

## Revisión

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

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

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

### Resumen

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

#### Palabras clave:

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

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

Este artículo se somete en cumplimiento del compromiso que se adquirió al obtener la BECA FEIOMM de Investigación 2019 para realizar el proyecto Estudios funcionales de variantes de cambio de sentido del gen *CYP1A1* hallados en pacientes con fractura femoral atípica.

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

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

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.000008

#### Correspondencia:

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

## ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (GWAS)

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

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

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

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

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

## GWAS Y HUESO

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

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

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

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

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

## ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA ERA POST-GWAS

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

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

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

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

Tabla I. Estudios GWAS sobre hueso y genes encontrados con variantes asociadas a fenotipos óseos

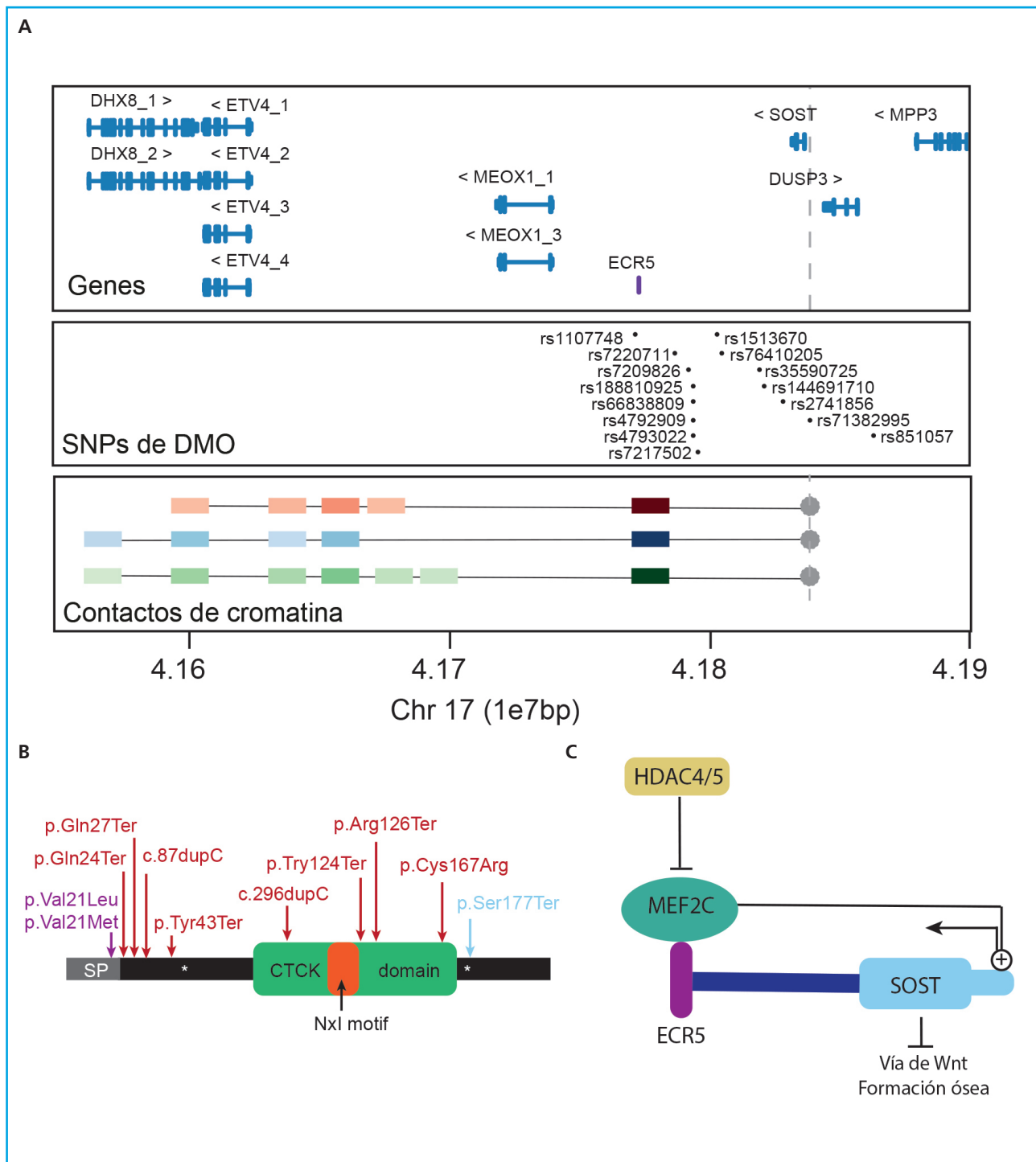
Estudio	Ancestría	Rasgo	Tamaño muestral	Locis/genes más relevantes	Locis nuevos/ loci totales
Strykarsdottir et al., 2009 (22)	Europea	DMO-CL, DMO-CF, FO	15 375	MARK3, SOST, SP7 ( <i>osterix</i> )	4/9
Rivadeneira et al., 2009 (23)	Europea	DMO-CL, DMO-CF	19 195	WLS, CTNNTB1, MEPE, STARDB3NL, FL42280, DDC5, SOX6, FOXL1, HDAC5, CRHR1, MEFC2	13/20
Guo et al., 2010 (24)		DMO-CT	11 568	ALDH7A1	1/1
Kung et al., 2010 (25)	Asiática	DMO-CL, DMO-CF, FO	18 898	JAG1	1/1
Hsu et al., 2010 (26)	Europea	DMO-CL, DMO-CF, CF-AE, AEC, LCF	11 290	RAP1A, TBC1D8, OSBPL1A	3/4
Estrada et al., 2012 (16)	Europea y asiática	DMO-CL, DMO-CF, FO	83 894	CDKAL/SOX4, CPED1, WNT16, MBL2/DKK1, AXIN1, RPS6KA5, ERC1/WNT5B, FAM210A, FAM9B/KAL1, SOX9, KLHDC5/PTLH, IDUA, NTAN1, SFRP4, SUPT3H/RUNX2	32/56
Strykarsdottir et al., 2013 (27)	Europea	DMO-CL, DMO-CuT, DMO-C, FO	97 315	LGR4	1/2
Zhang et al., 2014 (28)	Europea, asiática y afroamericana	DMO-CL, DMO-CF, DMO-CT	27 061	SMOC1, CLDN14	2/15
Mosyger et al., 2014 (29)	Europea, asiática y norteamericana	AUBA, VS, DMO-T	59 242	TMEM135	1/7
Zheng et al., 2015 (30)	Europea	DMO-CL, DMO-CF, DMO-A, FO	561 489	EN1	1/36
Strykarsdottir et al., 2016 (31)	Europea y asiática	DMO-CL, DMO-C, FO	30 191	PTCH1	1/14
Nielson et al., 2016 (32)	Europea y norteamericana	DMO-CL, FVC, FVR	42 869	SLC1A3/RANBP3L	1/5
Mullin et al., 2017 (33)	Europea	AUBA, VS, FO	16 627	PPP1R3B, LOC387810, SEPT5/TBX1	3/8
Kemp et al., 2017 (34)	Europea	DMOe-T, FO	142 487	ARID1A, PKN2, TBX15, NGEF, SUSD5, ERC2, BMP2, PLXDC2, BMP5, MEOK2, CREB5, AQP1, CADM1, EMPT1, NFATC1, TMEIM92, GPC6, BMP4, SMAD3, BIMPR2, AXIN2	153/203
den Hollander et al., 2017 (35)	Europea y norteamericana	MBSM, OA	12 784	MGP, CCDC91	2/5
Medina-Gomez et al., 2018 (36)	Europea, afroamericana y australiana	DMO-CuT	66 628	SLC8A1, PLCL1, SMAD9, ADAMTS5, TOM1L2, TCF7L1, APC, DUSP5, CD44, CCND1, CYP19A1, MAFB, RUNX1, RAI1, ZSCAN25, GRB10, DRG2, ETS2, PSMD13, CSFI	36/80
Pei et al., 2018 (37)	Europea, asiática, afroamericana e hispana	DMO-CL, DMO-CF	40 449	MACROD2, OSBPL2	2/9
Alonso et al., 2018 (38)	Europea y australiana	FVC	10 683	2q13	1/1
S. K. Kim 2018 (39)	Europea	DMOe-T, FO	394 929	RP1L1, PRSS55, MAFK, GPATCH1, SMG6, WNT1, WNT5B	613/899
Trajanoska et al., 2018 (19)	Europea, norteamericana, asiática y australiana	FO	562 258	GRB10/COBL, ETS2, RSPO3	4/15

(Continúa en página siguiente)

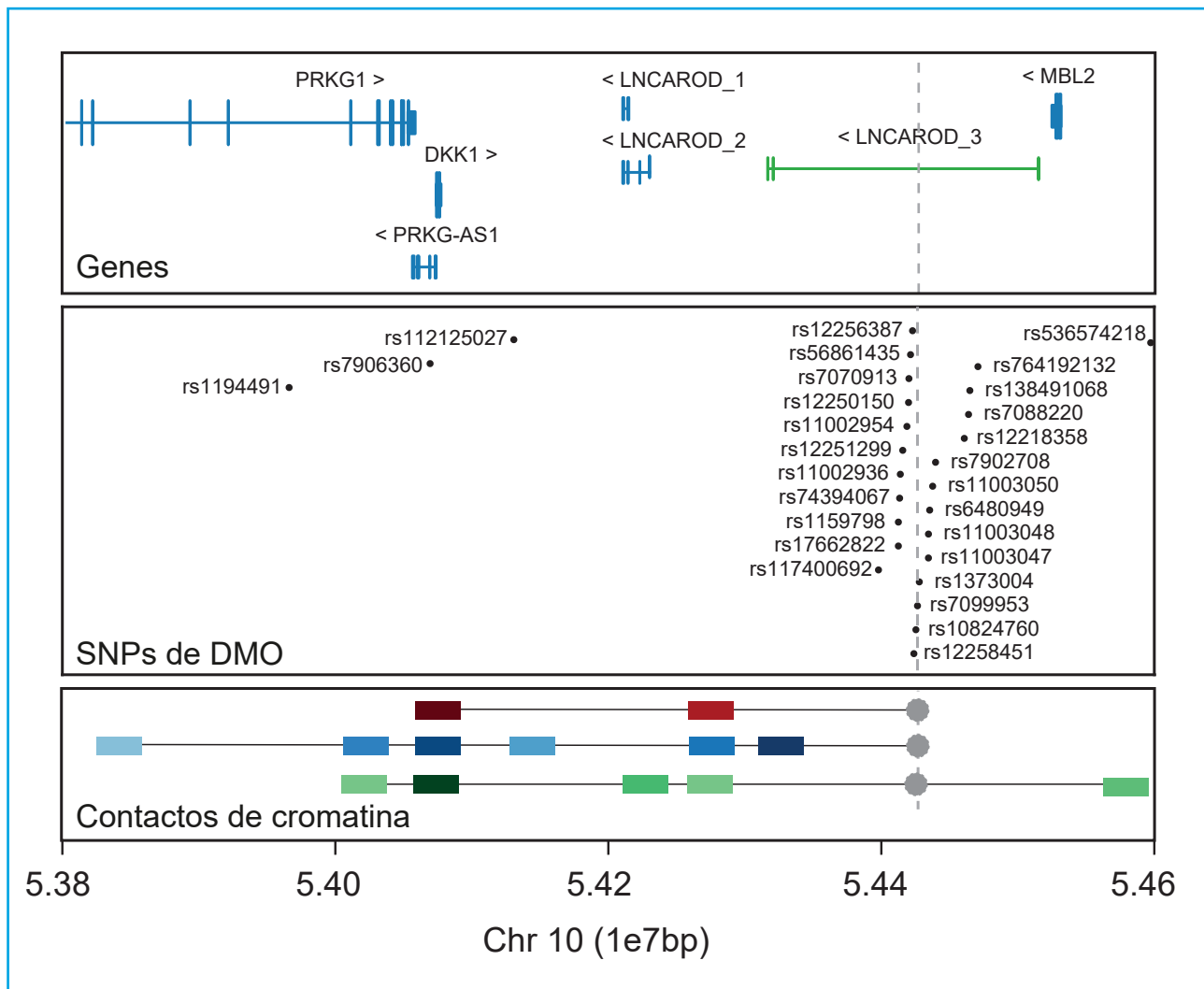
**Tabla 1 (Cont.). Estudios GWAS sobre hueso y genes encontrados con variantes asociadas a fenotipos óseos**

Estudio	Ancestría	Rasgo	Tamaño muestral	Locígenes más relevantes	Locí nuevos/ locí totales
Baird <i>et al.</i> , 2019 (40)	Europea, norteamericana y australiana	ARX-MC	15 934	ASTN2, PTHLH, NKX3-2, FGFR4, GSCD/CICER1, HHIP	6/8
Hsu <i>et al.</i> , 2019 (41)	Europea, norteamericana y asiática	LCF, AE, AEC, SMCf	18 719	IRX1/ADAMTS167	1/4
Morris <i>et al.</i> , 2019 (18)	Europea	DMOe-T, FO	426 824	DAAM2, WNT7B, WNT2B, COL11A1, SERPINC1, PRKCE, HDAC4, HOXD11, BCL11A, SOX5, TGFB3, MMP16, EPHA4, MSH6, SEPT11, LRRCL1, ADH1B, CTPS1, DNMT3A, MEIS1	301/518
Pei <i>et al.</i> , 2019 (42)	Europea, norteamericana y australiana	DMO-T, DMO-CuT	209 115	FBN2, DEF6, TNFRSF19, NFE2L1, SCMH1	18/56
Strykarsdottir <i>et al.</i> , 2019 (43)	Europea y asiática	DMO-C, DMO-CL-AH, FO	28 954	GDF5, ADAMTSL3, BCKDHB, CHRDL2, DYM, CTDSP2	6/13
Zheng <i>et al.</i> , 2019 (44)	Europea, norteamericana y australiana	DMO-CF, DMOe-UT	10 584	B4GLANT3, GALNT1	2/3
Feng <i>et al.</i> , 2020 (45)	Europea, norteamericana, afroamericana, asiática e hispana	DMO-C, MMT, DMOe-T	11 335	MC4R	1/2
Zhang <i>et al.</i> , 2020 (46)	Europea, norteamericana, afroamericana, asiática e hispana	DMO-CF, MMCBP	12 445	FTO, PPP1CB, TRMT61B, LSAMP, FAM189A2, LOC101928063	6/26
Surakka <i>et al.</i> , 2020 (47)	Europea	DMO-A	19 705		0/10
Greenbaum <i>et al.</i> , 2022 (48)	Europea, afroamericana, norteamericana y australiana	DMO-CF, DMO-CL	49 487	IGF2, ZNF423, SIPA1, PED4D, PIGN, TRAF3IP2, NFIB, LYSMD4, MAML2	9/30

*El estudio está representado por el primer autor y el año. Los genes son aquellos más relevantes en el estudio por su asociación con fenotipos óseos y por la novedad de su hallazgo. A: antebrazo. AE: ángulo del eje. AEC: ancho del estrecho del cuello. ARX-MC: absorciometría de rayos X-modos derivados de la forma de la cadera. AUBA: atenuación de ultrasonido de banda ancha. C: cadera. CF: cuello femoral. CL: columna lumbar. CL-AH: columna lumbar-área del hueso. CT: cadera total. DMO: densidad mineral ósea. DMOe: densidad mineral ósea estimada. FO: fractura osteoporótica. FVC: fractura vertebral clínica. FVR: fractura vertebral radiográfica. LCF: longitud de cuello femoral. MBSM: medida bilateral semicuantitativa de mano. MMCBP: masa magra corporal de brazos y piernas. MMT: masa magra del tronco. OA: osteoartritis. SMCf: sección modular del cuello femoral. T: talón. TO: tamaño óseo. UT: ultrasonido de talón. VS: velocidad de sonido.*



**Figura 1. SOST.** A. Panel superior: *Locus* que contiene *SOST* y sus genes vecinos (GRC37/hg19). En lila, la región reguladora ECR5. Panel central: SNP asociados con diferentes parámetros óseos en diferentes estudios GWAS, extraídos de *GWAS catalog* (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Panel inferior: Resultados principales del ensayo 4C de Martínez-Gil et al. 2021, donde se representan las principales interacciones entre el promotor de *SOST* (usado como anzuelo e indicado con un punto y una línea discontinua gris). Los cuadrados de colores representan las interacciones con la intensidad de color proporcional a la intensidad de la interacción. Los cuadrados rojos representan las interacciones en células madre mesenquimales, en azul las interacciones de las células hFOB y en verde las interacciones de las células Saos2. Las unidades de la escala genómica utilizada (1e7pb) corresponden a 10 Megabases ( $1 \times 10^7$  pares de bases). B. Representación esquemática de la proteína esclerostina señalando sus dominios funcionales y las variantes descritas causantes de enfermedades esqueléticas humanas. En lila las variantes asociadas a displasia craneodisfaria, en rojo asociadas a esclerosteosis y en azul la variante asociada al fenotipo de alta masa ósea. CTCK: C-terminal cysteine knot-like. C. Esquema de algunos de los reguladores positivos y negativos de la expresión de *SOST*.



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

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

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

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

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

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

## BIBLIOGRAFÍA

- Lichou F, Gosia T. Functional studies of GWAS variants are gaining momentum. *Nat Commun* 2020;11(1):6283. DOI: 10.1038/s41467-020-20188-y
- Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363(2):166-76. DOI: 10.1056/NEJMr0905980
- Cannon ME, Karen LM. Deciphering the emerging complexities of molecular mechanisms at GWAS loci. *Am J Hum Genet* 2018;103(5):637-53. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.10.001
- Vissecher PV, Wray N, Zhang Q, Sklar P, McCarthy M, Brown M, et al. 10 Years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet* 2017;101(1):5-22. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005
- Buniello A, MacArthur J, Cerezo M, Harris L, Hayhurst J, Malanogone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1005-12. DOI: 10.1093/nar/gky1120
- Medina-Gomez C, Kemp J, Estrada K, Eriksson J, Liu J, Reppe S, et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the *WNT16* locus. *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002718. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002718
- Loic Y, Sidorenko J, Kemper K, Zheng Z, Wood A, Weedon M, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet* 2018;27(20):3641-9. DOI: 10.1093/hmg/ddy271
- Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2019;20(8):467-84. DOI: 10.1038/s41576-019-0127-1
- Hirschhorn JN. Genomewide association studies — illuminating biologic pathways. *N Engl J Med* 2009;360(17):1699-701. DOI: 10.1056/NEJMp0808934
- Klein RJ, Xing X, Mukherjee S, Willis J, Hayes J. Successes of genome-wide association studies. *Cell* 2010;142(3):350-1.
- Schaid DJ, Chen W, Larson NB. From Genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat Rev Genet* 2018;19(8):491-504.
- Broekema RV, Bakker OB, Jonkers IH. A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era. *Open Biol* 2020;10(1):190221. DOI: 10.1098/rsob.190221
- Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Atalay N, Pineda-Moncusí M, García-Giralt N, Van Hul W, et al. Functional assessment of coding and regulatory variants from the *DKK1* locus. *JBM plus* 2020;4(12):e10423. DOI: 10.1002/jbm4.10423
- Schartl M. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Dis Model Mech* 2014;7(2):181-92. DOI: 10.1242/dmm.012245
- Rao S, Yao Y, Bauer DE. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation. *Genome Med* 2021;13(1):41. DOI: 10.1186/s13073-021-00857-3
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44(5):491-501. DOI: 10.1038/ng.2249
- Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone* 2019;126:2-10.
- Morris JA, Kemp JA, Youlten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet* 2019;51(2):258-66.
- Trajanoska K, Morris JA, Oei L, Zheng H-F, Evans DM, Kiel DP, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ* 2018;362:k3225. DOI: 10.1016/j.bone.2019.04.005
- García-Ibarbía C, Delgado-Calle J, Casafont I, Velasco J, Arozamena J, Pérez-Núñez M, et al. Contribution of genetic and epi-



- genetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene* 2013;532(2):165-72. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.080
21. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, et al. LRP4 third  $\beta$ -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1856-68. DOI: 10.1093/hmg/ddt578
  22. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41(1):15-7. DOI: 10.1038/ng.284
  23. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu Y-H, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2009;41(11):1199-206. DOI: 10.1038/ng.446
  24. Guo Y, Tan L-J, Lei S-F, Yang T-L, Chen X-D, Zhang F, et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet* 2010;6(1):e1000806. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000806
  25. Kung AW, Xiao SM, Cherny S, Li GH, Gao Y, Tso G, et al. Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *Am J Hum Genet* 2010;86(2):229-39. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.12.014
  26. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, et al. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet* 2010;6(6):e1000977. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000977
  27. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Aslaug J, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature* 2013;497(7450):517-20. DOI: 10.1038/nature12124
  28. Zhang L, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei Y-F, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1923-33. DOI: 10.1093/hmg/ddt575
  29. Moayyeri A, Hsu Y-H, Karasik D, Estrada K, Xiao S-M, Nielson C, et al. Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium. *Hum Mol Genet* 2014;23(11):3054-68. DOI: 10.1093/hmg/ddt675
  30. Zheng H-F, Forgetta V, Hsu Y-H, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature* 2015;526(7571):112-7. DOI: 10.1038/nature14878
  31. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Center JR, Hun Lee S, et al. Sequence variants in the PTCH1 gene associate with spine bone mineral density and osteoporotic fractures. *Nat Commun* 2016;7:10129. DOI: 10.1038/ncomms10129
  32. Nielson C, Liu C-T, Smith AV, Ackert-Bicknell C, Reppe S, Jakobsdottir J, et al. Novel genetic variants associated with increased vertebral volumetric BMD, reduced vertebral fracture risk, and increased expression of SLC1A3 and EPHB2. *J Bone Miner Res* 2016;31(12):2085-97. DOI: 10.1002/jbmr.2913
  33. Mullin BH, Zhao JH, Brown SJ, Perry J, Luan J, Zheng H-F, et al. Genome-wide association study meta-analysis for quantitative ultrasound parameters of bone identifies five novel loci for broadband ultrasound attenuation. *Hum Mol Genet* 2017;26(14):2791-802. DOI: 10.1093/hmg/ddx174
  34. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youlten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet* 2017;49(10):1468-75. DOI: 10.1038/ng.3949
  35. Hollander W, Boer CG, Hart DJ, Yau MS, Ramos Y, Metrustry S, et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for matrix Gla protein in osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis* 2017;76(12):2046-53. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-211214
  36. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesni A, Ahluwalia TS, et al. Life-course genome-wide association study meta-analysis of total body BMD and assessment of age-specific effects. *Am J Hum Genet* 2018;102(1):88-102. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.12.005
  37. Pei Y-F, Hu W-Z, Yan M-W, Li C-W, Liu L, Yang X-L, et al. Joint study of two genome-wide association meta-analyses identified 20p12.1 and 20q13.33 for bone mineral density. *Bone* 2018;110:378-85. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.027
  38. Alonso N, Estrada K, Albagha OME, Herrera L, Reppe S, Olstad OK, et al. Identification of a novel locus on chromosome 2q13, which predisposes to clinical vertebral fractures independently of bone density. *Ann Rheum Dis* 2018;77(3):378-85. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-212469
  39. Kim SK. Identification of 613 new loci associated with heel bone mineral density and a polygenic risk score for bone mineral density, osteoporosis and fracture. *PLoS One* 2018;13(7):e0200785. DOI: 10.1371/journal.pone.0200785
  40. Baird DA, Evans DS, Kamanu FK, Gregory JS, Saunders FR, Giuraniuc CV, et al. Identification of novel loci associated with hip shape: a meta-analysis of genome wide association studies. *J Bone Miner Res* 2019;34(2):241-51. DOI: 10.1002/jbmr.3605
  41. Hsu Y-H, Estrada K, Evangelou E, Ackert-Bicknell C, Akesson K, Beck T, et al. Meta-analysis of genomewide association studies reveals genetic variants for hip bone geometry. *J Bone Miner Res* 2019;34(7):1284-96. DOI: 10.1002/jbmr.3698
  42. Pei YF, Liu L, Liu TL, Yang XL, Zhang H, Wei XT, et al. Joint association analysis identified 18 new loci for bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2019;34(6):1086-94. DOI: 10.1002/jbmr.3681
  43. Styrkarsdottir U, Stefansson OA, Gunnarsdottir K, Thorleifsson G, Lund SH, Stefansson L, et al. GWAS of bone size yields twelve loci that also affect height, BMD, osteoarthritis or fractures. *Nat Commun* 2019;10(1):2054.
  44. Zheng J, Maerz W, Gergei I, Kleber M, Drechsler C, Wanner C, et al. Mendelian randomization analysis reveals a causal influence of circulating sclerostin levels on bone mineral density and fractures. *J Bone Miner Res* 2019;34(10):1824-36. DOI: 10.1038/s41467-019-09860-0
  45. Feng GJ, Wei XT, Zhang H, Yang XL, Shen H, Tian Q, et al. Identification of pleiotropic loci underlying hip bone mineral density and trunk lean mass. *J Hum Genet* 2020;66(3):251-60. DOI: 10.1038/s10038-020-00835-4
  46. Zhang YX, Zhang SS, Ran S, Liu Y, Zhang H, Yang XL, et al. Three pleiotropic loci associated with bone mineral density and lean body mass. *Mol Genet Genomics* 2020;296(1):55-65. DOI: 10.1007/s00438-020-01724-3

47. Surakka I, Fritsche LG, Zhou W, Backman J, Kosmicki JA, Lu H, et al. MEPE loss-of-function variant associates with decreased bone mineral density and increased fracture risk. *Nat Commun* 2020;11(1):4093. DOI: 10.1038/s41467-020-17315-0
48. Greenbaum J, Su KJ, Zhang X, Liu Y, Liu A, Zhao LJ, et al. A multiethnic whole genome sequencing study to identify novel loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet* 2022;31(7):1067-81. DOI: 10.1093/hmg/ddab305
49. Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, et al. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem* 2011;286(22):19489-500. DOI: 10.1074/jbc.M110.190330
50. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One* 2009;4(11):e7930. DOI: 10.1371/journal.pone.0007930
51. Chang M-K, Kramer I, Huber T, Kinzel B, Guth-Gundel S, Leupin O, et al. Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(48):E5187-195. DOI: 10.1073/pnas.1413828111
52. Wang R, Zhao P, Kong N, Lu R, Pei Y, Huang C, et al. Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes* 2018;22;9(1):54. DOI: 10.3390/genes9010054
53. Velázquez-Cruz R, Jiménez-Ortega RF, Parra-Torres AY, Castillejos-López M, Patiño N, Quiterio M, et al. Analysis of association of MEF2C, SOST and JAG1 genes with bone mineral density in Mexican-Mestizo postmenopausal women. *BMC Musculoskelet Disord* 2014;15:400. DOI: 10.1186/1471-2474-15-400
54. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2016;375(16):1532-43. DOI: 10.1056/NEJMoa1607948
55. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014;370(5):412-20. DOI: 10.1056/NEJMoa1305224
56. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, et al. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosuzumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2015;30(2):216-24. DOI: 10.1002/jbmr.2351
57. Langdahl BL, Libanati C, Crittenden DB, Bolognese MA, Brown JP, et al. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) versus teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis transitioning from oral bisphosphonate therapy: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390(10102):1585-94. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31613-6
58. Glorieux FH, Devogelaer JP, Durigova M, Goemaere S, Hemsley S, Jakob F, et al. BPS804 anti-sclerostin antibody in adults with moderate osteogenesis imperfecta: results of a randomized phase 2a trial. *J Bone Miner Res* 2017;32(7):1496-504. DOI: 10.1002/jbmr.3143
59. Lewiecki M, Blicharski T, Goemaere S, Lippuner K, Meisner PD, Miller PD, et al. A phase III randomized placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety of romosozumab in men with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103(9):3183-93. DOI: 10.1210/jc.2017-02163
60. Martínez-Gil N, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. Wnt pathway extracellular components and their essential roles in bone homeostasis. *Genes (Basel)* 2022;13(1):138. DOI: 10.3390/genes13010138
61. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Laczka C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 2002;39(2):91-7. DOI: 10.1136/jmg.39.2.91
62. Sebastian A, Loots GG. Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models. *Metabolism* 2018;80:38-47. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.10.005
63. Collette NM, Genetos DC, Economides AN, Xie L, Shahnazari M, Yao W, et al. Targeted deletion of Sost distal enhancer increases bone formation and bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(35):14092-7. DOI: 10.1073/pnas.1207188109
64. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Cozar M, Garcia-Giralt N, Ovejero D, Nogués X, et al. Genetics and genomics of SOST: functional analysis of variants and genomic regulation in osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2021;22(2):489. DOI: 10.3390/ijms22020489
65. Loots G, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 2005;15(7):928-35. DOI: 10.1101/gr.3437105
66. Kramer I, Baertschi S, Halleux C, Keller H, Kneissel M. Mef2c deletion in osteocytes results in increased bone mass. *J Bone Miner Res* 2012;27(2):360-73. DOI: 10.1002/jbmr.1492
67. Duncan E, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 2011;7(4):e1001372. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk
68. Pei YF, Hu WZ, Hai R, Wang XY, Ran S, Lin Y, et al. Genome-wide association meta-analysis identified 1q43 and 2q32.2 for hip Ward's triangle areal bone mineral density. *Bone* 2016;91:1-10. DOI: 10.1016/j.bone.2016.07.004
69. Zheng HF, Duncan EL, Yerges-Armstrong LM, Eriksson J, Bergström U, Leo PJ, et al. Meta-analysis of genome-wide studies identifies MEF2C SNPs associated with bone mineral density at forearm. *J Med Genet* 2013;50(7):473-8. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101287
70. Gregson CL, Newell F, Leo PJ, Clark GR, Paternoster L, Marshall M, et al. Genome-wide association study of extreme high bone mass: contribution of common genetic variation to extreme BMD phenotypes and potential novel BMD-associated genes. *Bone* 2018;114:62-71. DOI: 10.1016/j.bone.2018.06.001
71. Baertschi S, Baur N, Lueders-Lefevre V, Voshol J, Keller H. Class I and IIa histone deacetylases have opposite effects on sclerostin gene regulation. *J Biol Chem* 2014;289(36):24995-5009. DOI: 10.1074/jbc.M114.564997
72. Kobayashi Y, Uehara S, Koide M. Regulations of osteoclast formation and function by Wnt signals. *Clin Calcium* 2019;29(3):309-15. DOI: 10.20837/4201903309
73. Wein M, Fretwurst T, Nahles S, Duttonhoefer F, Tomakidi P, Steinberg T, et al. Pilot investigation of the molecular discrimination of human osteoblasts from different bone entities. *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43(8):1487-93. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.07.030
74. Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, Gazal S, Burch K, Freund MK, et al. Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am J Hum Genet* 2019;104(1):65-75.

75. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116(13):2627-34. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.07.030
76. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391(6665):357-62. DOI: 10.1038/34848
77. Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK, Osteoporosis-Pseudoglioma Collaborative Group. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;77(5):741-53. DOI: 10.1086/497706
78. Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Piters E, Caussin E, Van Hul W. Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res* 2007;22(5):708-16. DOI: 10.1359/jbmr.070211
79. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giralt N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep* 2018;8(1):10951. DOI: 10.1038/s41598-018-29242-8
80. Korvala J, Löjja M, Mäkitie O, Sochett E, Jüppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet* 2012;55(10):515-9. DOI: 10.1016/j.ejmg.2012.06.011
81. van de Putte R, Wijgers CH, de Blaauw I, Feitz WF, Marcelis CL, Hakobjan M, et al. Sequencing of the DKK1 gene in patients with anorectal malformations and hypospadias. *Eur J Pediatr* 2015;174(5):583-7. DOI: 10.1007/s00431-014-2436-x
82. Ntini E, Louloui A, Liz J, Muino JM, Marsico A, Vang-Ørom UA. Long ncRNA A-ROD activates its target gene DKK1 at its release from chromatin. *Nat Commun* 2018;9(1):1636. DOI: 10.1038/s41467-018-04100-3
83. Zheng H-F, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Pateroster L, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002745. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002745
84. Movérare-Skrtic S, Henning P, Liu X, Nagano K, Saito H, Börjesson AE, et al. Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nat Med* 2014;20(11):1279-88. DOI: 10.1038/nm.3654
85. Nabbi A, Almami A, Thakur S, Suzuki K, Boland D, Bismar TA, et al. ING3 protein expression profiling in normal human tissues suggest its role in cellular growth and self-renewal. *Eur J Cell Biol* 2015;94(5):214-22. DOI: 10.1016/j.ejcb.2015.03.002
86. Chesi A, Wagley Y, Johnson ME, Manduchi E, Su Ch, Lu S, et al. Genome-scale capture C promoter interactions implicate effector genes at GWAS loci for bone mineral density. *Nat Commun* 2019;10(1):1260. DOI: 10.1038/s41467-019-09302-x
87. Maynard RD, Godfrey DA, Medina-Gomez C, Ackert-Bicknell CL. Characterization of expression and alternative splicing of the gene cadherin-like and PC esterase domain containing 1 (Cped1). *Gene* 2018;674:127-33. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.060
88. Määttä JA, Bendre A, Laanti M, Büki KG, Rantakari P, Tervola P, et al. Fam3c modulates osteogenic cell differentiation and affects bone volume and cortical bone mineral density. *Bonekey Rep* 2016;5:787. DOI: 10.1038/bonekey.2016.14
89. Bendre A, Büki KG, Määttä JA. Fam3c modulates osteogenic differentiation by down-regulating Runx2. *Differentiation* 2017;93:50-7. DOI: 10.1016/j.diff.2016.11.005
90. Martínez-Gil N, Patiño J, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. WNT16 rs2908004 missense variant acts as eQTL of FAM3C in human primary osteoblasts. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2021;13(4):117-21.
91. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Herrera C, Gritti N, Ugartondo N, Garcia-Giralt N, et al. Functional evidence of bone regulation of WNT16 through upstream enhancers within CPED1. *J Bone Miner Res* 2020;35S1:179.