times 10^{-8}$ , πολυμορφισμοί που αφορούσαν σε αλληλεπιδράσεις γονιδίου-γονιδίου, πολυμορφισμοί που αξιολογήθηκαν εντός των απλοτύπων, διπλές εγγραφές, απουσία αριθμού rs που δεν μπορούσε να βρεθεί χρησιμοποιώντας τα δεδομένα των αρχικών μελετών GWA, γνωστή συσχέτιση με τη BMD (73, 78) και συσχέτιση με άλλους οστικούς βιοδείκτες ή φαινοτύπους (π.χ. οστεοπόρωση, κάταγμα, συγκεντρώσεις ασβεστίου). Χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο σχολιασμού μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms Annotator, SNIIPA) (152) για την εύρεση των τέλειων γειτονικών πολυμορφισμών

(proxies) των ανωτέρω πολυμορφισμών (πολυμορφισμοί σε υψηλή LD,  $r^2=1$ ). Μετά την αφαίρεση των διπλών εγγραφών, δημιουργήθηκε μία λίστα των αρχικών πολυμορφισμών και των τέλειων γειτονικών πολυμορφισμών τους.

#### 2.2.2.2. Φάση ανακάλυψης της οστικής πλειοτροπίας

Στη συνέχεια εντοπίστηκαν εκείνοι οι πολυμορφισμοί οι οποίοι σχετίζονταν με τους φαινοτύπους LS-BMD και FN-BMD στο πλαίσιο του μεγάλου διεθνούς συνασπισμού GEFOS, σε περισσότερα από 80.000 άτομα (73). Χρησιμοποιήθηκαν στατιστικά μοντέλα προσαρμοσμένα για τους παράγοντες ηλικία, ηλικία<sup>2</sup>, σωματικό βάρος και κύριες συνιστώσες (principal components) για στάθμιση της διαστρωμάτωσης του πληθυσμού (population stratification). Επιλέχτηκαν οι φαινότυποι FN-BMD και LS-BMD επειδή τα οστεοπορωτικά κατάγματα στο ισχίο και τη σπονδυλική στήλη είναι οι πιο συχνοί και σοβαροί τύποι κατάγματος που έχουν μελετηθεί σε γενετικές και επιδημιολογικές μελέτες που σχετίζονται με την οστεοπόρωση (153).

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος των πολλαπλών συγκρίσεων, υπολογίστηκε το ποσοστό ψευδών ευρημάτων (FDR), με όριο 5%, εφαρμόζοντας τη μέθοδο Simes η οποία σχετίζεται στενά με τη διόρθωση κατά Benjamini-Hochberg (154, 155) και η οποία είναι λιγότερο συντηρητική συγκριτικά με τη διόρθωση κατά Bonferroni. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το εργαλείο LDlink (156), εντοπίστηκαν οι ανεξάρτητοι πολυμορφισμοί για τους φαινοτύπους FN-BMD και LS-BMD (πολυμορφισμοί σε χαμηλή LD,  $r^2<0.2$ ). Τέλος, εξαιρέθηκαν οι πολυμορφισμοί οι οποίοι είχαν γειτονικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονταν με τη BMD σε επίπεδο  $p$ -value $<5 \times 10^{-8}$  σε προηγούμενη εργασία (73, 78) ή μέσω αναζήτησης στο SNiPA.

### 2.2.2.3. Φάση επικύρωσης της οστικής πλειοτροπίας στην UK Biobank

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επικύρωση των ανωτέρω πολυμορφισμών σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  προκειμένου να αποφευχθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα (γενετικά και BMD αριστερής πτέρνας μετρημένη με υπερηχογράφημα) από Ευρωπαίους συμμετέχοντες στην UK Biobank.

Συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση άτομα με διαθέσιμες υπερηχογραφικές μετρήσεις BMD πτέρνας (συσκευή τύπου Sahara/Hologic) κατά την έναρξη της μελέτης. Προτιμήθηκαν οι υπερηχογραφικές μετρήσεις έναντι των μετρήσεων DXA επειδή ήταν πολύ περισσότερες αριθμητικά. Η συσκευή υπερηχογραφήματος μετρά τις παραμέτρους SOS και BUA οι οποίες συνδυάζονται και παρέχουν τον δείκτη QUI. Το λογισμικό της συσκευής υπολογίζει αυτόματα την BMD από το δείκτη QUI. Η UK Biobank χρησιμοποιεί το λογισμικό Vox για τη συλλογή αυτόματων δεδομένων (άμεση καταχώρηση), ενώ κάθε φορά που αποτυγχάνει η μέθοδος άμεσης καταχώρησης χρησιμοποιείται μη αυτόματη καταχώρηση (157).

Εξαιρέθηκαν τα άτομα με τιμές για τις παραμέτρους SOS, BUA και BMD εκτός των ακόλουθων ορίων: (άντρες  $\leq 1.450$  and  $\geq 1.750$  m/s, γυναίκες  $\leq 1.455$  και  $\geq 1.700$  m/s), (άντρες  $\leq 27$  και  $\geq 138$  dB/MHz, γυναίκες  $\leq 22$  και  $\geq 138$  dB/MHz), και (άντρες  $\leq 0,18$  και  $\geq 1,06$  g/cm<sup>2</sup>, γυναίκες  $\leq 0,12$  και  $\geq 1,025$  g/cm<sup>2</sup>), αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό KING εντοπίστηκαν τα συγγενικά άτομα εκτιμώντας τους συντελεστές συγγένειας (kinship coefficients) για όλα τα ζεύγη ατόμων και καταγράφηκαν τα ζεύγη 3<sup>ου</sup> ή πιο κοντινού βαθμού (συντελεστής συγγένειας  $\geq 1/2^{(9/2)}$ ) (67). Στη

συνέχεια, διατηρήθηκαν δεδομένα μόνο από ένα μέλος κάθε ζεύγους. Για κάθε συμμετέχοντα υπολογίστηκε το ανά φύλλο τυποποιημένο Z-score για τη BMD πραγματοποιώντας γραμμική παλινδρόμηση για τη BMD και σταθμίζοντας για τους παράγοντες ηλικία, ηλικία<sup>2</sup> και σωματικό βάρος. Εξαιρέθηκαν από τις αναλύσεις τα Z-scores του εκτιμώμενου φαινοτύπου που βρίσκονταν εκτός των τιμών -4 και 4, όπως έχει ήδη προταθεί (73).

Οι πληροφορίες για τα SNPs και τα αντίστοιχα γονίδια προήλθαν από τη βάση δεδομένων Ensembl release 95 (158) και τα δεδομένα για τη λειτουργία των γονιδίων προήλθαν από τη βάση GeneCards (159).

#### 2.2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Για τα SNPs που ξεπέρασαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας στη φάση επικύρωσης, πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρόμηση για το Z-score ύστερα από στάθμιση για τις πρώτες 15 κύριες συνιστώσες και υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης. Εκτός από την αρχική μεταβλητή της UK Biobank για την BMD στην πτέρνα, πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση ευαισθησίας με βάση τη eBMD που υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο:  $eBMD = 0,002592 \times (BUA + SOS) - 3,687$  (160). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τα στατιστικά πακέτα STATA, έκδοση 14 (STATA Corp LP, College Station, Texas). και PLINK, έκδοση 1.9.

Πραγματοποιήθηκε επίσης παλινδρόμηση LDSC με τη χρήση της βάσης LD Hub προκειμένου να υπολογιστεί η γενετική συσχέτιση μεταξύ των φαινοτύπων FN-BMD και LS-BMD στο συνασπισμό GEFOS και διαφορετικών φαινοτύπων που



προέρχονται από GWAS δεδομένα και οι οποίοι περιλαμβάνονται στη βάση LD Hub (119).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων Phenoscaner (161) για πιθανή *in silico* λειτουργική επίδραση των πλειοτροπικών πολυμορφισμών που προέκυψαν από το στάδιο επικύρωσης και των γειτονικών πολυμορφισμών τους ( $r^2=0,6$ ). Ακολούθως περιγράφονται τα δεδομένα που σχετίζονται με τόπους ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης (expression Quantitative Trait Loci, eQTL) και μεταβολίτες σε επίπεδο  $p\text{-value}<5\times 10^{-8}$ .

#### 2.2.2.5. Διαθεσιμότητα δεδομένων

Στην ιστοσελίδα <http://www.gefos.org/?q=content/data-release-2012> είναι διαθέσιμα τα δεδομένα του συνασπισμού GEFOS. Τα γενετικά δεδομένα παρέχονται από την UK Biobank.

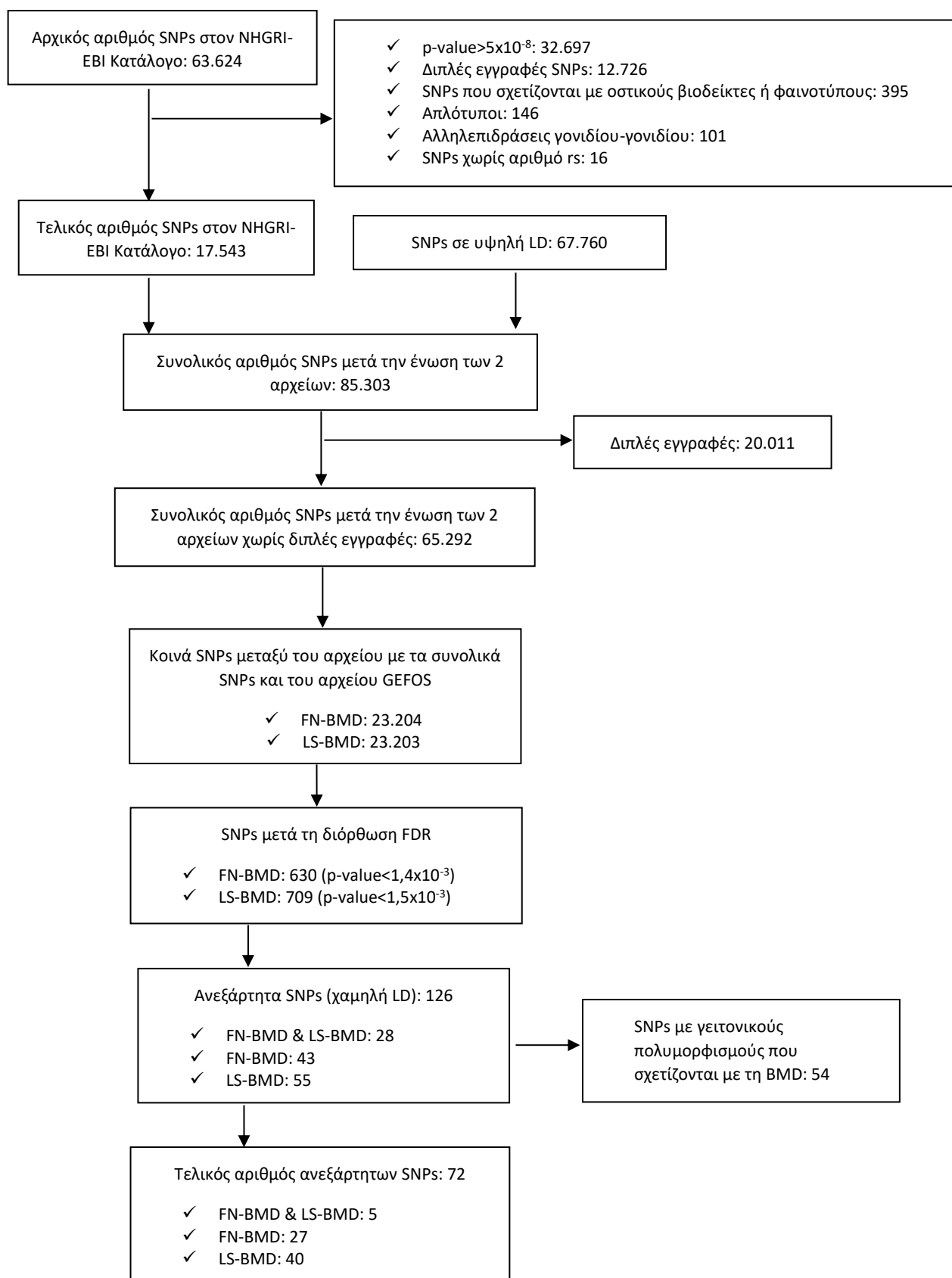
### 2.2.3. Αποτελέσματα

#### 2.2.3.1. Επιλογή μη οστικών πολυμορφισμών και φάση ανακάλυψης της οστικής πλειοτροπίας

Μέχρι την 14η Δεκεμβρίου 2017, ο NHGRI-EBI Κατάλογος περιλάμβανε συνολικά 63.624 SNPs, εκ των οποίων 17.543 SNPs και 67.760 γειτονικά SNPs επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση (**Εικόνα 10**). Μετά την απομάκρυνση των διπλών εγγραφών, προέκυψαν 23.204 και 23.203 κοινά SNPs με το συνασπισμό GEFOS για συσχέτιση με την FN-BMD και την LS-BMD, αντίστοιχα. Το όριο σημαντικότητας με βάση το FDR

ήταν  $1,4 \times 10^{-3}$  για την FN-BMD αποδίδοντας συνολικά 630 SNPs, ενώ για την LS-BMD το κατώτατο όριο p-value ορίστηκε στην τιμή  $1,5 \times 10^{-3}$  αποδίδοντας συνολικά 709 SNPs. Από αυτά, εντοπίστηκαν 126 ανεξάρτητα SNPs και 54 SNPs εξαιρέθηκαν περαιτέρω, καθώς ήταν γειτονικά για SNPs που είχαν προηγουμένως σχετιστεί με την BMD, δίνοντας έναν τελικό αριθμό 72 ανεξάρτητων πλειοτροπικών SNPs που σχετίζονται με την BMD.

Το SNP που παρουσίαζε τον μεγαλύτερο αριθμό πλειοτροπικών συσχετίσεων ήταν το rs3184504 το οποίο εκτός από την BMD σχετίστηκε επίσης με 22 διαφορετικούς μη οστικούς φαινοτύπους, καθώς και τα SNPs rs479844, rs6675401 και rs2735343 τα οποία σχετίστηκαν με 3 μη οστικούς φαινοτύπους. Τα 72 ανεξάρτητα SNPs εντοπίστηκαν σε 64 γενετικούς τόπους, σε 20 διαφορετικά χρωμοσώματα: 53 από αυτά περιγράφονταν στον NHGRI-EBI Κατάλογο, ενώ 19 ήταν γειτονικά για SNPs του NHGRI-EBI Καταλόγου που δεν είχαν προηγουμένως σχετιστεί με την BMD. Οι πιο συχνοί γενετικοί τόποι ήταν: 1p31.3 (n=2), 2q33.1 (n=2), 3p21.31 (n=2), 4p16.3 (n=2), 5q14.3 (n=2), 6p21.32 (n=2), 12p12.1 (n=2) και 18q21.33 (n=2). Περιγράφηκαν 90 διαφορετικοί μη οστικοί φαινότυποι, οι πιο συχνοί από τους οποίους ήταν: συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στον ορό (5 SNPs), εκπαιδευτικό επίπεδο (έτη εκπαίδευσης) (4 SNPs), ύψος (4 SNPs), περιφέρεια μέσης (3 SNPs) και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (3 SNPs). Η πιο κοινή καταγωγή ήταν: Ευρωπαίοι (74,38%), Ιάπωνες (3,31%) και Κινέζοι Χαν (3,31%). Η MAF των υπό μελέτη SNPs ποίκιλε σημαντικά με μέση τιμή (SD; ελάχιστη - μέγιστη)=0,31 (0,13; 0,04 – 0,50).



**Εικόνα 10.** Διάγραμμα ροής που εξηγεί τη διαδικασία για την επιλογή μη οστικών γενετικών τόπων στη φάση ανακάλυψης της οστικής πλειοτροπίας.

**Συνομογραφίες:** BMD: Bone Mineral Density – οστική πυκνότητα, FDR: False Discovery Rate – ποσοστό ψευδών ευρημάτων, FN: Femoral Neck – αυχένιας κεφαλής μηριαίου οστού, GEFOS: Genetic Factors for Osteoporosis – γενετικοί παράγοντες για την οστεοπόρωση, LD: Linkage Disequilibrium – ανισορροπία σύνδεσης, LS: Lumbar Spine – οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης, NHGRI-EBI: National Human Genome Research Institute-European Bioinformatics Institute, SNP: Single Nucleotide Polymorphism – μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός.

### 2.2.3.2. Φάση επικύρωσης της οστικής πλειοτροπίας στην UK Biobank

Ακολούθησε προσπάθεια επικύρωσης των 72 ανεξάρτητων SNPs στην UK Biobank. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τη διαθέσιμη μεταβλητή BMD πτέρνας της UK Biobank, καθώς επίσης για την εκ νέου υπολογιζόμενη eBMD πτέρνας σε ανεξάρτητους συμμετέχοντες Ευρωπαϊκής καταγωγής. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων παρέχονται στον **Πίνακα 4**. Εντοπίστηκαν 12 πλειοτροπικά SNPs με  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  που βρίσκονται σε 11 γενετικούς τόπους, σε 8 χρωμοσώματα (**Πίνακας 5, Συμπληρωματικός Πίνακας 1**). Εννέα SNPs περιλαμβάνονταν στον NHGRI-EBI Κατάλογο, ενώ 3 SNPs ήταν γειτονικοί πολυμορφισμοί. Σημειώνεται ότι δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση υπο-ομάδων ως προς το φύλο επειδή τα δεδομένα από το συνασπισμό GEFOS παρέχονταν συνολικά για άντρες και γυναίκες.

Στην προσπάθεια διασφάλισης ότι αυτά τα 12 SNPs αποτελούν 12 κύριους (lead) πολυμορφισμούς και για τους 2 σχετιζόμενους φαινοτύπους, διαπιστώθηκε ότι 9 από τα 12 πλειοτροπικά SNPs βρίσκονται σε LD ( $r^2=0,11-0,99$ ) με τους πολυμορφισμούς που περιγράφονται από τους Morris *et al.* (81) (**Συμπληρωματικός Πίνακας 2**). Τα διαγράμματα LD για αυτά τα ζεύγη SNPs παρέχονται στις **Συμπληρωματικές Εικόνες 1-8**. Σε σχέση με τους πολυμορφισμούς που παρουσιάστηκαν από τους Morris *et al.*, τα υπόλοιπα 3 SNPs της μελέτης μας (rs6599389, rs9303601, rs4776908) παρότι είχαν  $r^2 \leq 0,1$ , βρίσκονταν σε απόσταση  $< 500\text{kB}$ . Επιπλέον, αυτά τα 3 SNPs ξεπέρασαν το όριο FDR για την BMD και είχαν  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  για τους μη οστικούς φαινοτύπους, όπως επίσης στη φάση επικύρωσης στην UK Biobank.

**Πίνακας 4.** Δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στη UK Biobank που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

	Γυναίκες	Άντρες	Συνολικός πληθυσμός
Αριθμός ατόμων (%)	228.236 (54, 65%)	189.393 (45, 35%)	417.629 (100%)
Ηλικία κατά τη στρατολόγηση (έτη)	56,57 (7,89, 39 - 71)	57,00 (8,07, 38 - 73)	56,76 (7,98, 38 - 73)
Σωματικό βάρος (Kg)	71,35 (13,89, 30 - 196)	85,87 (13,97, 40,8 - 197,7)	77,93 (15,69, 30 - 197,7)
eBMD αριστερής πτέρνας (Z-score)	-0,0031 (0,9937, -3,8944 - 3,9980)	-0,0003 (0,9994, -3,4176 - 3,9896)	-0,0019 (0,9963, -3,8944 - 3,9980)

**Συνομογραφίες:** eBMD: estimated Bone Mineral Density – εκτιμώμενη οστική πυκνότητα.

**Σημειώσεις:** Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή (τυπική απόκλιση, ελάχιστη τιμή – μέγιστη τιμή), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές εκφράζονται ως απόλυτος αριθμός (%).

Τα 12 πλειοτροπικά SNPs σχετίστηκαν με 14 διαφορετικούς φαινοτύπους που ταξινομήθηκαν σε 10 διαφορετικές ομάδες (**Εικόνα 11α**). Τα SNPs rs479844 και rs4072037 παρουσίασαν τις περισσότερες πλειοτροπικές συσχετίσεις. Συγκεκριμένα, εκτός από την BMD σχετίστηκαν επίσης με 3 και 2 διαφορετικούς μη οστικούς φαινοτύπους, αντίστοιχα. Τα άλλα πλειοτροπικά SNPs σχετίστηκαν με την BMD και έναν επιπλέον φαινότυπο. Η ανάλυση ευαισθησίας με βάση την eBMD απέδωσε παρόμοια αποτελέσματα.

Επιπλέον, ελέγχθηκε η επίδραση της διαφορετικής καταγωγής στη φάση ανακάλυψης της οστικής πλειοτροπίας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέτρων θέσης για κάθε πλειοτροπικό SNP που σχετίζεται με τον ίδιο φαινότυπο σε περιπτώσεις ατόμων διαφορετικής καταγωγής και δεν παρατηρήθηκε διαφορά. Σχετικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα για 3 από τα 12 SNPs. Επιπρόσθετα, η κατεύθυνση

του αποτελέσματος για την πλειονότητα των επικυρωμένων SNPs (9 στα 12 SNPs, 75%) ήταν η ίδια μεταξύ του συνασπισμού GEFOS και της UK Biobank.

#### 2.2.3.3. *In silico* ανάλυση

Ακολούθησε η περαιτέρω *in silico* αξιολόγηση των 12 πλειοτροπικών SNPs. Χρησιμοποιώντας την επιλογή eQTL της βάσης δεδομένων Phenoscaner, διαπιστώθηκε ότι 7 από τα 12 SNPs σχετίζονταν με γονιδιακή έκφραση σε διάφορους ανθρώπινους μη οστικούς ιστούς και κύτταρα σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ , π.χ. λιπώδης ιστός, αορτή, κνημιαία αρτηρία, εγκέφαλος, μαστός, ινοβλάστες, παχύ έντερο, οισοφάγος, καρδιά, ειλεός, πνεύμονες, σκελετικός μυς, κνημιαίο νεύρο, πάγκρεας, προστάτης, δέρμα, σπλήνας, στόμαχος, θυρεοειδής, αίμα (**Εικόνα 11β**). Επιπλέον, 4 από αυτά τα 7 πλειοτροπικά SNPs ήταν υπεύθυνα για τη γονιδιακή έκφραση σε μη οστικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτούς που αναμένονταν από τη σχέση τους στον NHGRI-EBI Κατάλογο (**Συμπληρωματικός Πίνακας 3**). Περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιώντας τη βάση Phenoscaner έδειξε ότι κανένα από τα 12 πλειοτροπικά SNPs δε σχετίστηκε με οποιονδήποτε μεταβολίτη σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$

**Πίνακας 5.** Πλειοτροπικά SNPs σε επίπεδο σημαντικότητας μελετών ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος ( $p$ -value $<5 \times 10^{-8}$ ) που σχετίζονται με τη BMD πτέρνας και μη οστικούς φαινοτύπους στη φάση επικύρωσης στη UK Biobank.

SNP	Γενετικός τόπος	Γονίδιο	Σχετιζόμενος(οι) φαινότυπος(οι) στον NHGRI-EBI Κατάλογο	Κατεύθυνση σχετιζόμενου φαινοτύπου	Κατεύθυνση BMD
rs3118905	13q14.3	<i>DLEU1</i>	Ύψος	↑	↓
rs4963975	12p12.1	<i>SSPN</i>	Περιφέρεια μέσης	↓	↓
rs6599389	4p16.3	<i>TMEM175</i>	Νόσος Parkinson	↑	↓
rs884127	1q41	<i>SLC30A10</i>	Ηλεκτρολύτες ούρων (λόγος μαγνησίου/ασβεστίου)	↑	↓
<sup>1</sup> rs9668810	12p12.1	<i>SSPN</i>	Ανδρογενής αλωπεκία	↓	↓
rs479844	11q13.1	<sup>2</sup> Εκτός γονιδίου	Ατοπική δερματίτιδα	↓	↓
rs479844	11q13.1	<sup>2</sup> Εκτός γονιδίου	Ατοπία	↓	↓
rs479844	11q13.1	<sup>2</sup> Εκτός γονιδίου	Αλλεργικές ασθένειες (άσθμα, πυρετός εκ χόρτου ή έκζεμα)	↓	↓
<sup>1</sup> rs7221743	17q11.2	<i>EFCAB5</i>	Κατανάλωση καφέ	↑	↓
rs301800	1p36.23	<i>RERE</i>	Εκπαιδευτικό επίπεδο	↓	↓
rs7899547	10q21.1	<sup>3</sup> Εκτός γονιδίου	Πρωτεΐνες ορού	ΔΑ	↓
rs9303601	17q21.31	<i>AC004596.1</i>	Δικτυοερυθροκύτταρα	↓	↓
rs4072037	1q22	<i>MUC1</i>	Μαγνήσιο ορού	↑	↓
rs4072037	1q22	<i>MUC1</i>	Καρκίνος στομάχου μη καρδιακού τύπου	↑	↓
<sup>1</sup> rs4776908	15q23	<i>AAGAB</i>	Περιφέρεια μέσης	↑	↓

**Συνοτομογραφίες:** BMD: Bone Mineral Density – οστική πυκνότητα, NHGRI-EBI: National Human Genome Research Institute-European Bioinformatics Institute, SNP: Single Nucleotide Polymorphism – μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, ΔΑ: δεν αναφέρεται.

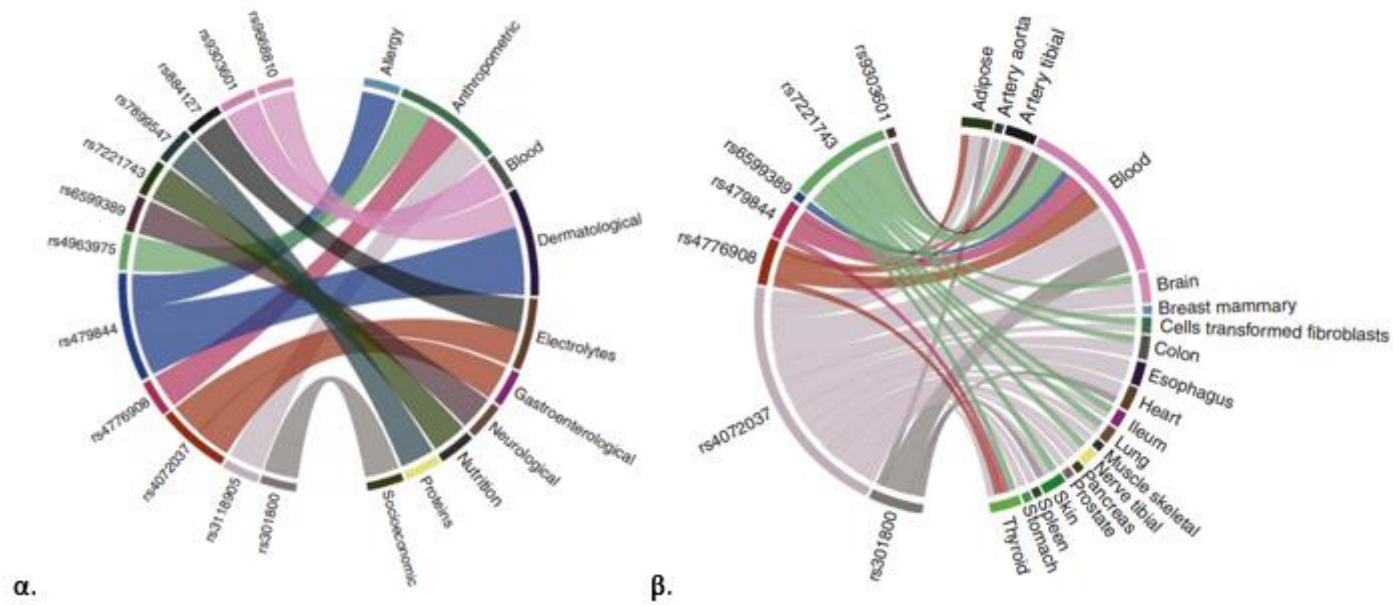
**Σημειώσεις:**

<sup>1</sup>Οι πολυμορφισμοί rs9668810, rs7221743, rs4776908 που προέκυψαν από το SNIIPA είναι γειτονικοί με τους πολυμορφισμούς rs9300169, rs9902453, rs7166081, αντίστοιχα του NHGRI-EBI Καταλόγου.

<sup>2</sup>Τα κοντινότερα γονίδια του πολυμορφισμού rs479844 είναι τα *AP5B1*, *OVOL1*.

<sup>3</sup>Το κοντινότερο γονίδιο του πολυμορφισμού rs7899547 είναι το *MBL2*.

Τα σύμβολα “↑” και “↓” αντιπροσωπεύουν αύξηση και ελάττωση του φαινοτύπου, αντίστοιχα (απόλυτη τιμή ή κίνδυνος εμφάνισης της νόσου).



**Εικόνα 11.** Σχηματική αναπαράσταση των συσχετίσεων μεταξύ SNPs και φαινοτύπων με βάση (α) την ανάλυση επικύρωσης στη UK Biobank και (β) την ανάλυση βιοπληροφορικής στη βάση PhenoScanner.



#### 2.2.3.4. Γονίδια και γονιδιακή έκφραση

Οι φαινότυποι οι οποίοι βρέθηκε ότι σχετίζονται με τους BMD πολυμορφισμούς ποικίλλουν ως προς τα χαρακτηριστικά και το γενετικό τους υπόβαθρο (**Πίνακας 5, Συμπληρωματικός Πίνακας 1**). Συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί οι οποίοι βρέθηκε να σχετίζονται με 2 ή περισσότερους φαινοτύπους μπορεί να είναι οι πραγματικοί αιτιακοί πολυμορφισμοί αλλά μπορεί να είναι επίσης σε υψηλή LD με τους πραγματικούς αιτιακούς πολυμορφισμούς. Ομοίως, το αντίστοιχο κάθε φορά γονίδιο δε σημαίνει ότι είναι το αιτιακό γονίδιο αλλά μπορεί να αντιπροσωπεύει το πλησιέστερο γονίδιο για κάθε πλειοτροπικό πολυμορφισμό.

##### 2.2.3.4.1. Νόσος Parkinson

Το SNP rs6599389 στο γονίδιο *TMEM175* με αλληλόμορφο ελέγχου (effect allele) A, σχετίζονταν με μείωση της BMD και αύξηση του κινδύνου νόσου Parkinson. Το γονίδιο *TMEM175* κωδικοποιεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά καλίου στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα. Τα δεδομένα eQTL έδειξαν ότι αυτό το SNP σχετίζονταν με γονιδιακή έκφραση στο αίμα. Τα ανωτέρω ευρήματα είναι σε συμφωνία με τα διαθέσιμα επιδημιολογικά στοιχεία (162, 163). Υπάρχουν διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση της BMD σε ασθενείς με νόσο Parkinson, όπως απώλεια βάρους, υποσιτισμός, ανεπάρκεια βιταμίνης D, μειωμένη έκθεση στον ήλιο, ακινησία, μειωμένη μυϊκή δύναμη, καθώς επίσης η χρήση συγκεκριμένων αντιπαρκινσονικών φαρμάκων, ιδιαίτερα η λεβοντόπα, που μπορεί να προκαλέσουν υπερομοκυστεϊναιμία (164).

#### 2.2.3.4.2. Καρκίνος στομάχου μη καρδιακού τύπου

Το SNP rs4072037 που βρίσκεται στο γονίδιο *MUC1* (αλληλόμορφο ελέγχου T) σχετίζονταν με μείωση της BMD και αύξηση του κινδύνου για καρκίνο στομάχου μη καρδιακού τύπου. Το γονίδιο *MUC1* κωδικοποιεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό προστατευτικών φραγμών στο βλεννογόνο επιθηλιακών επιφανειών. Υπερέκφραση, ενδοκυττάριας εντοπισμός ή αλλαγές στη γλυκοζυλίωση αυτής της πρωτεΐνης έχουν σχετιστεί με καρκίνο. Τα δεδομένα eQTL για αυτό το SNP αποκάλυψαν γονιδιακή έκφραση στο στομάχο, καθώς επίσης σε θυρεοειδή, πνεύμονα, πάγκρεας, μαστό, προστάτη, σπλήνα, σκελετικό μυ, δέρμα, αίμα, μετασχηματισμένα από τον ιό Epstein-Barr (Epstein - Barr Virus, EBV) λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, αορτή, κνημιαία αρτηρία, αριστερή κοιλία, ωτίο αριστερού κόλπου, βλεννογόνο οισοφάγου, μυϊκές ίνες οισοφάγου, γαστρο-οισοφαγική συμβολή, φυσιολογικό προθυλακικό ειλεό (normal prerouch ileum), εγκάρσιο κόλον, σιγμοειδές κόλον, ινοβλάστες, υποδόριο λιπώδη ιστό, σπλαχνικό λιπώδη ιστό, κνημιαίο νεύρο, εγκεφαλικό φλοιό, εγκεφαλικό ημισφαίριο και παρεγκεφαλίδα.

Επιδημιολογικά δεδομένα περιγράφουν οστικές διαταραχές σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου και συγκεκριμένα μειωμένη οστική μάζα, οστεοπόρωση ή/και κατάγματα (165). Ωστόσο, η μεγαλύτερη ηλικία, το γυναικείο φύλο, η δυσαπορρόφηση, ο υποσιτισμός, το χαμηλό σωματικό βάρος, ο ίδιος ο καρκίνος και η θεραπεία του (π.χ. χημειοθεραπεία, γαστρεκτομή) είναι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση οστεοπόρωσης σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου.

#### 2.2.3.4.3. Δερματολογικές και αλλεργικές ασθένειες

Το SNP rs479844 που βρίσκεται κοντά στα γονίδια *AP5B1* και *OVOL1* (αλληλόμορφο ελέγχου A) σχετίζονταν με μείωση της BMD και μείωση του κινδύνου αλλεργικών ασθενειών [άσθμα, πυρετός εκ χόρτου (hay fever), έκζεμα], ατοπικής δερματίτιδας και ατοπίας γενικότερα (ατοπική δερματίτιδα στη βρεφική ηλικία και αλλεργική ρινίτιδα και άσθμα στη μετέπειτα παιδική ηλικία) (166). Το γονίδιο *AP5B1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου AP-5 και η οποία εμπλέκεται στη μεταφορά των ενδοσωμάτων, ενώ το *OVOL1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αποτελεί πιθανό μεταγραφικό παράγοντα. Το *AP5B1* σχετίζεται με την ατελή οστεογένεση τύπου XII που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και χαρακτηρίζεται από γενικευμένη οστεοπόρωση, ήπιες οστικές παραμορφώσεις, επαναλαμβανόμενα κατάγματα, ατελή οδοντογένεση και λευκό σκληρό του οφθαλμού.

Η ανάλυση eQTL έδειξε ότι αυτό το SNP σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε περιφερικό αίμα, λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές, μετασχηματισμένα από τον EBV λεμφοκύτταρα, θυρεοειδή και κνημιαία αρτηρία. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ατοπική δερματίτιδα, το άσθμα και το έκζεμα σχετίζονται με χαμηλή BMD λόγω διάφορων παραγόντων, όπως χρήση κορτικοστεροειδών, δίαιτες που αποφεύγουν το γάλα και άλλα τρόφιμα με αποτέλεσμα ανεπαρκής πρόσληψη ασβεστίου, ελαττωμένη φυσική δραστηριότητα, ανεπάρκεια βιταμίνης D, καθώς επίσης λόγω της φλεγμονώδους φύσης των ασθενειών (167-169).

Επιπλέον, το SNP rs9668810 που βρίσκεται στο γονίδιο *SSPN* (αλληλόμορφο ελέγχου T) σχετίζονταν με μείωση της BMD και μείωση του κινδύνου ανδρογενούς

αλωπεκίας. Η eQTL ανάλυση έδειξε ότι αυτό το SNP δε σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε ανθρώπινο μη οστικό ιστό. Τα επιδημιολογικά δεδομένα υποδηλώνουν πιθανό κοινό γενετικό υπόβαθρο μεταξύ της BMD και της ανδρογενοϋς αλωπεκίας (127). Επίσης, πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα των τριχοθυλακίων που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία είναι ικανά για διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες (170).

#### 2.2.3.4.4. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Το SNP rs3118905 που βρίσκεται στο γονίδιο *DLEU1* (αλληλόμορφο ελέγχου G) σχετίστηκε με μείωση της BMD και αύξηση του ύψους. Το *DLEU1* είναι ένα RNA γονίδιο που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη και το οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Με βάση την eQTL ανάλυση, αυτό το SNP δε σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε ανθρώπινο μη οστικό ιστό. Υπάρχουν αρκετά επιδημιολογικά δεδομένα που αναδεικνύουν κοινό γενετικό υπόβαθρο μεταξύ της BMD και του ύψους (42), καθώς επίσης ότι το ύψος αποτελεί κλινικό παράγοντα κινδύνου για κάταγμα (171, 172).

Επιπρόσθετα, το SNP rs4776908 στον 15q23 γενετικό τόπο στο γονίδιο *AAGAB* (αλληλόμορφο ελέγχου T), σχετίστηκε με μείωση της BMD και αύξηση της περιφέρειας μέσης, ενώ το SNP rs4963975 στον 12p12.1 γενετικό τόπο στο γονίδιο *SSPN* (αλληλόμορφο ελέγχου G), σχετίστηκε με μείωση της BMD και μείωση της περιφέρειας μέσης που θέτει υπό αμφισβήτηση την κατεύθυνση της πλειοτροπίας στο επίπεδο του πολυμορφισμού. Το γονίδιο *AAGAB* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μεταφορά κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη και μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική ανακύκλωση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

όπως ο EGFR. Το γονίδιο *SSPN* κωδικοποιεί ένα μέλος του συμπλόκου δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης που εκτείνεται στο σαρκόλημμα και παρέχει δομική σύνδεση μεταξύ του κυτταροσκελετού και της εξωκυττάριας ουσίας των μυϊκών κυττάρων. Η ανάλυση eQTL για το SNP rs4776908 έδειξε ότι σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε υποδόριο λιπώδη ιστό, κνημιαία αρτηρία, περιφερικό αίμα, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, θυρεοειδή και ολικό αίμα.

Η παχυσαρκία θεωρείται παραδοσιακά ωφέλιμη για την υγεία των οστών (173). Ένας μηχανισμός που εξηγεί την αυξημένη BMD που παρατηρείται στα παχύσαρκα άτομα είναι η αυξημένη μηχανική φόρτιση που ασκείται στα οστά. Επιπλέον, ο λιπώδης ιστός είναι μία από τις κύριες πηγές του ενζύμου αρωματάση το οποίο μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα, ορμόνες οι οποίες ασκούν προστατευτική δράση έναντι της οστεοπόρωσης. Ωστόσο, αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η παχυσαρκία μπορεί να είναι επιβαρυντική για την οστική υγεία (142, 174, 175). Πιθανοί μηχανισμοί αποτελούν το αυξημένο οξειδωτικό στρες, η μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου λόγω υψηλής πρόσληψης λίπους, η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας, η χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή η οποία προκαλεί αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, η μεταβολή παραγωγής και έκκρισης αντιποκινών από τα λιποκύτταρα (αύξηση λεπτίνης, ελάττωση αντιπονεκτίνης), καθώς επίσης η συνύπαρξη με την παχυσαρκία καταστάσεων οι οποίες επηρεάζουν δυσμενώς την οστική υγεία (π.χ. σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ανεπάρκεια βιταμίνης D). Επιπλέον, η απορρύθμιση του κοινού πολυδύναμου μεσεγγυματικού βλαστικού κυττάρου μπορεί να προάγει τη διαφοροποίηση των

λιποκυττάρων και τη συσσώρευση λίπους, ενώ μειώνει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και το σχηματισμό οστού.

#### 2.2.3.4.5. Συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών στον ορό και στα ούρα

Το SNP rs4072037 που βρίσκεται στο γονίδιο *MUC1* (αλληλόμορφο ελέγχου T) σχετίστηκε με αύξηση της BMD και μείωση των επιπέδων μαγνησίου. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, το γονίδιο *MUC1* κωδικοποιεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος, όπως επίσης στο σχηματισμό προστατευτικών φραγμών στο βλεννογόνο επιθηλιακών επιφανειών. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, η ανάλυση eQTL έδειξε ότι αυτό το SNP σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε διάφορους ανθρώπινους μη οστικούς ιστούς. Η ανεπάρκεια μαγνησίου έχει συνδεθεί με χαμηλή BMD σε μελέτες παρατήρησης και σε μελέτες σε ζώα μέσω άμεσης επίδρασης στα οστεοκύτταρα, καθώς και έμμεσα επηρεάζοντας την έκκριση και δράση της παραθορμόνης και προκαλώντας χαμηλού βαθμού φλεγμονή (176). Ωστόσο, τα ευρήματα της μελέτης είναι σε συμφωνία με την υψηλότερη BMD που παρατηρείται σε ασθενείς με χαμηλές συγκεντρώσεις μαγνησίου στον ορό ως αποτέλεσμα του συνδρόμου Gitelman (177). Παθοφυσιολογικά, η σοβαρή ανεπάρκεια μαγνησίου συνδέεται με αναβολικές επιδράσεις στα οστά και αναστολή οστικής απορρόφησης μέσω εν μέρει επηρεασμένης έκκρισης και/ή ανταπόκρισης του σκελετού στην παραθορμόνη και τη βιταμίνη D (178).

Επιπλέον, το SNP rs8841276 που βρίσκεται στο γονίδιο *SLC30A10* (αλληλόμορφο ελέγχου A) σχετίστηκε με μείωση της BMD και αύξηση του λόγου μαγνήσιο/ασβέστιο ούρων. Το γονίδιο *SLC30A10* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία

παίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά μαγγανίου, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδά του και παρέχοντας προστασία με αυτόν τον τρόπο έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από αύξηση των επιπέδων του. Επιπρόσθετα, διαμεσολαβεί τη μεταφορά ψευδαργύρου στα ενδοσώματα αποτρέποντας πιθανή τοξικότητα λόγω αυξημένων επιπέδων. Η ανάλυση eQTL έδειξε ότι αυτό το SNP δε σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε ανθρώπινο μη οστικό ιστό. Διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα συνδέουν τη συγκέντρωση ασβεστίου στα ούρα με την υγεία των οστών. Συγκεκριμένα, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με μειωμένη BMD παρουσιάζει συχνά υπερασβεστιουρία, η οποία θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα αυξημένης οστικής απορρόφησης (179, 180).

#### 2.2.3.4.6. Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στον ορό

Το SNP rs7899547 που βρίσκεται κοντά στο γονίδιο *MBL2* (αλληλόμορφο ελέγχου T) σχετίστηκε με τη BMD και οι συγκεντρώσεις της δεσμεύουσας τη μαννόζη πρωτεΐνης C η οποία είναι μία ασβέστιο-εξαρτώμενη λεκτίνη που εμπλέκεται στην ανοσολογική απάντηση. Το γονίδιο *MBL2* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία εκκρίνεται από το ήπαρ ως μέρος της απόκρισης οξείας φάσης και εμπλέκεται στην ανοσολογική απάντηση. Η ανάλυση eQTL έδειξε ότι το συγκεκριμένο SNP δε σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση σε ανθρώπινο μη οστικό ιστό. Τα επιδημιολογικά δεδομένα προτείνουν πολλαπλές γενετικές συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών του ορού και της BMD (181), καθώς και ότι οι πρωτεΐνες είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την οστική υγεία (182).

#### 2.2.3.4.7. Ερυθρά αιμοσφαίρια

Το SNP rs9303601 που βρίσκεται στο γονίδιο *AC004596.1* (αλληλόμορφο ελέγχου A) σχετίστηκε με μείωση της BMD και μείωση των δικτυοερυθροκυττάρων. Το *AC004596.1* είναι ένα RNA γονίδιο, το προϊόν μεταγραφής του οποίου είναι συμπληρωματικό με το γονίδιο *ATXN7L3* το οποίο σχετίζεται με τη νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία 7 (SpinoCerebellar Ataxia, SCA7). Η ανάλυση eQTL έδειξε ότι αυτό το SNP σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση στο αίμα. Επιδημιολογικά δεδομένα προτείνουν ότι οι αιματολογικές ασθένειες που συνοδεύονται από χρόνια αναιμία (π.χ. μεσογειακή αναιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία, χρόνια αιμολυτική αναιμία) χαρακτηρίζονται από την ελαττωμένη BMD δεδομένης της συσχέτισης των κυττάρων του οστίτη ιστού και του αιμοποιητικού συστήματος (183, 184).

#### 2.2.3.4.8. Εκπαιδευτικό επίπεδο

Το SNP rs301800 που βρίσκεται στο γονίδιο *RERE* (αλληλόμορφο ελέγχου C) σχετίστηκε με μείωση της BMD και μείωση των ετών εκπαίδευσης. Το γονίδιο *RERE* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη και την επιβίωση. Η ανάλυση eQTL έδειξε ότι αυτό το SNP σχετίστηκε με γονιδιακή έκφραση στο αίμα, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, αριστερή κοιλία, σπλαχνικό λιπώδη ιστό και δέρμα. Επιδημιολογικά στοιχεία προτείνουν ότι οι γυναίκες με τριτοβάθμια εκπαίδευση έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να πραγματοποιήσουν μέτρηση DXA και γενικά παρακολουθούν στενά τυχόν αλλαγές της BMD (185), καθώς επίσης άτομα με χαμηλότερο επίπεδο εκπαίδευσης είναι πιο πιθανό να έχουν χαμηλότερη BMD (186).



#### 2.2.3.5. Παλινδρόμηση LDSC

Η παλινδρόμηση LDSC απέδωσε 60 αποτελέσματα γενετικής συσχέτισης μεταξύ LS-BMD ή FN-BMD και των φαινοτύπων που επικυρώθηκαν στην UK Biobank μέσω της προσέγγισής μας. Σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ , εντοπίστηκαν 14 συσχετίσεις μεταξύ της BMD και των επικυρωμένων φαινοτύπων. Συγκεκριμένα, η γενετική συσχέτιση μεταξύ της BMD και του ύψους, των επιπέδων πρωτεΐνης στο αίμα (αλβουμίνη) και του βαθμού αλωπεκίας 3 (μετρίου) ή 4 (σοβαρού) ήταν στατιστικά σημαντική και θετική. Η γενετική συσχέτιση μεταξύ της BMD και του πυρετού εκ χόρτου ή της αλλεργικής ρινίτιδας ήταν στατιστικά σημαντική αλλά αρνητική. Οι εκτιμήσεις κυμαίνονταν από -0,1628 έως 0,3885. Επιπλέον, η γενετική συσχέτιση μεταξύ της BMD και των άλλων φαινοτύπων που εντοπίστηκαν στη μελέτη μας (άσθμα, δερματίτιδα, έκζεμα, νόσος Parkinson, περιφέρεια μέσης και ηλικία ολοκλήρωσης της εκπαίδευσης) δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

#### 2.2.4. Συζήτηση

Χρησιμοποιώντας σάρωση πλειοτροπίας σε όλο το γονιδίωμα, εξετάστηκαν περισσότερα από 63.500 SNPs που είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με διάφορους μη οστικούς φαινοτύπους σε μελέτες GWA, για συσχέτιση με την BMD σε περισσότερα από 80.000 άτομα του συνασπισμού GEFOS. Τα ισχυρότερα SNPs επικυρώθηκαν σε ένα ανεξάρτητο δείγμα περισσότερων από 400.000 ατόμων Ευρωπαϊκής καταγωγής από τη μελέτη UK Biobank. Βρέθηκαν 12 SNPs που σχετίζονται με την BMD και άλλους μη οστικούς φαινοτύπους σε επίπεδο  $p$ -

value $<5 \times 10^{-8}$ . Πολλές παρατηρούμενες συσχετίσεις ήταν σύμφωνες με την ανάλυση eQTL και τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, η μείωση της BMD σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου νόσου Parkinson και μη καρδιακού τύπου καρκίνου στομάχου, καθώς και με μείωση του κινδύνου ανδρογενούς αλωπεκίας, ατοπικής δερματίτιδας και αλλεργικής νόσου. Επιπλέον, η μείωση της BMD σχετίζεται με αύξηση του ύψους, του λόγου μαγνησίου/ασβεστίου στα ούρα, του μαγνησίου στον ορό, καθώς και με μείωση των δικτυοερυθροκυττάρων και με χαμηλότερο επίπεδο εκπαίδευσης. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτές οι συσχετίσεις είναι μόνο υποθετικές και πρέπει να επικυρωθούν λαμβάνοντας υπόψη τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων, καθώς και την επίδραση του περιβάλλοντος.

Η παρούσα μελέτη, η οποία σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε πριν την ανάλυση των BMD δεδομένων της UK Biobank, χρησιμοποίησε πλαίσιο μελετών GWA και ακολούθησε διαφορετική μεθοδολογία βασισμένη στην έννοια της πλειοτροπίας. Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν παρουσιάζουν σημαντική αλληλοεπικάλυψη με την πρόσφατη προσπάθεια GWAS των Morris *et al.* (81), γεγονός που αντικατοπτρίζει τη χρησιμότητα της μεθόδου που εφαρμόστηκε και τη δυνητική της αξία όταν δεν υπάρχουν πρόσθετα GWAS δεδομένα.

Συνεπώς, χρησιμοποιώντας εναλλακτικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι πλειοτροπικές συσχετίσεις των διάφορων φαινοτύπων και να εμπλουτιστεί η γενετική τους κατανόηση. Το υψηλό ποσοστό των SNPs τα οποία πέρασαν επιτυχώς τη φάση επικύρωσης μπορεί να αποτελεί ένδειξη υψηλής πλειοτροπικής φύσης των ανθρώπινων γενετικών συσχετίσεων για τα μυοσκελετικά

χαρακτηριστικά όπως έχει ήδη περιγραφεί (187). Επιπλέον, η *in silico* αξιολόγηση έδειξε ότι τα μισά από τα 12 πλειοτροπικά SNPs σχετίζονταν με γονιδιακή έκφραση σε μη οστικούς ιστούς και το ένα τρίτο των 12 SNPs σχετίζονταν με έκφραση γονιδίων σε μη οστικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτούς που αναμένονταν από τις συσχετίσεις τους στον NHGRI-EBI Κατάλογο.

Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μελέτης είναι το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από το μεγάλο συνασπισμό GEFOS, καθώς επίσης ότι πραγματοποιήθηκε επικύρωση των αποτελεσμάτων στη μεγάλη μελέτη UK Biobank. Πράγματι, η χρήση μεγάλων μεγεθών δείγματος έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός τρόπος για την ενίσχυση της γενετικής κατανόησης των σύνθετων φαινοτύπων (188). Επιπλέον, εφαρμόστηκε η λιγότερο συντηρητική μέθοδος FDR για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών ευρημάτων και εντοπίστηκαν γειτονικοί πολυμορφισμοί των SNPs από τον NHGRI-EBI Κατάλογο προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια πιθανών SNPs με υψηλό βαθμό συσχέτισης.

Ωστόσο, η παρούσα προσέγγιση χαρακτηρίζεται από σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, η ανάλυση περιορίστηκε σε SNPs που περιλαμβάνονται στον NHGRI-EBI Κατάλογο και επομένως δεν έχουν συμπεριληφθεί SNPs που εντοπίστηκαν σε μεγάλες μελέτες υποψήφιων γονιδίων. Επιπλέον, εφαρμόστηκε το αυστηρό όριο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  και ως αποτέλεσμα SNPs με ασθενέστερες συσχετίσεις ενδέχεται να μην έχουν εντοπιστεί. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε κοινούς πολυμορφισμούς (η χαμηλότερη τιμή MAF ήταν 0,04) και επομένως λιγότερο συχνοί πολυμορφισμοί δεν έχουν εντοπιστεί. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δεδομένα υπερηχογραφήματος πτέρνας από την UK Biobank για να εξεταστούν οι διάφορες

οστικές συσχετίσεις αντί να χρησιμοποιηθεί η πιο συμβατική μέθοδος της DXA στο ισχίο ή τη σπονδυλική στήλη. Επιπλέον, η αρχική αναζήτηση στον NHGRI-EBI Κατάλογο πραγματοποιήθηκε πριν την ανάλυση και την κριτική αξιολόγηση των δεδομένων της UK Biobank και επίσης δεν ήταν δυνατή η πραγματοποίηση ταυτόχρονης ανάλυσης γειτονικών πολυμορφισμών λόγω περιορισμού των δεδομένων.

Συμπερασματικά, η δεύτερη μελέτη της διδακτορικής διατριβής προτείνει 12 πλειοτροπικά BMD SNPs, καθώς και πιθανές κοινές γενετικές συσχετίσεις με διάφορους μη οστικούς φαινοτύπους. Μία τέτοια προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό πλειοτροπικών πολυμορφισμών και κοινών βιολογικών οδών μεταξύ φαινομενικά μη σχετιζόμενων φαινοτύπων. Απαιτείται επικύρωση αυτών των σημάτων χρησιμοποιώντας πρόσθετα βιολογικά δεδομένα. Αυτό όχι μόνο θα εμβαθύνει την κατανόηση της γενετικής αρχιτεκτονικής και την ελλείπουσα κληρονομησιμότητα της οστεοπόρωσης, αλλά θα έχει επίσης κλινικά σημαντικές συνέπειες.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Πρόσφατα δεδομένα από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας υποστηρίζουν την ύπαρξη γενετικών πλειοτροπικών συσχετίσεων μεταξύ της οστικής πυκνότητας και της οστεοπόρωσης και άλλων φαινοτύπων εντός και εκτός του μυοσκελετικού συστήματος.
- Η μελέτη γενετικής πλειοτροπίας της οστικής πυκνότητας πραγματοποιώντας ευρεία σάρωση του γονιδιώματος (genome-wide pleiotropy scan) και χρήση δεδομένων από το συνασπισμό GEFOS στη φάση ανακάλυψης και τη μελέτη UK Biobank στη φάση επικύρωσης, ανέδειξε 12 γενετικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την οστική πυκνότητα και μη οστικούς φαινοτύπους. Επτά από τους 12 πολυμορφισμούς βρίσκονται σε γονίδια που εκφράζονται σε μη οστικούς ιστούς ή κύτταρα.
- Η αποσαφήνιση της αιτιολογίας της οστεοπόρωσης μέσω μελέτης της γενετικής πλειοτροπίας της νόσου μπορεί να έχει κλινικά σημαντικές συνέπειες στον τομέα της πρόληψης (εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου σε άτομα υψηλού κινδύνου) αλλά και της θεραπείας (ανακάλυψη νέων φαρμάκων με πλειοτροπικές δράσεις, επαναστόχευση των ήδη υπαρχόντων φαρμάκων).



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν η αποσαφήνιση της αιτιολογίας της οστεοπόρωσης, της συχνότερης διαταραχής των οστών, μέσω μελέτης της γενετικής πλειοτροπίας της νόσου.

Στην προσπάθεια αποτίμησης των πλειοτροπικών γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με ελαττωμένη οστική πυκνότητα (Bone Mineral Density, BMD) και διάφορους φαινοτύπους πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Περιγράφηκαν τα πρόσφατα δεδομένα γενετικής πλειοτροπίας μεταξύ της BMD και της οστεοπόρωσης και 5 φαινοτύπων εντός του μυοσκελετικού συστήματος (κάταγμα, οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, άλιπη σωματική μάζα, εκφύλιση μεσοσπονδύλιου δίσκου στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης), καθώς επίσης των ακόλουθων 15 φαινοτύπων εκτός του μυοσκελετικού συστήματος: δείκτης μάζας σώματος, περιφέρεια μέσης, λόγος περιφέρειας μέσης-ισχίου, λιπώδης μάζα, %λίπος, στεφανιαία νόσος, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, λιπίδια πλάσματος, ύψος, ηλικία εμμηναρχής, ηλικία κατά την εφηβεία γενικότερα, κατανάλωση αλκοόλ, ανδρογενής αλωπεκία, καρκίνος μαστού και εκφύλιση ωχράς κηλίδας σχετιζόμενη με την ηλικία.

Στην προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης των ανωτέρω ενδείξεων παρουσίας πλειοτροπίας μεταξύ μυοσκελετικών και μη φαινοτύπων και της ελαττωμένης BMD, καθώς επίσης περαιτέρω κατανόησης της γενετικής αρχιτεκτονικής της BMD, αναζητήθηκαν πλειοτροπικές συσχετίσεις με φαινομενικά μη σχετιζόμενους, μη οστικούς φαινοτύπους. Ειδικότερα, στη φάση ανακάλυψης της

οστικής πλειοτροπίας, πραγματοποιώντας ευρεία σάρωση του γονιδιώματος (genome-wide pleiotropy scan), ελέγχθηκαν πολυμορφισμοί του NHGRI-EBI Καταλόγου που σχετίζονται με διάφορους μη οστικούς φαινοτύπους σε προηγούμενες μελέτες ευρείας σάρωσης του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) για συσχέτιση με την BMD (αυχένα κεφαλής μηριαίου οστού, οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης) σε περισσότερα από 80.000 άτομα του μεγάλου διεθνούς συνασπισμού GEFOS. Στη συνέχεια, στη φάση επικύρωσης της οστικής πλειοτροπίας, οι 72 ισχυρότεροι πολυμορφισμοί από τη φάση ανακάλυψης ελέγχθηκαν για επικύρωση σε περισσότερα από 400.000 άτομα από τη μεγάλη μελέτη UK Biobank.

Με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν 12 πλειοτροπικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την BMD (πτέρνας) και τους ακόλουθους 14 μη οστικούς φαινοτύπους σε επίπεδο  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ : ύψος, περιφέρεια μέσης, νόσος Parkinson, καρκίνος στομάχου μη καρδιακού τύπου, ανδρογενής αλωπεκία, αλλεργικές ασθένειες (άσθμα, πυρετός εκ χόρτου, έκζεμα), ατοπική δερματίτιδα, ατοπία γενικότερα, μαγνήσιο ορού, ηλεκτρολύτες ούρων, πρωτεΐνες ορού, δικτυοερυθροκύτταρα, κατανάλωση καφέ και εκπαιδευτικό επίπεδο. Οι 12 πλειοτροπικοί πολυμορφισμοί βρίσκονταν σε 11 γενετικούς τόπους, σε 8 χρωμοσώματα. Εννέα πολυμορφισμοί περιλαμβάνονταν στον NHGRI-EBI Κατάλογο, ενώ 3 πολυμορφισμοί ήταν γειτονικοί.

Συμπερασματικά, η διδακτορική διατριβή ανέδειξε την παρουσία διάφορων φαινοτυπικών συσχετίσεων για την οστεοπόρωση μέσω μελέτης της γενετικής πλειοτροπίας. Αξιοσημείωτα οφέλη από τη διερεύνηση της γενετικής πλειοτροπίας της οστεοπόρωσης αποτελούν οι κλινικές συνέπειες ενσωμάτωσης



των μοριακών ανακαλύψεων (υπεύθυνα γονίδια και μονοπάτια) στην αιτιολογία της νόσου. Στόχος είναι οι μελλοντικές προσπάθειες να επικεντρωθούν στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων με πλειοτροπικές δράσεις, στην επαναστόχευση των ήδη υπάρχοντων φαρμάκων, καθώς επίσης στην εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου σε άτομα υψηλού κινδύνου.



## **ABSTRACT IN ENGLISH**

Author: Maria Christou, MD

Title: Evaluation of genetic risk factors for bone disorders

The aim of this dissertation was to clarify the etiology of osteoporosis, the most common bone disorder, through studying the genetic pleiotropy of the disease.

Literature review was performed in an attempt to evaluate the pleiotropic genetic polymorphisms associated with reduced Bone Mineral Density (BMD) and different phenotypes. Recent genetic pleiotropic data were described in favor of the association between BMD/osteoporosis and 5 phenotypes within the musculoskeletal system (fracture, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, lean body mass, degeneration of the lumbar intervertebral disc), as well as for the following 15 phenotypes outside the musculoskeletal system: body mass index, waist circumference, waist-hip ratio, fat mass, %fat, coronary heart disease, type 2 diabetes, serum lipids, height, age at menarche, age at puberty, alcohol consumption, androgenic alopecia, breast cancer and age-related macular degeneration.

In an attempt to further investigate the above indications of the presence of pleiotropy between different phenotypes and reduced BMD/osteoporosis, as well as further understand the genetic architecture of BMD, pleiotropic associations with seemingly unrelated non-bone phenotypes were sought. Particularly, in the discovery phase of bone pleiotropy, genome-wide pleiotropy scan was performed and polymorphisms of the NHGRI-EBI Catalog related to various non-bone phenotypes in

previous Genome Wide Association Studies (GWAS) were tested for association with BMD (femoral neck, lumbar spine) in more than 80,000 individuals of the large international GEFOS Consortium. Then, in the replication phase of bone pleiotropy, the 72 strongest polymorphisms from the discovery phase were tested for validation in more than 400,000 individuals of the large study UK Biobank.

Twelve pleiotropic polymorphisms were identified associated with BMD (heel) and the following 14 non-bone phenotypes at  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ : height, waist circumference, Parkinson's disease, non-cardia gastric cancer, androgenic alopecia, allergic diseases (asthma, hay fever, eczema), atopic dermatitis, atopy, serum magnesium, urinary electrolytes, serum proteins, reticulocytes, coffee consumption and educational level. The 12 pleiotropic polymorphisms were located in 11 genetic loci, on 8 chromosomes. Nine polymorphisms were included in the NHGRI-EBI Catalog, while 3 polymorphisms were proxies.

In conclusion, the dissertation highlighted the presence of various phenotypic associations for osteoporosis through studying genetic pleiotropy. Remarkable benefits from the study of the genetic pleiotropy of osteoporosis are the clinical consequences of integrating molecular discoveries (responsible genes and pathways) into the etiology of the disease. The aim for future efforts is to focus on the development of new drugs with pleiotropic effects, repurposing of already existing drugs, as well as assessment of the risk develop the disease for high-risk individuals.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ralston SH, Penman, I. D., Strachan, M. W. J., & Hobson, R. . Davidson's principles and practice of medicine. 23rd ed2018.
2. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993;94(6):646-50.
3. Yang TL, Shen H, Liu A, et al. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(2):91-103.
4. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3318-25.
5. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med.* 2006;354(21):2250-61.
6. Rivadeneira F, Makitie O. Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(5):262-81.
7. Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone.* 2019;126:2-10.
8. Regan J, Long F. Notch signaling and bone remodeling. *Curr Osteoporos Rep.* 2013;11(2):126-9.
9. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137(2):216-33.
10. Yang J, Andre P, Ye L, et al. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci.* 2015;7(2):73-9.
11. Rao S, Cronin SJF, Sigl V, et al. RANKL and RANK: From Mammalian Physiology to Cancer Treatment. *Trends Cell Biol.* 2018;28(3):213-23.
12. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8:136.
13. Stone KL, Seeley DG, Lui LY, et al. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res.* 2003;18(11):1947-54.
14. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019;30(1):3-44.
15. Kanis JA, Oden A, McCloskey EV, et al. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos Int.* 2012;23(9):2239-56.
16. Papadimitriou N, Tsilidis KK, Orfanos P, et al. Burden of hip fracture using disability-adjusted life-years: a pooled analysis of prospective cohorts in the CHANCES consortium. *Lancet Public Health.* 2017;2(5):e239-e46.
17. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2006;17(12):1726-33.
18. Makras P, Anastasilakis AD, Antypas G, et al. The 2018 Guidelines for the diagnosis and treatment of osteoporosis in Greece. *Arch Osteoporos.* 2019;14(1):39.
19. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, et al. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone.* 2008;43(6):1115-21.
20. Gluer CC. Quantitative ultrasound techniques for the assessment of osteoporosis: expert agreement on current status. The International Quantitative Ultrasound Consensus Group. *J Bone Miner Res.* 1997;12(8):1280-8.

21. Gregg EW, Kriska AM, Salamone LM, et al. The epidemiology of quantitative ultrasound: a review of the relationships with bone mass, osteoporosis and fracture risk. *Osteoporos Int.* 1997;7(2):89-99.
22. Hans D, Dargent-Molina P, Schott AM, et al. Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *Lancet.* 1996;348(9026):511-4.
23. Bauer DC, Gluer CC, Cauley JA, et al. Broadband ultrasound attenuation predicts fractures strongly and independently of densitometry in older women. A prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med.* 1997;157(6):629-34.
24. Bauer DC, Ewing SK, Cauley JA, et al. Quantitative ultrasound predicts hip and non-spine fracture in men: the MrOS study. *Osteoporos Int.* 2007;18(6):771-7.
25. Faulkner KG, McClung MR, Coleman LJ, et al. Quantitative ultrasound of the heel: correlation with densitometric measurements at different skeletal sites. *Osteoporos Int.* 1994;4(1):42-7.
26. Trimpou P, Bosaeus I, Bengtsson BA, et al. High correlation between quantitative ultrasound and DXA during 7 years of follow-up. *Eur J Radiol.* 2010;73(2):360-4.
27. Genant HK, Lang TF, Engelke K, et al. Advances in the noninvasive assessment of bone density, quality, and structure. *Calcif Tissue Int.* 1996;59 Suppl 1:S10-5.
28. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996;312(7041):1254-9.
29. Johnell O, Kanis JA, Oden A, et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res.* 2005;20(7):1185-94.
30. Lespessailles E, Cortet B, Legrand E, et al. Low-trauma fractures without osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2017;28(6):1771-8.
31. Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1994;9(8):1137-41.
32. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, et al. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int.* 1998;8(5):468-89.
33. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, et al. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone.* 2008;42(3):467-75.
34. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2000;11(3):192-202.
35. Ferrari S, Bianchi ML, Eisman JA, et al. Osteoporosis in young adults: pathophysiology, diagnosis, and management. *Osteoporos Int.* 2012;23(12):2735-48.
36. Peltonen L, Perola M, Naukkarinen J, et al. Lessons from studying monogenic disease for common disease. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 1:R67-74.
37. Kryukov GV, Shpunt A, Stamatoyannopoulos JA, et al. Power of deep, all-exon resequencing for discovery of human trait genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3871-6.
38. Duncan E, Brown M, Shore EM. The revolution in human monogenic disease mapping. *Genes (Basel).* 2014;5(3):792-803.
39. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010;42(1):30-5.
40. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 2003;33(2):177-82.

41. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association S, Ehret GB, Munroe PB, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011;478(7367):103-9.
42. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*. 2010;467(7317):832-8.
43. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466(7307):707-13.
44. Panoutsopoulou K, Wheeler E. Key concepts in genetic epidemiology. *Genetic Epidemiology*: Springer; 2018. p. 7-24.
45. Fisher R. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans R Soc Edinburhg*. 1918;52:399-433.
46. Valero C, Zarrabeitia MT, Hernandez JL, et al. Bone mass in young adults: relationship with gender, weight and genetic factors. *J Intern Med*. 2005;258(6):554-62.
47. Peacock M, Turner CH, Econs MJ, et al. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2002;23(3):303-26.
48. Arden NK, Baker J, Hogg C, et al. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res*. 1996;11(4):530-4.
49. Demissie S, Dupuis J, Cupples LA, et al. Proximal hip geometry is linked to several chromosomal regions: genome-wide linkage results from the Framingham Osteoporosis Study. *Bone*. 2007;40(3):743-50.
50. Karasik D, Demissie S, Zhou Y, et al. Heritability and Genetic Correlations for Bone Microarchitecture: The Framingham Study Families. *J Bone Miner Res*. 2017;32(1):106-14.
51. Ioannidis JP. Why most published research findings are false. *PLoS Med*. 2005;2(8):e124.
52. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA*. 2004;292(17):2105-14.
53. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2006;145(4):255-64.
54. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, et al. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med*. 2006;3(4):e90.
55. Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, et al. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study. *Bone*. 2008;42(5):969-81.
56. van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, et al. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA*. 2008;299(11):1277-90.
57. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
58. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-9.
59. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005;6(2):109-18.
60. International HapMap C. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-96.
61. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):5-22.

62. Manolio TA. Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nat Rev Genet.* 2013;14(8):549-58.
63. Stranger BE, Stahl EA, Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics.* 2011;187(2):367-83.
64. Yang J, Bakshi A, Zhu Z, et al. Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nat Genet.* 2015;47(10):1114-20.
65. Sudlow C, Gallacher J, Allen N, et al. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. *PLoS Med.* 2015;12(3):e1001779.
66. Huang J, Howie B, McCarthy S, et al. Improved imputation of low-frequency and rare variants using the UK10K haplotype reference panel. *Nat Commun.* 2015;6:8111.
67. Bycroft C, Freeman C, Petkova D, et al. The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature.* 2018;562(7726):203-9.
68. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008;371(9623):1505-12.
69. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med.* 2008;358(22):2355-65.
70. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009;41(11):1199-206.
71. Xiong DH, Liu XG, Guo YF, et al. Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups. *Am J Hum Genet.* 2009;84(3):388-98.
72. Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet.* 2011;7(4):e1001372.
73. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44(5):491-501.
74. Zhang L, Choi HJ, Estrada K, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet.* 2014;23(7):1923-33.
75. Zheng HF, Forgetta V, Hsu YH, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature.* 2015;526(7571):112-7.
76. Pei YF, Hu WZ, Hai R, et al. Genome-wide association meta-analyses identified 1q43 and 2q32.2 for hip Ward's triangle areal bone mineral density. *Bone.* 2016;91:1-10.
77. Pei YF, Xie ZG, Wang XY, et al. Association of 3q13.32 variants with hip trochanter and intertrochanter bone mineral density identified by a genome-wide association study. *Osteoporos Int.* 2016;27(11):3343-54.
78. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet.* 2017;49(10):1468-75.
79. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, et al. Life-Course Genome-wide Association Study Meta-analysis of Total Body BMD and Assessment of Age-Specific Effects. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):88-102.
80. Pei YF, Hu WZ, Yan MW, et al. Joint study of two genome-wide association meta-analyses identified 20p12.1 and 20q13.33 for bone mineral density. *Bone.* 2018;110:378-85.



81. Morris JA, Kemp JP, Youtten SE, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet.* 2019;51(2):258-66.
82. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet.* 2009;41(1):15-7.
83. Timpson NJ, Tobias JH, Richards JB, et al. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Hum Mol Genet.* 2009;18(8):1510-7.
84. Medina-Gomez C, Kemp JP, Estrada K, et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the WNT16 locus. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002718.
85. Kim SK. Identification of 613 new loci associated with heel bone mineral density and a polygenic risk score for bone mineral density, osteoporosis and fracture. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200785.
86. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Sulem P, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature.* 2013;497(7450):517-20.
87. Gregson CL, Newell F, Leo PJ, et al. Genome-wide association study of extreme high bone mass: Contribution of common genetic variation to extreme BMD phenotypes and potential novel BMD-associated genes. *Bone.* 2018;114:62-71.
88. Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107(4):513-23.
89. Millan JL, Whyte MP. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(4):398-416.
90. Yang TL, Chen XD, Guo Y, et al. Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. *Am J Hum Genet.* 2008;83(6):663-74.
91. Oei L, Hsu YH, Styrkarsdottir U, et al. A genome-wide copy number association study of osteoporotic fractures points to the 6p25.1 locus. *J Med Genet.* 2014;51(2):122-31.
92. Deng FY, Zhao LJ, Pei YF, et al. Genome-wide copy number variation association study suggested VPS13B gene for osteoporosis in Caucasians. *Osteoporos Int.* 2010;21(4):579-87.
93. Delgado-Calle J, Sanudo C, Bolado A, et al. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. *J Bone Miner Res.* 2012;27(4):926-37.
94. Reppe S, Noer A, Grimholt RM, et al. Methylation of bone SOST, its mRNA, and serum sclerostin levels correlate strongly with fracture risk in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2015;30(2):249-56.
95. Delgado-Calle J, Sanudo C, Fernandez AF, et al. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics.* 2012;7(1):83-91.
96. Gamez B, Rodriguez-Carballo E, Ventura F. MicroRNAs and post-transcriptional regulation of skeletal development. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(3):R179-97.
97. van Wijnen AJ, van de Peppel J, van Leeuwen JP, et al. MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2013;11(2):72-82.
98. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308(5720):421-4.
99. Welter D, MacArthur J, Morales J, et al. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D1001-6.

100. Canela-Xandri O, Rawlik K, Tenesa A. An atlas of genetic associations in UK Biobank. *Nat Genet.* 2018;50(11):1593-9.
101. Stearns FW. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. *Genetics.* 2010;186(3):767-73.
102. Solovieff N, Cotsapas C, Lee PH, et al. Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies. *Nat Rev Genet.* 2013;14(7):483-95.
103. Sivakumaran S, Agakov F, Theodoratou E, et al. Abundant pleiotropy in human complex diseases and traits. *Am J Hum Genet.* 2011;89(5):607-18.
104. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D896-D901.
105. Watanabe K, Stringer S, Frei O, et al. A global overview of pleiotropy and genetic architecture in complex traits. *Nat Genet.* 2019;51(9):1339-48.
106. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, et al. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med.* 2008;27(8):1133-63.
107. Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol.* 2003;32(1):1-22.
108. Spain SL, Barrett JC. Strategies for fine-mapping complex traits. *Hum Mol Genet.* 2015;24(R1):R111-9.
109. Salinas YD, Wang Z, DeWan AT. Statistical Analysis of Multiple Phenotypes in Genetic Epidemiologic Studies: From Cross-Phenotype Associations to Pleiotropy. *Am J Epidemiol.* 2018;187(4):855-63.
110. Hackinger S, Zeggini E. Statistical methods to detect pleiotropy in human complex traits. *Open Biol.* 2017;7(11).
111. Galesloot TE, van Steen K, Kiemeneij LA, et al. A comparison of multivariate genome-wide association methods. *PLoS One.* 2014;9(4):e95923.
112. International Schizophrenia C, Purcell SM, Wray NR, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature.* 2009;460(7256):748-52.
113. Zhou X, Cheung CL, Karasugi T, et al. Trans-Ethnic Polygenic Analysis Supports Genetic Overlaps of Lumbar Disc Degeneration With Height, Body Mass Index, and Bone Mineral Density. *Front Genet.* 2018;9:267.
114. Cousminer DL, Mitchell JA, Chesni A, et al. Genetically Determined Later Puberty Impacts Lowered Bone Mineral Density in Childhood and Adulthood. *J Bone Miner Res.* 2018;33(3):430-6.
115. Grassmann F, Kiel C, Zimmermann ME, et al. Genetic pleiotropy between age-related macular degeneration and 16 complex diseases and traits. *Genome Med.* 2017;9(1):29.
116. van Rheenen W, Peyrot WJ, Schork AJ, et al. Genetic correlations of polygenic disease traits: from theory to practice. *Nat Rev Genet.* 2019;20(10):567-81.
117. Bulik-Sullivan BK, Loh PR, Finucane HK, et al. LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2015;47(3):291-5.
118. Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Anttila V, et al. An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nat Genet.* 2015;47(11):1236-41.
119. Zheng J, Erzurumluoglu AM, Elsworth BL, et al. LD Hub: a centralized database and web interface to perform LD score regression that maximizes the potential of summary level GWAS data for SNP heritability and genetic correlation analysis. *Bioinformatics.* 2017;33(2):272-9.

120. Yang J, Lee SH, Goddard ME, et al. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet.* 2011;88(1):76-82.
121. Trajanoska K, Morris JA, Oei L, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ.* 2018;362:k3225.
122. Medina-Gomez C, Kemp JP, Dimou NL, et al. Bivariate genome-wide association meta-analysis of pediatric musculoskeletal traits reveals pleiotropic effects at the SREBF1/TOM1L2 locus. *Nat Commun.* 2017;8(1):121.
123. Hackinger S, Trajanoska K, Styrkarsdottir U, et al. Evaluation of shared genetic aetiology between osteoarthritis and bone mineral density identifies SMAD3 as a novel osteoarthritis risk locus. *Hum Mol Genet.* 2017;26(19):3850-8.
124. Lee SJ, Lee JY, Sung J. Obesity and Bone Health Revisited: A Mendelian Randomization Study for Koreans. *J Bone Miner Res.* 2019;34(6):1058-67.
125. Matoba N, Akiyama M, Ishigaki K, et al. GWAS of smoking behaviour in 165,436 Japanese people reveals seven new loci and shared genetic architecture. *Nat Hum Behav.* 2019;3(5):471-7.
126. Wuttke M, Li Y, Li M, et al. A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet.* 2019;51(6):957-72.
127. Yap CX, Sidorenko J, Wu Y, et al. Dissection of genetic variation and evidence for pleiotropy in male pattern baldness. *Nat Commun.* 2018;9(1):5407.
128. Andreassen OA, Djurovic S, Thompson WK, et al. Improved detection of common variants associated with schizophrenia by leveraging pleiotropy with cardiovascular-disease risk factors. *Am J Hum Genet.* 2013;92(2):197-209.
129. Zhou R, Lin X, Li DY, et al. Identification of novel genetic loci for osteoporosis and/or rheumatoid arthritis using cFDR approach. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183842.
130. Hu Y, Tan LJ, Chen XD, et al. Identification of novel variants associated with osteoporosis, type 2 diabetes and potentially pleiotropic loci using pleiotropic cFDR method. *Bone.* 2018;117:6-14.
131. Hu Y, Tan LJ, Chen XD, et al. Identification of Novel Potentially Pleiotropic Variants Associated With Osteoporosis and Obesity Using the cFDR Method. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(1):125-38.
132. Greenbaum J, Wu K, Zhang L, et al. Increased detection of genetic loci associated with risk predictors of osteoporotic fracture using a pleiotropic cFDR method. *Bone.* 2017;99:62-8.
133. Lin X, Peng C, Greenbaum J, et al. Identifying potentially common genes between dyslipidemia and osteoporosis using novel analytical approaches. *Mol Genet Genomics.* 2018;293(3):711-23.
134. Peng C, Lou HL, Liu F, et al. Enhanced Identification of Potential Pleiotropic Genetic Variants for Bone Mineral Density and Breast Cancer. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(5):489-500.
135. Peng C, Shen J, Lin X, et al. Genetic sharing with coronary artery disease identifies potential novel loci for bone mineral density. *Bone.* 2017;103:70-7.
136. Lu S, Zhao LJ, Chen XD, et al. Bivariate genome-wide association analyses identified genetic pleiotropic effects for bone mineral density and alcohol drinking in Caucasians. *J Bone Miner Metab.* 2017;35(6):649-58.
137. Tan LJ, Wang ZE, Wu KH, et al. Bivariate Genome-Wide Association Study Implicates ATP6V1G1 as a Novel Pleiotropic Locus Underlying Osteoporosis and Age at Menarche. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(11):E1457-66.
138. Kaur Y, Wang DX, Liu HY, et al. Comprehensive identification of pleiotropic loci for body fat distribution using the NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies. *Obes Rev.* 2019;20(3):385-406.

139. van Vliet NA, Noordam R, van Klinken JB, et al. Thyroid Stimulating Hormone and Bone Mineral Density: Evidence From a Two-Sample Mendelian Randomization Study and a Candidate Gene Association Study. *J Bone Miner Res.* 2018;33(7):1318-25.
140. Giambartolomei C, Vukcevic D, Schadt EE, et al. Bayesian test for colocalisation between pairs of genetic association studies using summary statistics. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004383.
141. Chung D, Yang C, Li C, et al. GPA: a statistical approach to prioritizing GWAS results by integrating pleiotropy and annotation. *PLoS Genet.* 2014;10(11):e1004787.
142. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res.* 2011;6:30.
143. Billings LK, Hsu YH, Ackerman RJ, et al. Impact of common variation in bone-related genes on type 2 diabetes and related traits. *Diabetes.* 2012;61(8):2176-86.
144. Lewis JR, Eggermont CJ, Schousboe JT, et al. Association Between Abdominal Aortic Calcification, Bone Mineral Density, and Fracture in Older Women. *J Bone Miner Res.* 2019;34(11):2052-60.
145. Divers J, Palmer ND, Langefeld CD, et al. Genome-wide association study of coronary artery calcified atherosclerotic plaque in African Americans with type 2 diabetes. *BMC Genet.* 2017;18(1):105.
146. Wojczynski MK, Li M, Bielak LF, et al. Genetics of coronary artery calcification among African Americans, a meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2013;14:75.
147. Oei L, Estrada K, Duncan EL, et al. Genome-wide association study for radiographic vertebral fractures: a potential role for the 16q24 BMD locus. *Bone.* 2014;59:20-7.
148. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-53.
149. Panagiotou OA, Travis RC, Campa D, et al. A genome-wide pleiotropy scan for prostate cancer risk. *Eur Urol.* 2015;67(4):649-57.
150. Campa D, Barrdahl M, Tsilidis KK, et al. A genome-wide "pleiotropy scan" does not identify new susceptibility loci for estrogen receptor negative breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(2):e85955.
151. Fehringer G, Kraft P, Pharoah PD, et al. Cross-Cancer Genome-Wide Analysis of Lung, Ovary, Breast, Prostate, and Colorectal Cancer Reveals Novel Pleiotropic Associations. *Cancer Res.* 2016;76(17):5103-14.
152. Arnold M, Raffler J, Pfeufer A, et al. SNIAPA: an interactive, genetic variant-centered annotation browser. *Bioinformatics.* 2015;31(8):1334-6.
153. Melton LJ, 3rd. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population. *J Bone Miner Res.* 2003;18(6):1139-41.
154. Simes R. An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika.* 1986;73:751-4.
155. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological).* 1995;57:289-300.
156. Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics.* 2015;31(21):3555-7.
157. UK Biobank. Ultrasound Bone Densitometry. Version 1.0. (15/04/2011). [Available from: <https://biobank.ndph.ox.ac.uk/showcase/showcase/docs/Ultrasoundbonedensitometry.pdf>.
158. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D745-D51.

159. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;54:1 30 1-13.
160. Frost ML, Blake GM, Fogelman I. Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? *Osteoporos Int*. 2000;11(4):321-30.
161. Staley JR, Blackshaw J, Kamat MA, et al. PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinformatics*. 2016;32(20):3207-9.
162. Malochet-Guinamand S, Durif F, Thomas T. Parkinson's disease: A risk factor for osteoporosis. *Joint Bone Spine*. 2015;82(6):406-10.
163. Metta V, Sanchez TC, Padmakumar C. Osteoporosis: A Hidden Nonmotor Face of Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol*. 2017;134:877-90.
164. Lee SH, Kim MJ, Kim BJ, et al. Hyperhomocysteinemia due to levodopa treatment as a risk factor for osteoporosis in patients with Parkinson's disease. *Calcif Tissue Int*. 2010;86(2):132-41.
165. Lim JS, Lee JI. Prevalence, pathophysiology, screening and management of osteoporosis in gastric cancer patients. *J Gastric Cancer*. 2011;11(1):7-15.
166. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol*. 2014;5(2).
167. Wu CY, Lu YY, Lu CC, et al. Osteoporosis in adult patients with atopic dermatitis: A nationwide population-based study. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171667.
168. Sweeney J, Patterson CC, Menzies-Gow A, et al. Comorbidity in severe asthma requiring systemic corticosteroid therapy: cross-sectional data from the Optimum Patient Care Research Database and the British Thoracic Difficult Asthma Registry. *Thorax*. 2016;71(4):339-46.
169. Garg NK, Silverberg JI. Eczema is associated with osteoporosis and fractures in adults: a US population-based study. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):1085-7 e2.
170. Urano-Morisawa E, Takami M, Suzawa T, et al. Induction of osteoblastic differentiation of neural crest-derived stem cells from hair follicles. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174940.
171. Hemenway D, Feskanich D, Colditz GA. Body height and hip fracture: a cohort study of 90,000 women. *Int J Epidemiol*. 1995;24(4):783-6.
172. Compston JE, Flahive J, Hosmer DW, et al. Relationship of weight, height, and body mass index with fracture risk at different sites in postmenopausal women: the Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women (GLOW). *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):487-93.
173. Fassio A, Idolazzi L, Rossini M, et al. The obesity paradox and osteoporosis. *Eat Weight Disord*. 2018;23(3):293-302.
174. Shapses SA, Pop LC, Wang Y. Obesity is a concern for bone health with aging. *Nutr Res*. 2017;39:1-13.
175. Gkastaris K, Goulis DG, Potoupnis M, et al. Obesity, osteoporosis and bone metabolism. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2020;20(3):372-81.
176. Castiglioni S, Cazzaniga A, Albisetti W, et al. Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients*. 2013;5(8):3022-33.
177. Nicolet-Barousse L, Blanchard A, Roux C, et al. Inactivation of the Na-Cl co-transporter (NCC) gene is associated with high BMD through both renal and bone mechanisms: analysis of patients with Gitelman syndrome and Ncc null mice. *J Bone Miner Res*. 2005;20(5):799-808.
178. Wallach S. Effects of magnesium on skeletal metabolism. *Magnes Trace Elem*. 1990;9(1):1-14.

179. Arrabal-Polo MA, Cano-Garcia Mdel C, Canales BK, et al. Calcium nephrolithiasis and bone demineralization: pathophysiology, diagnosis, and medical management. *Curr Opin Urol.* 2014;24(6):633-8.
180. Ryan LE, Ing SW. Idiopathic hypercalciuria: Can we prevent stones and protect bones? *Cleve Clin J Med.* 2018;85(1):47-54.
181. Liang X, Du Y, Wen Y, et al. Assessing the Genetic Correlations Between Blood Plasma Proteins and Osteoporosis: A Polygenic Risk Score Analysis. *Calcif Tissue Int.* 2019;104(2):171-81.
182. Dolan E, Sale C. Protein and bone health across the lifespan. *Proc Nutr Soc.* 2019;78(1):45-55.
183. Gurevitch O, Slavin S. The hematological etiology of osteoporosis. *Med Hypotheses.* 2006;67(4):729-35.
184. Valderrabano RJ, Wu JY. Bone and blood interactions in human health and disease. *Bone.* 2019;119:65-70.
185. Holmberg T, Moller S, Rothmann MJ, et al. Socioeconomic status and risk of osteoporotic fractures and the use of DXA scans: data from the Danish population-based ROSE study. *Osteoporos Int.* 2019;30(2):343-53.
186. Du Y, Zhao LJ, Xu Q, et al. Socioeconomic status and bone mineral density in adults by race/ethnicity and gender: the Louisiana osteoporosis study. *Osteoporos Int.* 2017;28(5):1699-709.
187. Karasik D, Kiel DP. Evidence for pleiotropic factors in genetics of the musculoskeletal system. *Bone.* 2010;46(5):1226-37.
188. Evangelou E, Warren HR, Mosen-Ansorena D, et al. Genetic analysis of over 1 million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits. *Nat Genet.* 2018;50(10):1412-25.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Συμπληρωματικός Πίνακας 1.** Χαρακτηριστικά των πλειοτροπικών SNPs που σχετίζονται με τη BMD πτέρνας και μη οστικούς φαινότυπους στη φάση επικύρωσης στη UK Biobank.

SNP	Γειτονικό SNP	Λειτουργική σημασία του SNP	Χρωμοσωμική θέση	BMD (g/cm <sup>2</sup> )					Σχετιζόμενος(οι) φαινότυπος(οι) στον NHGRI-EBI Κατάλογο					
				EA	EAF	β	95% CI	p-value	Φαινότυπος	EA	EAF	β/OR	95% CI	p-value
rs3118905	ΔΕ	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	50531198	G	0,73	-0,030	(-0,034, -0,025)	1,49 x10 <sup>-33</sup>	Ύψος (m)	G	0,72	0,058	(0,052, 0,064)	1x10 <sup>-69</sup>
rs4963975	ΔΕ	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	26290097	G	0,76	-0,030	(-0,032, -0,022)	1,48 x10 <sup>-25</sup>	Περιφέρεια μέσης (cm)	G	0,75	-0,025	(-0,034, -0,017)	3x10 <sup>-9</sup>
rs6599389	ΔΕ	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	945325	A	0,07	-0,041	(-0,050, -0,033)	3,24 x10 <sup>-22</sup>	Νόσος Parkinson	A	0,08	1,31	(1,19, 1,44)	4x10 <sup>-8</sup>
rs884127	ΔΕ	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	219908808	A	0,36	-0,021	(-0,026, -0,017)	4,98 x10 <sup>-20</sup>	Ηλεκτρολύτες ούρων (λόγος μαγνησίου/ ασβεστίου) (ng/ng)	A	0,38	0,095	(0,063, 0,126)	3x10 <sup>-9</sup>
rs9668810	rs9300169	<sup>2</sup> Μη κωδικοποιό	26273487	T	0,28	-0,021	(-0,026, -0,017)	8,08 x10 <sup>-18</sup>	Ανδρογενής αλωπεκία	A	0,23	0,84	(0,80, 0,88)	4x10 <sup>-12</sup>
rs479844	ΔΕ	<sup>3</sup> Μη κωδικοποιό	65784486	A	0,45	-0,019	(-0,023, -0,014)	3,26 x10 <sup>-17</sup>	Ατοπική δερματίτιδα	A	0,44	0,9	(0,88, 0,92)	2x10 <sup>-18</sup>
rs479844	ΔΕ	<sup>3</sup> Μη κωδικοποιό	65784486	A	0,45	-0,019	(-0,023, -0,014)	3,26 x10 <sup>-17</sup>	Ατοπία	A	0,44	0,8	(0,70, 0,81)	4x10 <sup>-10</sup>
rs479844	ΔΕ	<sup>3</sup> Μη κωδικοποιό	65784486	A	0,45	-0,019	(-0,023, -0,014)	3,26 x10 <sup>-17</sup>	Αλλεργικές ασθένειες (άσθμα, πυρετός εκ χόρτου ή έκζεμα)	A	0,43	0,96	(0,95, 0,97)	2x10 <sup>-13</sup>

rs7221743	rs9902453	<sup>4</sup> Κωδικοποιό	30080858	G	0,56	-0,018	(-0,022, -0,014)	4,51 x10 <sup>-16</sup>	Κατανάλωση καφέ (φλιτζάνια/ ημέρα)	G	0,46	0,03	(0,01, 0,05)	3x10 <sup>-8</sup>
rs301800	ΔΕ	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	8430543	C	0,82	-0,021	(-0,027, -0,015)	3,61 x10 <sup>-13</sup>	Εκπαιδευτικό επίπεδο (έτη εκπαίδευσης)	C	0,82	-0,016	ΔΑ	3x10 <sup>-8</sup>
rs7899547	ΔΕ	<sup>3</sup> Μη κωδικοποιό	52777079	T	0,34	-0,017	(-0,021, -0,012)	1,00 x10 <sup>-12</sup>	Πρωτεΐνες ορού	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	2x10 <sup>-102</sup>
rs9303601	ΔΕ	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	44201473	A	0,13	-0,022	(-0,028, -0,016)	1,07 x10 <sup>-11</sup>	ΔΕΚ (%)	A	0,14	-0,034	(-0,045, -0,024)	4x10 <sup>-11</sup>
rs4072037	ΔΕ	<sup>5</sup> Μη κωδικοποιό	155192276	T	0,54	-0,014	(-0,018, -0,010)	2,67 x10 <sup>-10</sup>	Μαγνήσιο ορού (mmol/L)	T	0,54	0,01	(0,008, 0,012)	2x10 <sup>-36</sup>
rs4072037	ΔΕ	<sup>5</sup> Μη κωδικοποιό	155192276	T	0,54	-0,014	(-0,018, -0,010)	2,67 x10 <sup>-10</sup>	Καρκίνος στομάχου μη καρδιακού τύπου	T	0,84	1,35	(1,27, 1,45)	6x10 <sup>-17</sup>
rs4776908	rs7166081	<sup>1</sup> Μη κωδικοποιό	67247749	T	0,77	-0,015	(-0,020, -0,010)	1,06 x10 <sup>-08</sup>	Περιφέρεια μέσης (cm)	A	0,76	0,027	(0,018, 0,035)	2x10 <sup>-10</sup>

**Συνομογραφίες:** BMD: Bone Mineral Density – οστική πυκνότητα, CI: Confidence Interval – διάστημα εμπιστοσύνης, EA: Effect Allele – αλληλόμορφο ελέγχου, EAF: Effect Allele Frequency – συχνότητα αλληλομόρφου ελέγχου, NHGRI-EBI: National Human Genome Research Institute-European Bioinformatics Institute, OR: Odds Ratio – λόγος αναλογιών, SNP: Single Nucleotide Polymorphism – μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, β: συντελεστής βήτα, ΔΑ: δεν αναφέρεται, ΔΕ: δεν εφαρμόζεται, ΔΕΚ: δικτυοερυθροκύτταρα.

#### Σημειώσεις:

<sup>1</sup>Το μη κωδικοποιό SNP είναι ιντρόνιο.

<sup>2</sup>Το κωδικοποιό SNP είναι εξώνιο.

<sup>3</sup>Το μη κωδικοποιό SNP έχει ρυθμιστικό ρόλο (regulatory region variant).

<sup>4</sup>Το μη κωδικοποιό SNP είναι συνώνυμο.

<sup>5</sup>Το μη κωδικοποιό SNP βρίσκεται σε θέση ματίσματος (splice acceptor variant).

Στην περίπτωση πολλαπλών μελετών GWA για την ίδια συσχέτιση SNP-φαινοτύπου, επιλέγονταν η μελέτη με το μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος και τη μικρότερη τιμή p-value.



**Συμπληρωματικός Πίνακας 2.** LD μεταξύ των πλειοτροπικών SNPs της μελέτης μας και των SNPs των Morris *et al.*

SNP1	SNP2	Χρωμόσωμα	Θέση1	Θέση2	Απόσταση	Συντελεστής $r^2$
rs884127	rs2647462	1	220082150	220156090	73940	0,110845
rs301800	rs3765971	1	8490603	8445360	-45243	0,10592
rs301800	rs4908776	1	8490603	8804033	313430	0,488498
rs4072037	rs914615	1	155162067	155175892	13825	0,980084
rs7899547	rs12218358	10	54536839	54460783	-76056	0,209114
rs479844	rs10750766	11	65551957	65473798	-78159	0,228986
rs4963975	rs10842704	12	26443030	26462982	19952	0,940973
rs9668810	rs7974900	12	26426420	26428677	2257	0,988893
rs3118905	rs3118906	13	51105334	51106788	1454	0,995079
rs7221743	rs3760456	17	28407876	27948844	-459032	0,581595

**Συντομογραφίες:** LD: linkage disequilibrium – ανισορροπία σύνδεσης, SNP: Single Nucleotide Polymorphism – μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός.

**Σημειώσεις:**

SNP1: ένα από τα πλειοτροπικά SNPs της μελέτης μας

SNP2: ένα από τα SNPs των Morris *et al.*

Θέση1: χρωμοσωμική θέση για το SNP1

Θέση2: χρωμοσωμική θέση για το SNP2

Απόσταση: απόσταση μεταξύ των 2 SNPs

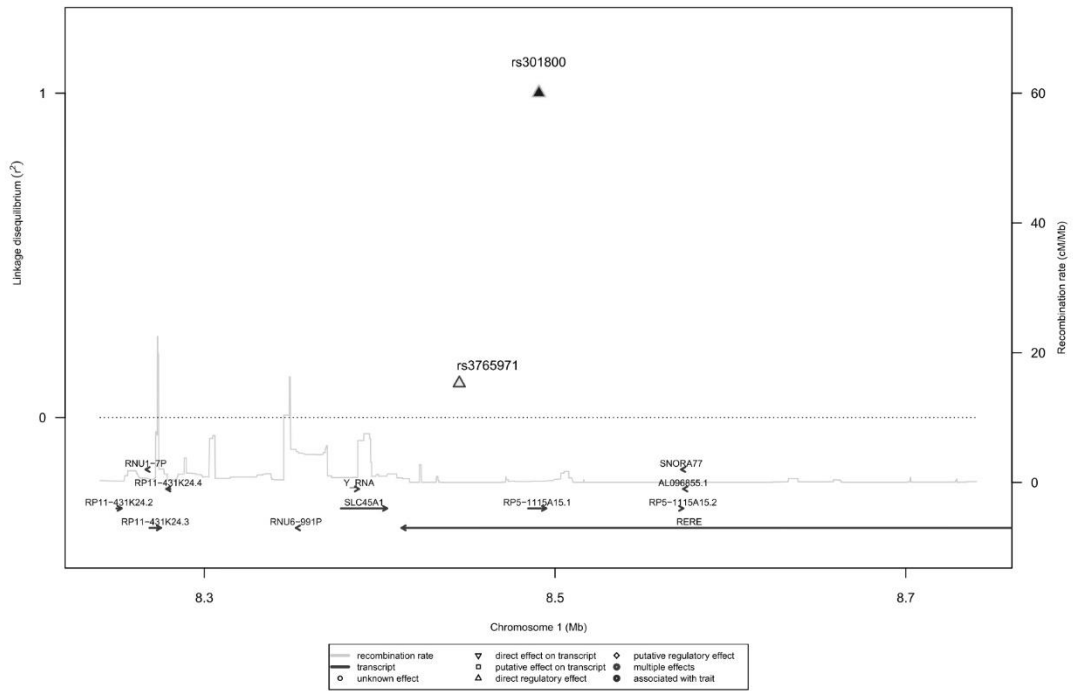
**Συμπληρωματικός Πίνακας 3.** Τα πλειοτροπικά SNPs και οι σχετιζόμενοι φαινότυποι στον NHGRI-EBI Κατάλογο και Phenoscaner.

SNP	Φαινότυποι στον NHGRI-EBI Κατάλογο	Κατηγορίες φαινοτύπων στον NHGRI-EBI Κατάλογο	Φαινότυποι στο Phenoscaner	Κατηγορίες φαινοτύπων στο Phenoscaner
rs6599389	Νόσος Parkinson	Νευρολογία	Περιφερικό αίμα, αίμα	Αίμα
rs479844	Ατοπική δερματίτιδα, ατοπία, αλλεργικές ασθένειες (άσθμα, πυρετός εκ χόρτου ή έκζεμα)	Δερματολογία, αλλεργία	Περιφερικό αίμα, λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές, μετασηματισμένα από τον EBV λεμφοκύτταρα, θυρεοειδής, κνημιαία αρτηρία	Αίμα, θυρεοειδής
rs7221743	Κατανάλωση καφέ	Διατροφή	Θυρεοειδής, ινοβλάστες, εγκάρσιο κόλον, κνημιαίο νεύρο, πνεύμονες, κνημιαία αρτηρία, φυσιολογικός προθυλακικός ειλεός, περιφερικά μονοκύτταρα αίματος, εγκέφαλος	Αίμα, κνημιαία αρτηρία, εγκέφαλος, ινοβλάστες, κόλον, ειλεός, πνεύμονες, κνημιαίο νεύρο, δέρμα, θυρεοειδής
rs301800	Εκπαιδευτικό επίπεδο	Κοινωνικοοικονομικά χαρακτηριστικά	παρεγκεφαλίδα, αίμα, ολικό αίμα, κάτω άκρο εκτεθειμένο στον ήλιο, περιφερικό αίμα	Αίμα, καρδιά, λιπώδης ιστός, δέρμα
rs3118905	Ύψος	Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	Αίμα, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, αριστερή κοιλία, σπλαχνικός λιπώδης ιστός, δέρμα	-
rs4963975	Περιφέρεια μέσης	Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	-	-
rs884127	Ηλεκτρολύτες ούρων (λόγος μαγνησίου/ασβεστίου)	Ηλεκτρολύτες	-	-
rs9668810	Ανδρογενής αλωπεκία	Δερματολογία	-	-
rs7899547	Πρωτεΐνες ορού	Πρωτεΐνες	-	-
rs9303601	Δικτυοερυθροκύτταρα	Αιματολογία	Περιφερικό αίμα, αίμα	Αίμα
rs4072037	Μαγνήσιο ορού, καρκίνος στομάχου μη καρδιακού τύπου	Ηλεκτρολύτες, γαστρεντερολογία	Στόμαχος, θυρεοειδής, πνεύμονας, πάγκρεας, μαστός,	Αίμα, εγκέφαλος, μαστός, ινοβλάστες, κόλον, οισοφάγος,

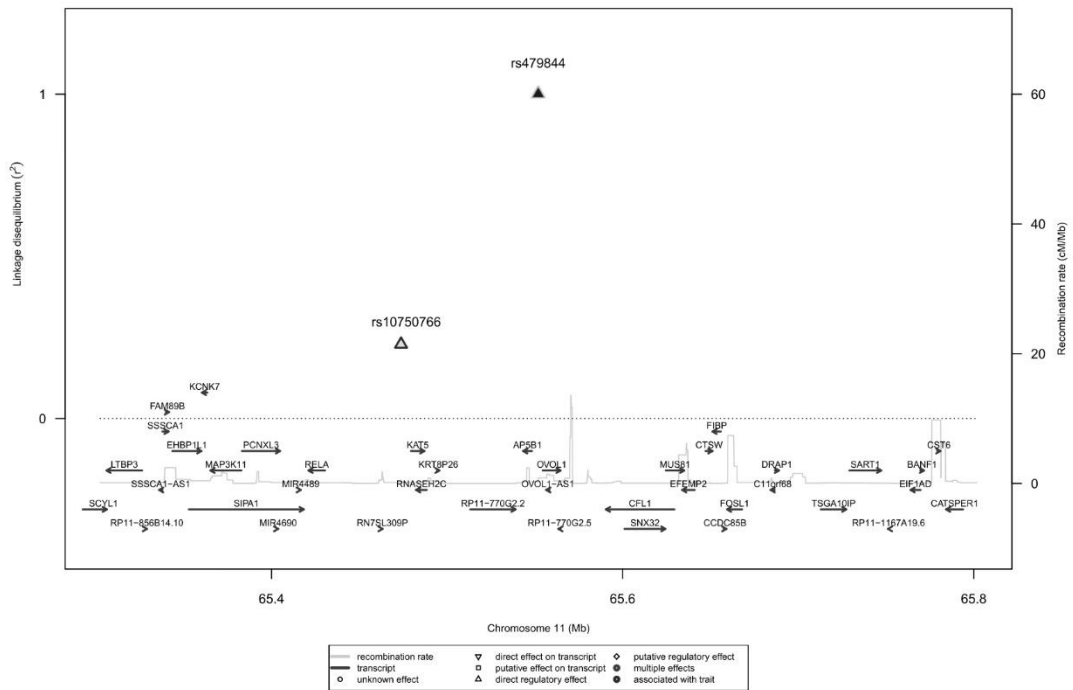
rs4776908	Περιφέρεια μέσης	Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	<p>προστάτης, σπλήνας, σκελετικός μυ, δέρμα, αίμα, μετασχηματισμένα από τον EBV λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, αρτηή, κνημιαία αρτηρία, αριστερή κοιλία, ωτίο αριστερού κόλπου, βλεννογόνος οισοφάγου, μυϊκές ίνες οισοφάγου, γαστρο-οισοφαγική συμβολή, φυσιολογικός προθυλακικός ειλεός, εγκάρσιο κόλον, σιγμοειδές κόλον, ινοβλάστες, υποδόριος λιπώδης ιστός, σπλαχνικός λιπώδης ιστός, κνημιαίο νεύρο, εγκεφαλικός φλοιός, εγκεφαλικό ημισφαίριο, παρεγκεφαλίδα</p> <p>Υποδόριος λιπώδης ιστός, κνημιαία αρτηρία, περιφερικό αίμα, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, θυρεοειδής, ολικό αίμα</p>	<p>καρδιά, ειλεός, πνεύμονες, σκελετικός μυς, κνημιαίο νεύρο, πάγκρεας, προστάτης, δέρμα, σπλήνας, στόμαχος, θυρεοειδής</p> <p>Αίμα, λιπώδης ιστός, κνημιαία αρτηρία, θυρεοειδής</p>
-----------	------------------	-------------------------------	---	--

**Συντομογραφίες:** EBV: Epstein - Barr Virus, ιός Epstein - Barr, NHGRI-EBI: National Human Genome Research Institute-European Bioinformatics Institute, SNP: Single Nucleotide Polymorphism – μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός.

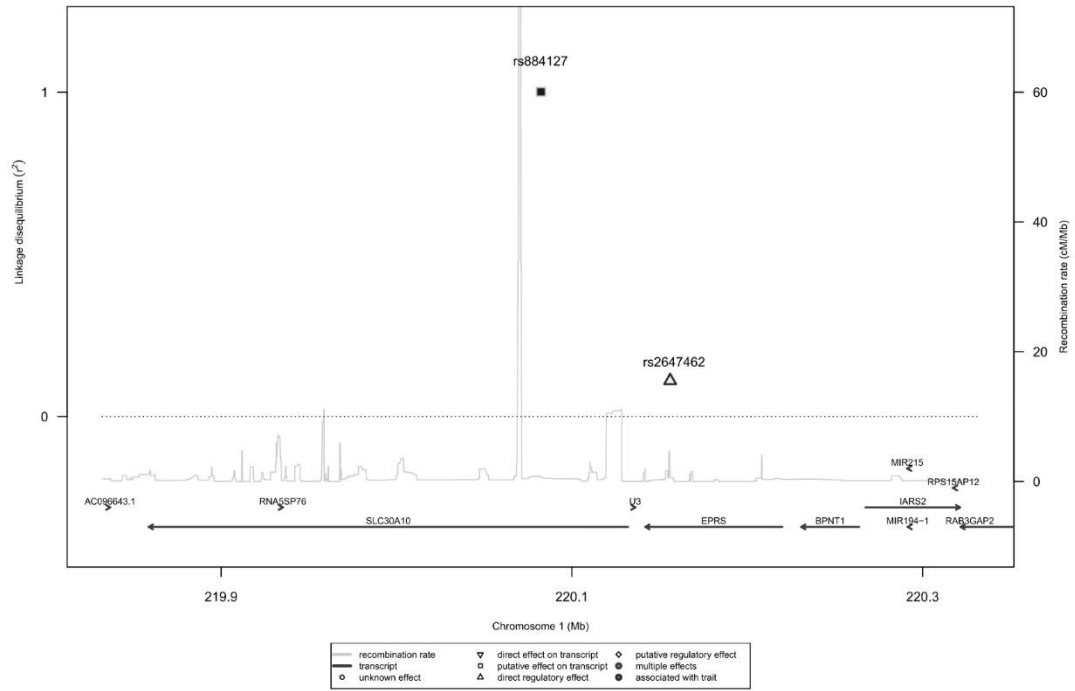




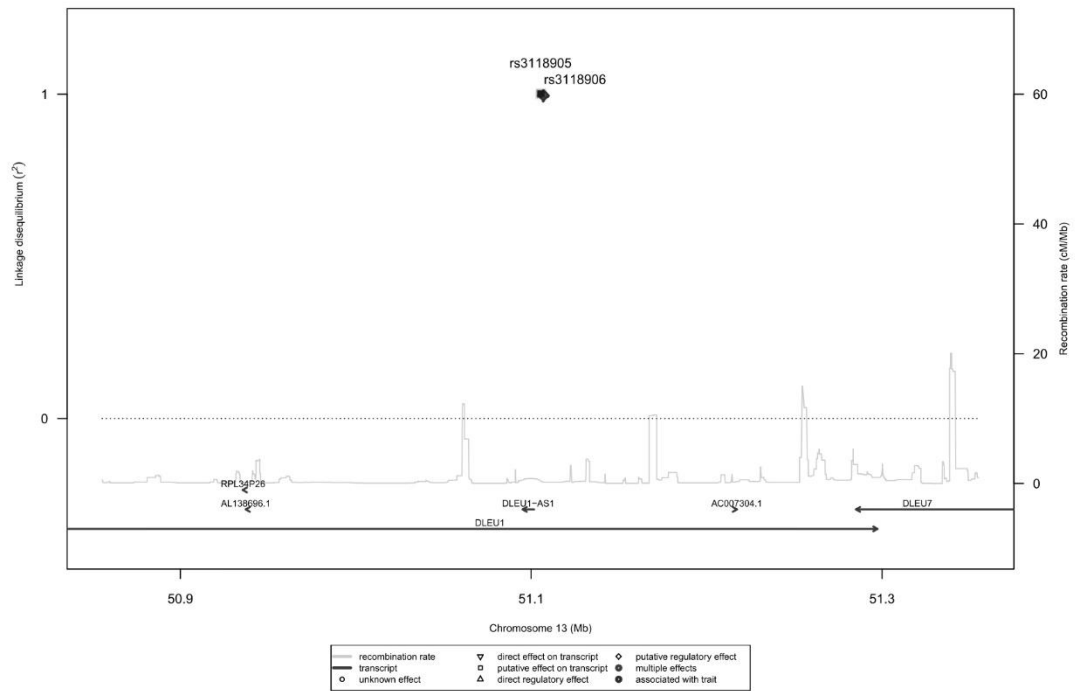
Συμπληρωματική Εικόνα 1. Διάγραμμα LD για τα SNPs rs301800 και rs3765971.



Συμπληρωματική Εικόνα 2. Διάγραμμα LD για τα SNPs rs479844 και rs10750766.

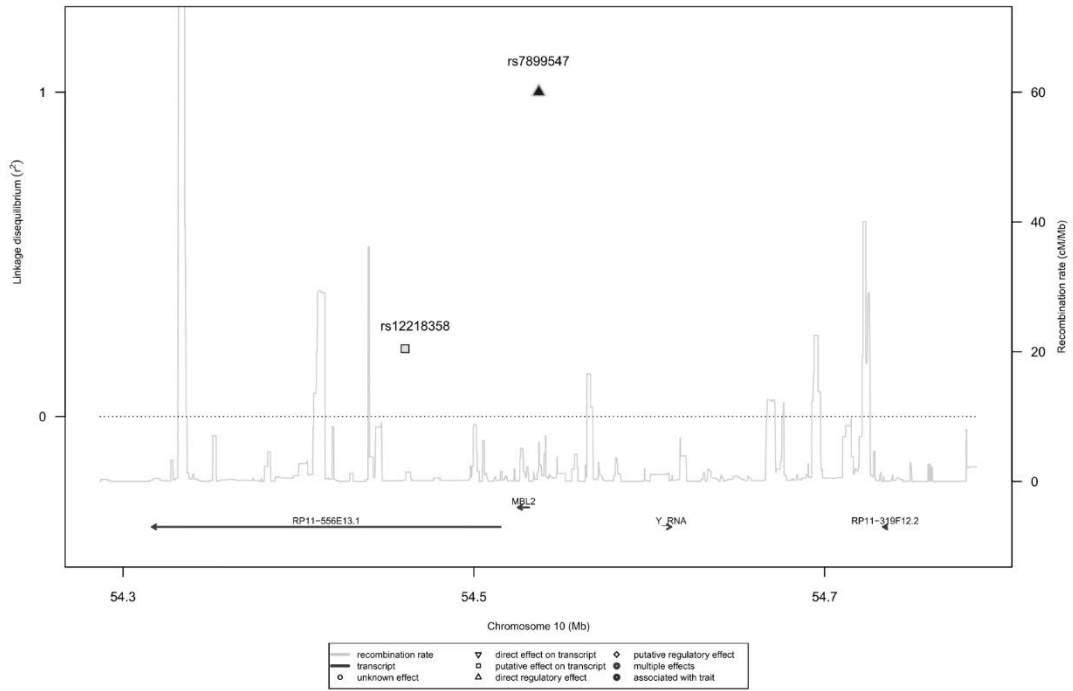


Συμπληρωματική Εικόνα 3. Διάγραμμα LD για τα SNPs rs884127 και rs2647462.

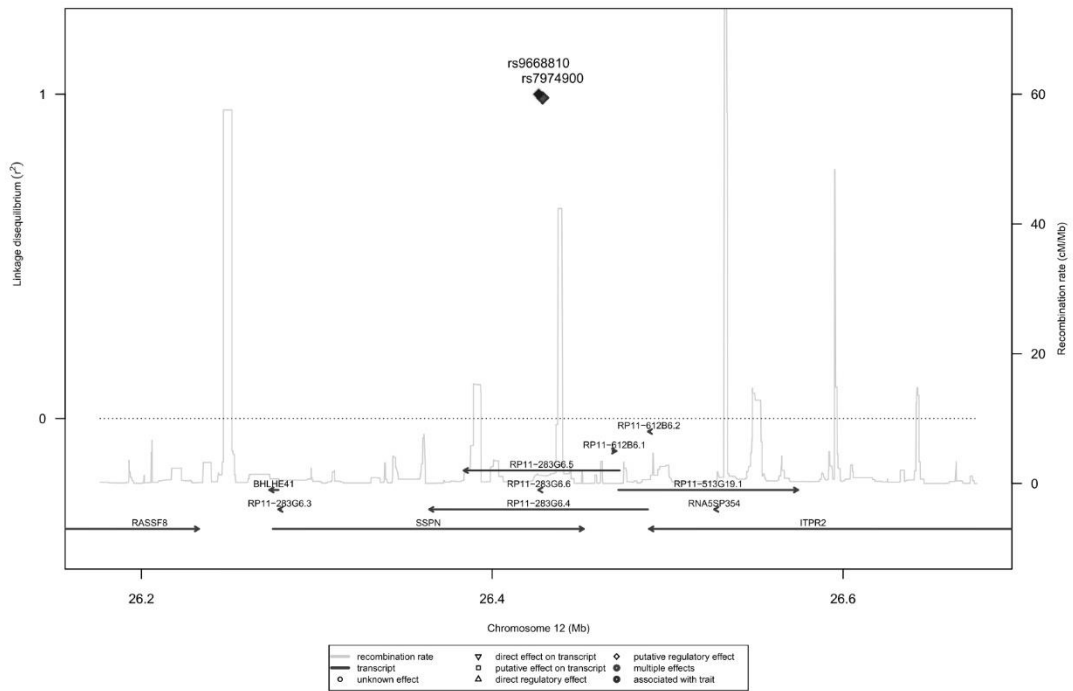


Συμπληρωματική Εικόνα 4. Διάγραμμα LD για τα SNPs rs3118905 και rs3118906.





Συμπληρωματική Εικόνα 7. Διάγραμμα LD για τα SNPs rs7899547 και rs12218358.



Συμπληρωματική Εικόνα 8. Διάγραμμα LD για τα SNPs rs9668810 και rs7974900.