

Roca-Ayats N¹, Falcó-Mascaró M¹, García-Giralt N², Cozar M¹, Abril JF³, Quesada-Gómez JM⁴, Prieto-Alhambra D^{5,6}, Nogués X², Mellibovsky L², Díez-Pérez A², Grinberg D¹, Balcells S¹

1 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) - Instituto de Investigación Sant Joan de Déu (IRSJD) - Barcelona (España)

2 Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular (URFOA); Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Parque de Salud Mar - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES); Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Barcelona (España)

3 Departamento de Genética, Microbiología y Estadística; Facultad de Biología; Universidad de Barcelona - Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) - Barcelona (España)

4 Unidad de Metabolismo Mineral; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC); Hospital Universitario Reina Sofía - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES); Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Córdoba (España)

5 Grupo de Investigación en Enfermedades Prevalentes del Aparato Locomotor (GREMPAL) - Instituto de Investigación en Atención Primaria (DIAP) Jordi Gol - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) - Barcelona (España)

6 Instituto Nacional para la Investigación de la Salud (NIHR); Unidad de Investigación Biomédica (BRU) Musculoesquelética y Centro de Investigación Botnar; Departamento de Ortopedia, Reumatología y Ciencias Musculoesqueléticas Nuffield - Universidad de Oxford - Oxford (Reino Unido)

Estudio genético de la fractura femoral atípica mediante la secuenciación del exoma en tres hermanas afectas y tres pacientes no relacionadas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400002>

Correspondencia: Neus Roca-Ayats - Departamento de Genética, Microbiología y Estadística - Facultad de Biología - Universidad de Barcelona - Avda. Diagonal, 643 - 08028 Barcelona (España)
Correo electrónico: neus.roca@ub.edu

Fecha de recepción: 12/06/2018

Fecha de aceptación: 24/09/2018

Trabajo becado asistir al 39º Congreso de la ASBMR (Denver, 2017).

Resumen

Objetivos: Las fracturas atípicas de fémur (FAF) son un tipo de fracturas poco frecuentes, a menudo relacionadas con un tratamiento prolongado con bisfosfonatos (BPs). Actualmente no se conocen con exactitud sus mecanismos patogénicos y no hay pruebas para identificar aquellos pacientes con un alto riesgo de sufrir una FAF. El objetivo de este trabajo es investigar las bases genéticas de las FAFs.

Material y métodos: Se secuenció el exoma completo de 3 hermanas y de 3 pacientes adicionales no relacionadas, todas tratadas con BPs durante más de 5 años. Se seleccionaron variantes compartidas por las hermanas, de baja frecuencia y potencialmente patogénicas, y se construyó una red de interacciones de genes y proteínas con los datos hallados.

Resultados: Identificamos 37 variantes raras (en 34 genes) compartidas por las 3 hermanas, algunas de ellas no descritas anteriormente. La variante más llamativa fue la mutación p.Asp188Tyr en el enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (codificada por el gen *GGPS1*), de la vía del mevalonato y esencial para la función del osteoclasto. Otro hallazgo interesante fueron dos mutaciones (una en las 3 hermanas y una en una paciente no relacionada) en el gen *CYP11A1*, implicado en el metabolismo de los esteroides. Identificamos otras variantes que también podrían estar involucradas en la susceptibilidad a las FAFs o en el fenotipo osteoporótico subyacente, tales como las presentes en los genes *SYDE2*, *NGEF*, *COG4* y la *FN1*.

Conclusiones: Nuestros datos son compatibles con un modelo donde la acumulación de variantes de susceptibilidad podría participar en la base genética de las FAFs.

Palabras clave: *fractura atípica de fémur, bisfosfonatos, GGPS1, CYP11A1, secuenciación completa del exoma.*

Genetic study of atypical femoral fractures using exome sequencing in three affected sisters and three unrelated patients

Summary

Objectives: Atypical femoral fractures (AFF) are rare, often related to long-term bisphosphonate (BPs) treatment. Their pathogenic mechanisms are not precisely known and there is no evidence to identify patients with a high risk of AFF. The aim of this work is to study the genetic bases of AFFs.

Material and methods: Whole-exome sequencing was carried out on 3 sisters and 3 unrelated additional patients, all treated with BPs for more than 5 years. Low frequency, potentially pathogenic variants shared by the 3 sisters, were selected, and a network of gene and protein interactions was constructed with the data found.

Results: We identified 37 rare variants (in 34 genes) shared by the 3 sisters, some not previously described. The most striking variant was the p.Asp188Tyr mutation in the enzyme geranylgeranyl pyrophosphate synthase (encoded by the *GGPS1* gene), from the mevalonate pathway and essential for osteoclast function. Another noteworthy finding was two mutations (one in the 3 sisters and one in an unrelated patient) in the *CYP11A1* gene, involved in the metabolism of steroids. We identified other variants that could also be involved in the susceptibility to AFFs or in the underlying osteoporotic phenotype, such as those present in the *SYDE2*, *NGEF*, *COG4* and *FN1* genes.

Conclusions: Our data are compatible with a model where the accumulation of susceptibility variants could participate in the genetic basis of AFFs.

Key words: atypical femoral fractures, bisphosphonates, *GGPS1*, *CYP11A1*, whole-exome sequencing.

Introducción

La osteoporosis y sus fracturas asociadas son el problema óseo postmenopáusico más común, y afecta a mujeres y hombres de todas las etnias. Los bisfosfonatos nitrogenados (N-BPs), incluyendo alendronato, risendronato, ibandronato y zolendronato, son el tratamiento más utilizado para la osteoporosis en millones de pacientes en todo el mundo. A pesar de la importante eficacia anti-fractura de los BPs, ampliamente demostrada en varios ensayos clínicos¹ y revisiones sistemáticas², se han descrito algunos efectos adversos poco frecuentes potencialmente asociados a su uso prolongado, entre ellos las fracturas atípicas de fémur (FAFs)³. Estas fracturas son no-traumáticas y están caracterizadas por su localización subtrocanterica o en la diáfisis del fémur, y frecuentemente son bilaterales⁴.

Los mecanismos patogénicos de las FAFs no son del todo conocidos, y se ha especulado mucho sobre sus causas. Se ha propuesto que una supresión excesiva de la resorción ósea por parte de los N-BPs podría contribuir a desencadenar una FAF pero su fisiopatología es compleja y se cree que hay otros factores importantes involucrados. Algunos factores de riesgo propuestos son el grosor cortical y la geometría pélvica⁵. Además, se han descrito casos de FAF en pacientes afectados por otras enfermedades óseas monogénicas, como la hipofosfatasa⁶, la osteogenesis imperfecta⁷ o el síndrome de osteoporosis pseudoglioma⁸.

Dada la baja incidencia de las FAFs en la población general (5,9 casos por 100.000 personas/año), podemos hipotetizar que hay unas causas genéticas raras subyacentes que pueden incrementar la susceptibilidad a las FAFs, y que pueden ocurrir espontáneamente o desencadenarse después de la interacción con los BPs. Actualmente

no hay pruebas genéticas o bioquímicas que puedan ayudar a identificar los pacientes con un elevado riesgo a sufrir una FAF. La identificación de los determinantes genéticos de las FAFs ayudaría a esclarecer los mecanismos etiológicos, al desarrollo de herramientas de diagnóstico y de evaluación del riesgo de sufrir una FAF, y a posibles estrategias terapéuticas.

Anteriormente, identificamos 3 hermanas diagnosticadas con FAF que fueron tratadas con BPs durante más de 5 años⁹. Esta observación nos sugirió que podría haber un trasfondo genético que predispusiera a las FAFs relacionadas al uso prolongado de BPs. En consecuencia, llevamos a cabo la secuenciación del exoma completo de las 3 hermanas y de otras 3 pacientes no relacionadas para identificar mutaciones potencialmente relacionadas con las FAFs en estas pacientes. Identificamos 37 variantes raras compartidas por las 3 hermanas, una de las cuales se estudió en detalle⁹. En el presente trabajo describimos el conjunto de variantes encontradas y su posible interacción.

Material y métodos

Pacientes

Se estudiaron seis pacientes con FAFs y que habían sido tratadas durante más de 5 años con BPs: 3 hermanas visitadas en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) y 3 pacientes no relacionadas visitadas en el Hospital del Mar (Barcelona, España). Como controles, se estudiaron 3 pacientes tratadas con BPs por más de 6 años pero sin FAFs. Las características de pacientes y controles están descritas en la tabla 1. Las 3 hermanas afectas fueron tratadas con estatinas y recibían regularmente PPIs pero no habían sido tratadas con glucocorticoides ni ningún otro compuesto que afecte al

hueso, aparte de los BPs. En el caso de las fracturas unilaterales, se realizaron pruebas radiológicas y RMN que descartaban la fractura contralateral. Se obtuvo consentimiento informado escrito de todas las pacientes, de acuerdo con la regulación del Comité Ético de Investigación Clínica del Parque de Salud Mar, que aprobó el estudio.

Secuenciación del exoma completo

Se extrajo ADN de sangre periférica de las pacientes con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) y se utilizó para secuenciar el exoma completo en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) (Barcelona). Las librerías se generaron con el kit de captura de exones SureSelect XT Human All Exon; cat:5190-6208 (Agilent Technologies), después de haber fragmentado el ADN y ligado los adaptadores específicos de Agilent. La secuenciación *paired-end* (2x76 pb) se realizó en la plataforma Illumina HiSeq2000. Las imágenes del instrumento se procesaron utilizando el programa del fabricante para generar archivos de secuencia FASTQ.

El análisis bioinformático se llevó a cabo en la plataforma de Bioinformática para Enfermedades Raras (Bier) del CIBERER, en Valencia. Los archivos FASTQ se alinearon con el programa libre Burrows-Wheeler Aligner¹⁰ (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) utilizando el ensamblado del genoma humano de referencia GRCh37 (hg19)¹¹. Las variantes de un solo nucleótido y los indels se identificaron utilizando el programa GATK¹². Finalmente, para añadir a las variantes información sobre la frecuencia del alelo minoritario (*minor allele frequency*; MAF) proveniente de dbSNP y del proyecto 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org>)¹³, se utilizó la herramienta de anotación VARIANT¹⁴. Los datos se convirtieron al formato BAM (*binary equivalent SAM*) y se visualizaron mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) (<http://www.broadinstitute.org/igv>).

Las variantes genéticas se filtraron según las siguientes premisas: a) variante no-sinónima, b) no descrita previamente o con una MAF <0,005 en dbSNP y en el proyecto 1000 Genomas, c) no presente en NHLBI Go Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), y d) no presente en 8 exomas de individuos de la población general, obtenidos en nuestro laboratorio.

Inicialmente sólo se tuvieron en cuenta las mutaciones compartidas por las tres hermanas, tanto en un modelo de herencia dominante como recesivo. Después se priorizaron mutaciones en genes candidatos en las otras tres pacientes. Las puntuaciones de SIFT¹⁵, PolyPhen¹⁶ y de conservación evolutiva obtenidas de PhastCons¹⁷ se utilizaron para priorizar las variantes.

Validación de las variantes genéticas

Las mutaciones encontradas se validaron mediante PCR y secuenciación Sanger, que fue llevada a cabo bidireccionalmente utilizando el kit BigDyeTM v3.1 Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados para la validación se diseñaron utilizando el programa OligoEvaluator (Sigma-Aldrich). Finalmente, las mutaciones validadas se buscaron en el Exome Aggregation Consortium (ExAC) para obtener sus frecuencias poblacionales, y se analizaron mediante secuenciación Sanger en las 3 mujeres controles.

Tabla 1. Características de pacientes y controles

Paciente	Fractura atípica	Edad ^a (años)	Peso (Kg)	T-score columna vertebral	T-score cadera	Tiempo de tratamiento con BPs (años)	Fracturas osteoporóticas previas
AFS1	Unilateral; medio-diafisaria ^b	64	77	-1,1	-0,2	6	Colles
AFS2	Unilateral; medio-diafisaria ^b	73	75	-2,5	-1,4	6	Colles
AFS3	Bilateral; medio-diafisaria ^b	60/61	100	-0,3	Rbpc ^c	6	Ninguna
AFU1	Bilateral; medio-diafisaria	73/75	50,8	-1,9	-0,5	6	Ninguna
AFU2	Unilateral; medio-diafisaria	72	90	-2,0	-0,6	7	Ninguna
AFU3	Unilateral; subtrocantérica	87	59,8	N/A	N/A	10	Ninguna
Control 1		78	66,5	-2,5	-1,9	7	Ninguna
Control 2		70	57,5	-1,2	-2,4	6	Ninguna
Control 3		74	77,1	-1,5	-0,9	8	Ninguna

AFS: hermanas con FAF; AFU: pacientes con FAF no relacionadas, (^a): edad al momento de la fractura atípica; (^b): fracturas localizadas aproximadamente en el mismo sitio; (^c): reemplazo bilateral de prótesis cadera.

Análisis *in silico*

Las mutaciones se localizaron en su contexto genético utilizando el UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) y el Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>) y se extrajo información de los genes de GeneCards (<http://www.genecards.org/>) y BioGPS (<http://biogps.org/>). Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando la herramienta bioinformática DAVID¹⁸ (<https://david.ncifcrf.gov/>).

El estudio funcional *in silico* de las proteínas mutadas se realizó utilizando Uniprot (<http://uniprot.org/>), RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) y Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Los alineamientos de proteínas se realizaron utilizando el UCSC Genome Browser y los programas Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) y ESPript (<http://esript.ibcp.fr/>).

Construcción de la red

La red de interacción de los genes FAF (AFFGeNet) se construyó según Boloc *et al.*¹⁹ para identificar genes o proteínas que interactúan con los 37 genes FAF, considerados como genes *driver* (Tablas 2a y 2b), teniendo en cuenta las interacciones binarias y direccionales. Los datos de interacción *high-throughput* se obtuvieron de BioGRID (versión 3.4.133)²⁰ y STRING [Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins] versión 10²¹ y la red se enriqueció con información adicional de GeneOntology (<http://geneontology.org/>), GeneCards, OMIM, UniProt, RefSeq, y UCSC.

Se implementó un *script* de Perl para capturar la sub-red de interacción utilizando los genes FAF para encontrar todos los caminos más cortos entre dos genes aplicando el algoritmo Dijkstra. La conectividad por parejas se analizó utilizando Circos²². El *script* produjo un gráfico esqueleto en formato JSON para poder visualizar los datos en la interficie web AFFGeNet (<https://compngen.bio.ub.edu/AFFgenes>, disponible bajo demanda). El formulario web contiene una entrada que se centra en los genes seleccionados, y la visualización de la red permite añadir o quitar nodos y mostrar información de los genes FAF. El color del borde identifica los nodos como *drivers* (lila), parejas *upstream* (verde) o *downstream* (azul) de los *drivers* seleccionados, y otros (gris). El color del interior de los nodos representa la expresión génica específica del hueso, que se obtuvo del Gene Expression Omnibus (GEO)²³, concretamente de un estudio sobre células precursoras de osteoclastos tratadas o no tratadas con BPs (alendronato o risendronato) durante su diferenciación a osteoclasto maduro²⁴ (GSE63009). La escala de colores va de amarillo intenso (subexpresado) a azul oscuro (sobrexpresado), siendo el blanco indicativo de ningún cambio de expresión.

Resultados

Variantes detectadas en la secuenciación del exoma completo en las 3 hermanas

Las tres hermanas (AFS1, AFS2, AFS3) y las 3 pacientes no relacionadas (AFU1, AFU2, AFU3) se analizaron separadamente.

Los exomas de las 3 hermanas se interseccionaron y no se identificó ninguna variante en homocigosis en común. Por el contrario, se identificaron 74 variantes en heterocigosis compartidas (coherentes con un modelo de herencia dominante), 37 de las cuales se validaron por secuenciación Sanger. En 3 de los genes (*FNI*, *BRAT1* y *XAB2*), se encontraron 2 mutaciones diferentes. En los tres casos se pudo determinar que las variantes se encontraban en fase, siendo alelos doble-mutantes y no heterocigotos compuestos, mediante la visualización de los *reads* con el programa IGV y el análisis de polimorfismos intragénicos. Las 37 variantes compartidas por las 3 hermanas, todas ellas codificantes, se muestran en la tabla 2a, ordenadas según su puntuación de conservación. Se trata de variantes de cambio de sentido (n=35), una variante truncante y una delección en fase. La primera variante de la lista, con la mejor puntuación de conservación y predicha como deletérea, se encuentra en el gen *GGPS1*, tal y como describimos anteriormente⁹.

Análisis de los genes mutados en las 3 pacientes no relacionadas

Los genes con variantes compartidas por las 3 hermanas (Tabla 2a) se analizaron en los exomas de las pacientes no relacionadas utilizando el programa IGV. Ninguna de las variantes de la Tabla 2a se encontró en las pacientes no relacionadas. No obstante, se encontraron otras dos variantes en los genes *BRAT1* y *CYP11A1*, en las pacientes AFU3 y AFU1, respectivamente (Tabla 2b).

La variante de *CYP11A1* presente en la paciente AFU1 (p.Ser216Cys) supone el cambio de una serina a una cisteína, en una posición cercana al sitio de unión al sustrato. Los predictores de patogenicidad sugirieron que este cambio es muy deletéreo para la función de la proteína. Igualmente, la variante de *CYP11A1* presente en las tres hermanas (p.Arg98Trp) supone el cambio de un aminoácido básico (arginina) a un aminoácido aromático hidrofóbico (triptófano), en un giro de la proteína con puentes de hidrógeno. Por el contrario, las tres variantes encontradas en el gen *BRAT1* (dos en las tres hermanas, en un alelo doble mutante, y una en la paciente AFU3) no afectan a la función de la proteína, según los predictores.

Análisis de genes candidatos en 3 pacientes no relacionadas

A continuación, se utilizó el programa IGV para analizar, en los exomas de las tres pacientes no relacionadas, distintos genes involucrados en el metabolismo óseo, la función osteoclastica y la vía del mevalonato. Se encontraron variantes en los genes *MMP9* (AFU3), *MVD* (AFU2) y *RUNX2* (AFU3), que se validaron por secuenciación Sanger (Tabla 2b). La mutación en el gen *MMP9*, que codifica la colagenasa de tipo IV, implica el cambio de una metionina (un aminoácido hidrofóbico con un grupo que contiene azufre) a una treonina (aminoácido hidrofílico) en la posición 419, dentro del dominio catalítico. Esta variante aparece en la base de datos ExAC,

con una frecuencia alélica muy baja (8,2e-06), y SIFT y PolyPhen predijeron que probablemente perjudica su función. El gen *MVD* codifica la enzima mevalonato 5-difosfato decarboxilasa, de la vía del mevalonato. La variante encontrada (p.Arg97Gln; rs376949804) supone el cambio de un aminoácido básico a un aminoácido neutro y está presente en la base de datos ExAC, también con una frecuencia alélica muy baja (3,4e-05). Se trata de un cambio no

perjudicial para la función de la proteína, según SIFT y PolyPhen. La mutación en *RUNX2* es una substitución de una prolina, un aminoácido cíclico, por una leucina, un aminoácido alifático hidrofóbico, en la posición 296, dentro de una región rica en prolinas, serinas y treoninas. Este cambio, descrito en dbSNP (rs20184115), tiene una MAF=0,0004 y probablemente afecta la función de la proteína, según los predictores.

Tabla 2a. Variantes compartidas por las 3 hermanas, encontradas en la secuenciación del exoma

Gen	Proteína	Variante ^a	Efecto en la proteína	dbSNP ^b	ExAC ^c	Conservación ^d	SIFT ^e	PolyPhen ^f
<i>GGPS1</i>	Geranilgeranil difosfato sintasa	chr1:g.235505746G>T	p.D188Y			700	0,000	1,000
<i>LRRC1</i>	Proteína con repeticiones ricas en leucinas 1	chr6:g.53707020G>A	p.R91Q		4,946e-05	685	0,050	0,746
<i>TUSC2</i>	Candidato supresor de tumores 2	chr3:g.50363807T>C	p.H83R		8,244e-06	674	0,338	0,000
<i>SYDE2</i>	Proteína activadora de GTPasa Rho	chr1:g.85634903G>T	p.L893I		8,339e-06	639	0,018	0,997
<i>COG4</i>	Subunidad 4 del complejo oligomérico conservado del Golgi	chr16:g.70553552C>T	p.G85D			627	0,150	0,735
<i>EML1</i>	Proteína asociada a microtúbulos	chr14:g.100360993G>A	p.R211H		6,611e-05	588	0,030	0,963
<i>KDM4C</i>	Demetilasa específica de lisinas(K) 4C	chr9:g.6849579A>G	p.I170V	rs192832191 MAF=0,0004	2,471e-05	584	0,000	0,509
<i>ERCC6L2</i>	Proteína de reparación por escisión del DNA	chr9:g.98718284A>T	p.I657L		8,278e-06	573	0,630	0,007
<i>PGRMC1</i>	Componente de membrana 1 del receptor de progesterona	chrX:g.118377159C>A	p.P177H			573	0,130	0,742
<i>FN1</i> *	Fibronectina	chr2:g.216235149C>T	p.V2241I		8,245e-06	551	0,009	0,045
<i>CYP1A1</i>	Citocromo P450 1A1	chr15:g.75015147G>A	p.R98W		0,000108	540	0,000	0,998
<i>XAB2</i> *	Proteína de unión a XPA 2	chr19:g.7688142C>G	p.V385L		1,651e-05	535	0,007	0,600
<i>GPR20</i>	Receptor acoplado a proteína G 20	chr8:g.142367729C>T	p.D99N	rs200892677 MAF=0,0004	3,324e-05	515	0,000	0,998
<i>TMEM25</i>	Proteína transmembrana 25	chr11:g.118404174_118404176del	p.V239del			510	N/A	N/A
<i>NGEF</i>	Factor intercanviador de nucleótidos de guanina	chr2:g.233748153G>A	p.S542L		1,279e-05	500	0,350	0,910
<i>NKAP</i>	Proteína activadora de NFκB	chrX:g.119066123C>T	p.S265N	rs182030723 MAF=0,0006	6,847e-05	497	0,120	0,184
<i>NVL</i>	Proteína nuclear que contiene valosina	chr1:g.224491450G>A	p.T312I		8,268e-06	474	0,000	0,995
<i>FN1</i> *	Fibronectina	chr2:g.216251538G>A	p.R1496W	rs139078629 MAF=0,003	0,004904	466	0,005	0,998
<i>ATP6AP1</i>	Subunidad S1 de ATPasa de protones vacuolar	chrX:g.153664043G>A	p.V407I		4,561e-05	464	0,260	0,990
<i>LURAP1L</i>	Proteína adaptadora rica en leucinas 1	chr9:g.12821722G>A	p.R217H		4,948e-05	452	0,270	0,371
<i>HEPH1L1</i>	Proteína similar a la hefestina	chr11:g.93839224G>A	p.W991*			451	0,000	N/A

Tabla 2a. (cont.)

Gen	Proteína	Variante ^a	Efecto en la proteína	dbSNP ^b	ExAC ^c	Conservación ^d	SIFT ^e	PolyPhen ^f	
<i>NTPCR</i>	Trifosfatasa de nucleósidos relacionada con cáncer	chr1:g.233091444G>A	p.R59Q		5,779e-05	439	0,034	0,502	
<i>XAB2</i> *	Proteína de unión a XPA 2	chr19:g.7688159G>C	p.T379R		1,652e-05	420	0,059	0,200	
<i>CHERP</i>	Proteína del retículo endoplasmático de homeostasis del calcio	chr19:g.16631044C>T	p.R793H	rs202164310 MAF=0,0000	0,0001009	366	0,120	0,716	
<i>MEX3D</i>	Proteína de unión a RNA MEX3D	chr19:g.1555839G>C	p.T560R	rs538022731 MAF=0,0002		366	0,030	N/A	
<i>BRAT1</i> *	Activador de ATM asociado a BRACA1	chr7:g.2594007C>T	p.R20K	rs143390199 MAF=2e-05	1,651e-05	333	0,192	0,010	
<i>BRAT1</i> *	Activador de ATM asociado a BRACA1	chr7:g.2580668G>A	p.T447M	rs368808380 MAF=0,0002	5,845e-05	333	0,110	0,275	
<i>CUL9</i>	Culina 9	chr6:g.43154714C>T	p.T423I			251	0,000	0,993	
<i>ALPK1</i>	α-quinasa 1	chr4:g.113353195A>C	p.D831A		0,0001255	0	0,060	0,243	
<i>CD37</i>	Antígeno de leucocito CD37	chr19:g.49840212C>G	p.I63M		2,476e-05	0	0,040	0,028	
<i>IQCF6</i>	Proteína F7 que contiene motivos IQ	chr3:g.51812782G>A	p.R61W			0	0,010	N/A	
<i>LFNG</i>	Péptido O-fucosil 3-β-N-acetilglucosaminil-transferasa	chr7:g.2566829C>T	p.R375C		1,69e-05	0	0,020	0,772	
<i>MGA</i>	Proteína asociada al gen MAX	chr15:g.41988923C>T	p.S571L			0	0,130	N/A	
<i>POLI</i>	Polimerasa de ADN iota	chr18:g.51820404T>C	p.V597A	rs543509008 MAF=0,0002	0,00024	0	0,590	N/A	
<i>SHC4</i>	Proteína 4 transformadora de SHC	chr15:g.49254675G>T	p.H180N			0	1,000	0,000	
<i>SMS</i>	Espermina sintasa	chrX:g.21958982G>C	p.G14R			0	0,350	0,002	
<i>SNAPC4</i>	Polipéptido 4 del complejo activador de snRNAs	chr9:g.139272279C>G	p.G1334R		2,675e-05	0	0,160	0,707	

Tabla 2b. Otras variantes encontradas en las pacientes no relacionadas

Gen	Proteína	Variante ^a	Efecto en la proteína	dbSNP ^b	ExAC ^c	Conservación ^d	SIFT ^e	PolyPhen ^f	Paciente FAF
<i>BRAT1</i>	Activador de ATM asociado a BRACA1	chr7:g.2580636C>T	p.E458L			333	0,568	0,000	AFU3
<i>CYP11A1</i>	Citocromo P450 11A1	chr15:g.75014793T>A	p.S216C	rs146622566 MAF=0,0003	0,0001153	0	0,004	0,987	AFU1
<i>MMP9</i>	Metalopeptidasa de matriz 9	chr20:g.44641147T>C	p.M419T		8,242e-06	496	0,000	1,000	AFU3
<i>MVD</i>	Mevalonato difosfato decarboxilasa	chr16:g.88723957C>T	p.R97Q	rs376949804 MAF=3e-05	3,448e-05	0	0,448	0,009	AFU2
<i>RUNX2</i>	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt	chr6:g.45480010C>T	p.P296L	rs201584115 MAF=0,0004	0,0002066	642	0,040	0,999	AFU3

(^a): posición genómica de la variante en el genoma de referencia humano GRCh37; (^b): número de identificador de referencia del SNP (rs) y MAF (frecuencia del alelo minoritario) de las variantes descritas; (^c): frecuencia alélica de las variantes descritas en la base de datos ExAC; (^d): puntuación de conservación del PhastCons (0 a 1,000), siendo 1,000 el *locus* más conservado y 0 un *locus* no conservado; (^e): SIFT: 0-0,05 perjudicial (en negrita); 0,051-1 tolerable; (^f): PolyPhen: 0-0,4 benigno; 0,41-0,89 posiblemente perjudicial; 0,9-1 patogénico (en negrita); (*): presente en un alelo doble mutante.

Análisis de las variantes en individuos controles y en la población general

Ninguna variante de las tablas 2a y 2b fue encontrada en 3 controles (pacientes tratadas con BPs durante un período largo de tiempo pero sin FAFs). Todas las variantes detectadas en las pacientes con FAF se buscaron en la base de datos ExAC para determinar si se trataba de variantes nuevas o muy raras (MAF <0,005). En ese sentido, once mutaciones no se encontraron ni en dbSNP ni en ExAC (*GGPS1*: p.D188Y; *COG4*: p.G85D; *PGRMC1*: p.P177H; *TMEM25*: p.V239del; *HEPHL1*: p.W991*; *CUL9*: p.T423I; *IQCF6*: p.R61W; *MGA*: p.S571L; *SHC4*: p.H180N; *SMS*: p.G14R; *BRAT1*: p.E458L). Las otras variantes tienen frecuencias $\leq 1/10000$, según ExAC.

Red de interacción génica/proteica y enriquecimiento de vías

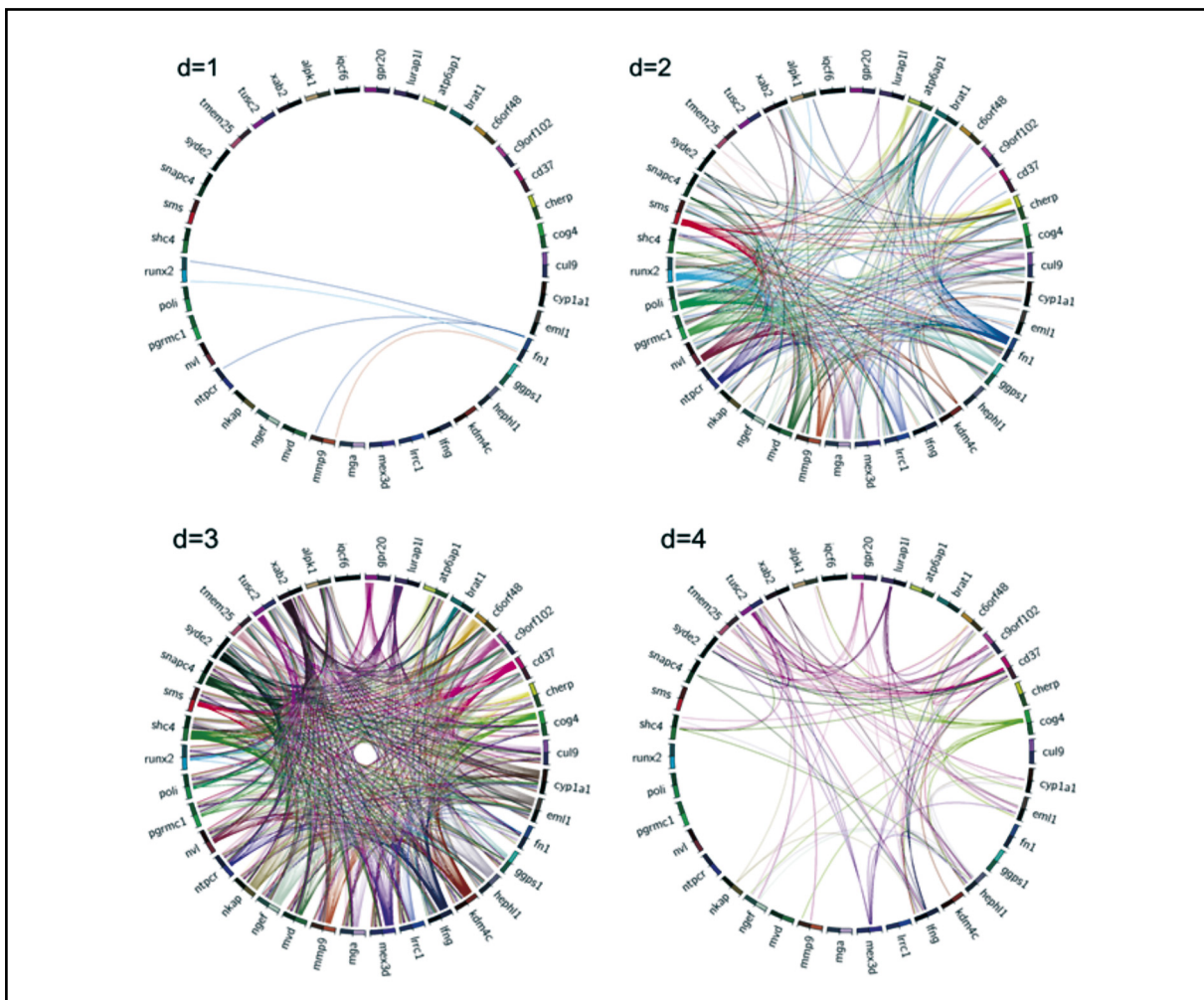
Se construyó una red de interacciones entre genes y/o proteínas para investigar las vías funcionales relacionadas con los 37 genes mutados encontrados en la secuenciación de los exomas y detectar otros genes potencialmente causales, así como mecanismos moleculares que puedan estar implicados en la generación de las FAFs. La figura 1

muestra la conectividad entre parejas de genes. En distintos círculos, se muestran las conexiones de entrada y de salida para los 37 genes a distancias 1 a 4, respectivamente. A distancia 1 casi no hay interacciones, siendo *FNI* el único gen conectado con otros. A distancia 2 se observa más conectividad. La mayoría de la conectividad entre parejas de genes se observa a distancia 3. El único gen que no presenta ninguna interacción a ningún nivel es *IQCF6*.

La red de interacciones de genes/proteínas muestra que *GGPS1* y *CYP11A1*, dos de los genes *driver* más relevantes, se conectan a distancia 3, a través de *INS* y *IL6* (Figura 2a). Otros 4 genes *driver* (*RUNX2*, *MVD*, *MMP9* y *PGRMC1*) están conectados con *GGPS1* a distancia 2. *MMP9* también está a distancia 2 de *CYP11A1*. Además, *FNI* y *MMP9* están conectados a distancia 1. De manera similar, los genes *driver* *SYDE2* y *NGEF* están interconectados a distancia 2, a través de *RHOB* (Figura 2b).

El análisis de enriquecimiento de vías en los 37 genes mutados, realizado con la herramienta DAVID, dio como resultado la vía de biosíntesis de los isoprenoides (GO:0008299) ($p=0,0006$), que contiene los genes *GGPS1*, *MVD* y *CYP11A1*.

Figura 1. Esquema de la conectividad entre parejas de genes a distancias 1 a 4. En los círculos se muestran los símbolos de los 37 genes FAF encontrados en este estudio y sus conexiones de entrada y de salida



Discusión

En este trabajo hemos estudiado el trasfondo genético de 3 hermanas con FAF y 3 pacientes adicionales, no relacionadas, a través de la secuenciación masiva del exoma para identificar posibles genes de susceptibilidad a la patología. Hemos identificado 37 variantes raras (en 34 genes) compartidas por las 3 hermanas, algunas de ellas no descritas anteriormente y consideradas dañinas por los predictores. La variante más llamativa fue la mutación p.Asp188Tyr en el gen *GGPS1*, que presentó la mejor puntuación de conservación, y que ya hemos descrito en un trabajo previo⁹. Otro hallazgo interesante fueron las dos mutaciones en el gen *CYP11A1*, una encontrada en las tres hermanas y la otra en una paciente no relacionada. Sin embargo, hay otras variantes que también podrían estar involucradas, en distintos grados, en la susceptibilidad a las FAFs asociadas a BPs o en el fenotipo osteoporótico subyacente, de modo que nuestros datos serían compatibles con un modelo en el cual la acumulación de variantes de susceptibilidad podría contribuir a la base genética de las FAFs.

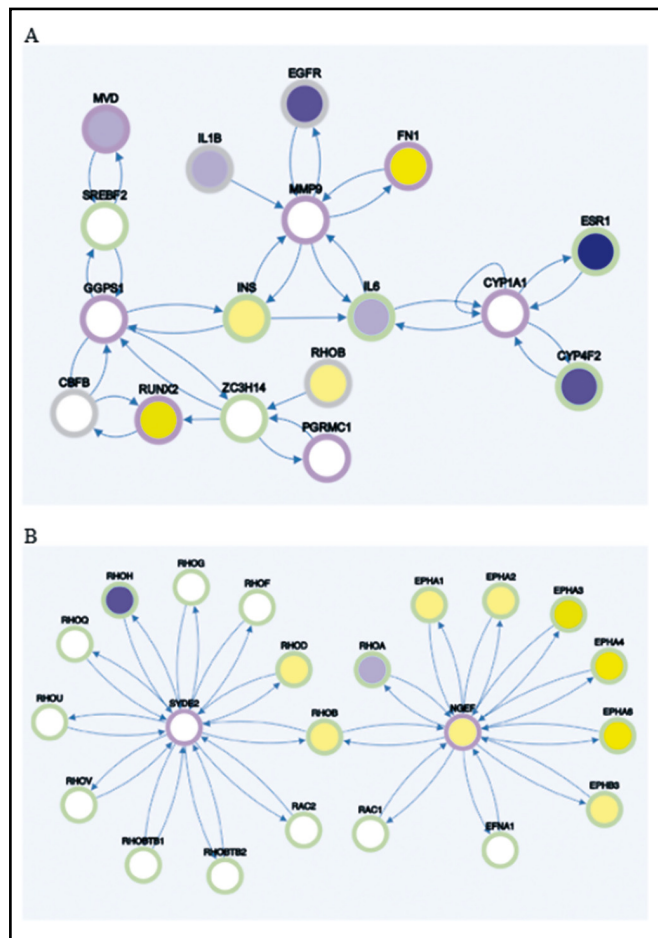
Los estudios epidemiológicos sugieren que existe una relación entre las FAFs y un tratamiento prolongado con BPs. Shane *et al.*, describieron períodos de tratamiento de una mediana de 7 años⁴. El riesgo absoluto de sufrir una FAF asociada al tratamiento con BPs se encuentra entre 2 casos por 100.000 pacientes/año a los 2 años de tratamiento y 78 casos por 100.000 pacientes/año a los 8 años de tratamiento²⁵. Estos datos sugieren que la duración de la terapia con BPs influiría positivamente en el riesgo de sufrir estas fracturas. En nuestro estudio, los casos de 6 pacientes con FAF después de un tratamiento a largo plazo con BPs son consistentes con esta asociación. Además, la ocurrencia de las FAFs en las 3 hermanas sugiere una predisposición genética con un papel determinante en la patología. Este estudio ha sido el primer análisis de exoma de pacientes de FAF. Hemos priorizado mutaciones raras, no-sinónimas, compartidas por las 3 hermanas. No se encontró ninguna mutación en homocigosis o heterocigosis compuesta en ningún gen. Estos hallazgos van en contra de un patrón de herencia recesivo para estos casos y son consistentes con el hecho que la FAF no es una enfermedad genética severa que ocurra durante las primeras etapas de la vida. No obstante, en el modelo dominante, se encontraron 34 genes mutados, algunos muy importantes para el metabolismo óseo. En un trabajo anterior que tenía por objetivo descubrir las causas genéticas de las FAFs, se utilizó un chip de exoma con >300.000 variantes codificantes ya conocidas y se encontraron 21 variantes raras sobrerrepresentadas en 13 pacientes de FAF²⁶. Sin embargo, ninguno de estos alelos de riesgo se encontró en los pacientes analizados en nuestro estudio. En concreto, no se encontraron variantes en el gen *PPEF2*, el único con un cambio asociado significativamente con el fenotipo en el estudio de Pérez-Núñez *et al.*²⁶ Esto apunta a una base genética heterogénea para las FAFs. En todo caso, es importante señalar que nuestra aproximación metodológica difiere de la del estudio mencionado en tanto que analizamos toda

la secuencia del exoma, cosa que nos permitió encontrar variantes no descritas anteriormente.

En el presente estudio, el único gen con mutaciones en las 3 hermanas y en pacientes no relacionados fue *CYP11A1*. Recientemente, Peris *et al.*²⁷ secuenciaron este gen en 17 pacientes de FAF y encontraron otra mutación en una de ellas. El gen *CYP11A1* codifica la enzima citocromo P450 1A1 que está involucrada en el metabolismo de fármacos y xenobióticos. Se trata de una hidroxilasa de hidrocarburos arilos y sus sustratos exógenos potenciales incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos, y está implicada en la formación de distintos tipos de cáncer humanos. Sus sustratos endógenos incluyen eicosanoides, que pueden generar productos biológicamente activos que actúan en el sistema vascular, entre otros. Este gen también es responsable de la hidroxilación del 17 β -estradiol, la estrona y la vitamina D en tejidos extrahepáticos²⁸. Esto es coherente con su papel en la biología ósea, una idea apoyada por Napoli *et al.*²⁹, quienes demostraron que el polimorfismo C4887A estaba relacionado con un aumento significativo del catabolismo de los estrógenos y con una densidad mineral ósea (DMO) femoral baja en mujeres postmenopáusicas. Por lo tanto, *CYP11A1* se presenta como otro gen de susceptibilidad potencial a las FAFs, aunque el mecanismo exacto de su acción en el metabolismo óseo todavía es desconocido y más estudios son necesarios para elucidarlo.

Entre los otros genes con variantes en las tres hermanas, *FNI* codifica la fibronectina, una proteína de la matriz extracelular necesaria para la regulación de la deposición del colágeno de tipo I por parte de los osteoblastos, esencial para la mineralización de la matriz extracelular, y cuyos niveles se han visto afectados por el tratamiento con BPs³⁰. Encontramos que las tres hermanas eran portadoras de un alelo doble mutante (p.V2241I y p.R1496W) en *FNI*, donde las dos mutaciones fueron consideradas como dañinas por los predictores de patogenidad. Esta fibronectina alterada podría afectar la mineralización ósea y/o la respuesta a los BPs y estar relacionada con el riesgo a sufrir una FAF en estas mujeres. También encontramos mutados 2 reguladores de GTPasas pequeñas: *SYDE2* y *NGEF*. Sus funciones respectivas (activación de las GTPasas RHO y de intercambio de sus nucleótidos de guanina) constituyen pistas sobre posibles efectos en la función osteoclástica y en la respuesta a los BPs. Las RHO GTPasas están en la vía del mevalonato en una posición por debajo del sitio de acción de los BPs, ya que tienen que ser preniladas (farnesiladas o geranilgeraniladas) para su correcta función celular. Por otra parte, nuestra red de interacción de genes/proteínas muestra como *NGEF* está muy relacionado con las efrinas y los receptores de efrinas (Figura 2b), que tienen un papel clave en el mecanismo de acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos³¹. Otro grupo de genes mutados en las 3 hermanas codifican proteínas nucleares con efectos pleiotrópicos sobre la expresión génica y/o la reparación del DNA (*KDM4C*, *XAB2*, *NVL*, *NKAP*, *ERCC6L2*). De ellos destacamos el gen *KDM4C*, que codifica una demetilasa lisina-específica que contiene un dominio JmjC, que ha sido previamente asociado con la edad de menarquia³², un biomarcador para la densidad ósea.

Figura 2. Detalles de la red de interacción entre genes/proteínas. El color del interior de los nodos indica la subexpresión (amarillo), sobreexpresión (azul) o ningún cambio de expresión (blanco) en osteoclastos tratados con alendronato o risendronato (datos de Yuen *et al.*, 2014²⁴). El color externo identifica los genes como *drivers* (mutados en nuestras pacientes) en lila, *upstream* de los genes mutados en verde, y otros en gris. a) Interacciones de los genes *GGPS1* y *CYP11A1* a distancia 2 (y algunas del gen *MMP9* a distancia 1). Nota: algunas conexiones se han omitido para la claridad de la figura. En particular, los nodos *RUNX2* y *FN1* no se han expandido para mostrar todos sus conectores. b) Interacciones de los genes *SYDE2* y *NGEF* a distancia 1



Otros genes encontrados mutados en las hermanas fueron el gen *PGRMC1* que codifica el componente 1 del receptor de membrana de la progesterona, y que fue previamente asociado al fallo ovárico prematuro³³; el gen *COG4* (que codifica la subunidad 4 del complejo oligomérico conservado del Golgi), relevante dada la importancia del transporte de vesículas a través del Golgi en los osteoclastos³⁴; y el gen *EML1* (que codifica una proteína asociada a microtúbulos) que puede ser importante en relación al cilio primario en osteocitos³⁵. En conjunto, las funciones y conocimiento previo de 13 de los 34 genes mutados en las 3 hermanas concuerdan con su posible implicación en la patología. Estas mutaciones se buscaron en las 3 pacientes de FAF no relacionadas, con resultados negativos.

No obstante, mediante una aproximación de genes candidatos, se encontraron mutaciones en

estas pacientes en dos proteínas claves para el remodelado óseo (*RUNX2* y *MMP9*) y en otra enzima de la vía del mevalonato (*MVD*, mevalonato difosfato carboxilasa). *RUNX2* es un factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica³⁶, mientras que *MMP9* es una metaloproteasa expresada en osteoclastos que degrada la matriz extracelular ósea³⁷, afectando a la arquitectura del hueso trabecular y a la estructura del hueso cortical³⁸. Por estas razones, ambos pueden estar involucrados en el riesgo a la FAF. Es sabido que *RUNX2* activa la expresión génica de *MMP9*³⁹ y esta interacción puede tener efectos sinérgicos en las propiedades biomecánicas del hueso en la paciente AFU3, que tiene ambas mutaciones (Nota: esta interacción no se muestra en la Figura 2a para que otras interacciones se puedan mostrar claramente). Finalmente, en la paciente AFU2 se encontró una mutación de cambio de sentido en el gen *MVD*, añadiendo una segunda proteína mutada de la vía del mevalonato. En la figura 3 se muestran, en el contexto de las células óseas, las proteínas codificadas por los genes que hemos encontrado mutados y cuya función en el hueso se conoce o está predicha.

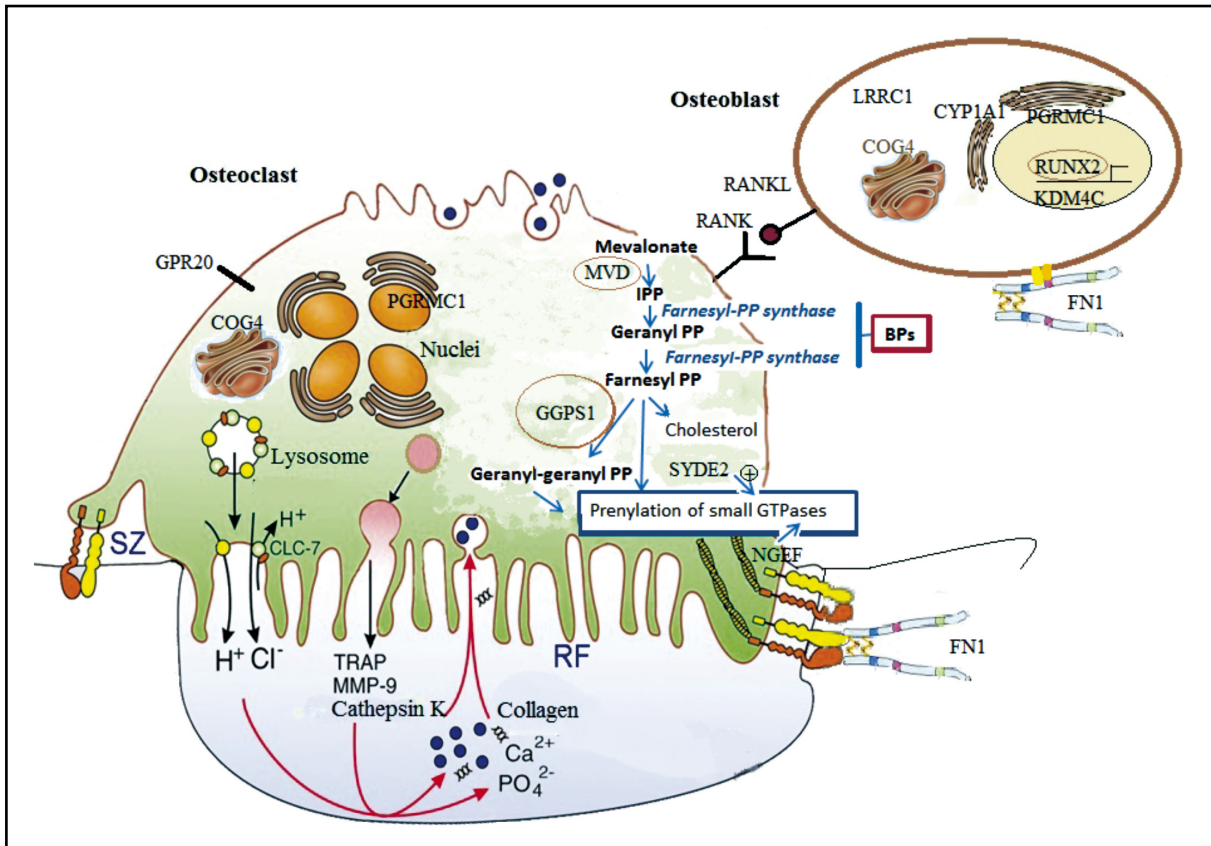
En conjunto, todas estas variantes raras pueden formar parte de un trasfondo genético asociado al desarrollo de los cambios óseos que dan lugar a las FAFs y a la posible interacción negativa con los BPs. Es probable que varios genes con efectos aditivos pequeños, y sus interacciones, estén implicados en las FAFs relacionadas con los BPs. Además, cada paciente individual podría ser portador de distintas variantes genéticas específicas.

Los puntos fuertes de este estudio son la posibilidad de analizar 3 hermanas con FAF y el abordaje por secuenciación del exoma completo, que carece de hipótesis previa. En este sentido, pudimos identificar mutaciones dañinas en genes que pertenecen a

la vía del mevalonato, así como otros genes relacionados con el metabolismo óseo. Por otro lado, el bajo número de pacientes y controles estudiados es una limitación del estudio y serán necesarios más estudios de secuenciación del exoma de pacientes de FAF adicionales y de pacientes no fracturados con un tratamiento a largo plazo con BPs (actuando como controles) para clarificar el papel preciso de estos genes y mutaciones. A pesar de la plausibilidad biológica del efecto dañino de las mutaciones encontradas, se necesita la replicación de estos hallazgos.

La identificación del trasfondo genético para las fracturas atípicas de fémur abre la puerta al futuro desarrollo de herramientas de diagnóstico y predicción del riesgo a sufrir este tipo de fracturas para determinar la idoneidad del tratamiento con BPs.

Figura 3. Proteínas codificadas por los genes mutados en las pacientes de FAF de este estudio y relacionadas con la función ósea



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

Bibliografía

1. Freemantle N, Cooper C, Diez-Perez A, Gitlin M, Radcliffe H, Shepherd S, et al. Results of indirect and mixed treatment comparison of fracture efficacy for osteoporosis treatments: A meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2013;24(1):209-17.
2. Peng J, Liu Y, Chen L, Peng K, Xu Z, Zhang D, et al. Bisphosphonates can prevent recurrent hip fracture and reduce the mortality in osteoporotic patient with hip fracture: A meta-analysis. *Pakistan J Med Sci.* 2016;32(2):499-504.
3. Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: Implications for osteoporosis management. *Mayo Clinic Proceedings.* 2009;84(7):632-7.
4. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):1-23.
5. Taormina DP, Marciano AI, Karia R, Egol KA, Tejwani NC. Symptomatic atypical femoral fractures are related to underlying hip geometry. *Bone.* 2014;63:1-6.
6. Sutton RAL, Mumm S, Coburn SP, Ericson KL, Whyte MP. "Atypical femoral fractures" during bisphosphonate exposure in adult hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2012;27(5):987-94.
7. Meier RPH, Lorenzini KI, Uebelhart B, Stern R, Peter RE, Rizzoli R. Atypical femoral fracture following bisphosphonate treatment in a woman with osteogenesis imperfecta case report. *Acta Orthop.* 2012;83(5):548-50.
8. Alonso N, Soares DC, V McCloskey E, Summers GD, Ralston SH, Gregson CL. Atypical femoral fracture in

- osteoporosis pseudoglioma syndrome associated with two novel compound heterozygous mutations in LRP5. *J Bone Miner Res.* 2015;30(4):615-20.
9. Roca-Ayats N, Balcells S, Garcia-Giralt N, Falcó-Mascaró M, Martínez-Gil N, Abril JF, et al. GGPS1 mutation and atypical femoral fractures with bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2017;376(18):1794-5.
10. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.
11. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.
12. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytisky A, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-303.
13. Consortium T 1000 GP. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491:56.
14. Medina I, De Maria A, Bleda M, Salavert F, Alonso R, Gonzalez CY, et al. VARIANT: Command Line, Web service and Web interface for fast and accurate functional characterization of variants found by Next-Generation Sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:W54-8.
15. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4:1073-81.
16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods.* 2010;7(4):248-9.
17. Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 2005;15(8):1034-50.

18. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57.
19. Boloc D, Castillo-Lara S, Marfany G, González-Duarte R, Abril JF. Distilling a Visual Network of Retinitis Pigmentosa Gene-Protein Interactions to Uncover New Disease Candidates. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135307.
20. Chatr-Aryamontri A, Oughtred R, Boucher L, Rust J, Chang C, Kolas NK, et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D369-79;
21. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D808-15.
22. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009;19(9):1639-45.
23. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D991-5.
24. Yuen T, Stachnik A, Iqbal J, Sgobba M, Gupta Y, Lu P, et al. Bisphosphonates inactivate human EGFRs to exert antitumor actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):17989-94.
25. Brown JP, Morin S, Leslie W, Papaioannou A, Cheung AM, Davison KS, et al. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms, and drug holidays. *Can Fam Physician.* 2014;60(4):324-33.
26. Pérez-Núñez I, Pérez-Castrillón JL, Zarrabeitia MT, García-Ibarbia C, Martínez-Calvo L, Olmos JM, et al. Exon array analysis reveals genetic heterogeneity in atypical femoral fractures. A pilot study. *Mol Cell Biochem.* 2015;409:45-50.
27. Peris P, González-Roca E, Rodríguez-García SC, del Mar López-Cobo M, Monegal A, Guañabens N. Incidence of mutations in the ALPL, GGPS1 and CYP1A1 genes in patients with atypical femoral fractures. *JBMR Plus.* 2018; [Epub ahead of print].
28. Zhou SF, Liu J-P, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev.* 2009;41(2):89-295.
29. Napoli N, Villareal DT, Mumm S, Halstead L, Sheikh S, Cagaanan M, et al. Effect of CYP1A1 gene polymorphisms on estrogen metabolism and bone density. *J Bone Miner Res.* 2005;20(2):232-9.
30. Insalaco L, Gaudio F Di, Terrasi M, Amodeo V, Caruso S, Corsini LR, et al. Analysis of molecular mechanisms and anti-tumoural effects of zoledronic acid in breast cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2012;16(9):2186-95.
31. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014;3:481.
32. Perry JRB, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature.* 2014;514(7520):92-7.
33. Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, Stattin EL, Lösel R, Wehling M, et al. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet.* 2008;17(23):3776-83.
34. Xia WF, Tang FL, Xiong L, Xiong S, Jung JU, Lee DH, et al. Vps35 loss promotes hyperresorptive osteoclastogenesis and osteoporosis via sustained RANKL signaling. *J Cell Biol.* 2013;200(6):821-37.
35. Nguyen AM, Jacobs CR. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):196-204.
36. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89(5):747-54.
37. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: Implications for bone resorption. *Lab Investig.* 1995;72(3):311-22.
38. Nyman JS, Lynch CC, Perrien DS, Thielloy S, O'Quinn EC, Patil CA, et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J Bone Miner Res.* 2011;26(6):1252-60.
39. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol.* 2005;25(19):8581-91.