

Genetiske faktorer

Bente L Langdahl, Charlotte L Tofteng, Henrik L Jørgensen og Bo Abrahamsen

Genetiske faktorer kan forklare 50-80 % af variationen i BMD og andre markører for knoglekvalitet[1-3], mens genetiske faktorer kun forklarer 20-70 % af forekomsten af osteoporotiske frakturer[4;5]. For både BMD og frakturer gælder at effekten aftager med stigende alder og der er et betydeligt samspil med miljøfaktorer. En mangelsituation - eksempelvis folat mangel, lavt calciumindtag eller østrogenbortfald - kan gøre en ellers neutral genetisk variant betydningsfuld. De fleste studier tyder på at BMD nedarves i befolkningen ved polygen arv med adskillige genetiske varianter i flere gener.

Forskellige metoder kan anvendes til identifikation af mutationer og polymorfier, der influerer på BMD, hoftegeometri og frakturrisiko. Til at lokalisere de genetiske faktorer til større eller mindre områder af genomet anvendes to forskellige metoder. Koblings-studier kan føre til identifikation af de såkaldte quantitative trait loci (QTL), altså gen- og kromosomområder som generelt nedarves (segregerer) sammen med BMD eller frakturrisiko fra generation til generation. Genome-wide associations studier (GWAS) kan føre til identifikation af gener, der er associeret med BMD, andre knoglefænotyper eller risiko for fraktur. Anvendeligheden af disse metoder i humane studier er vanskeliggjort af at osteoporose er en sent debuterende sygdom og det derfor kan være vanskeligt at finde familier hvor arvegangen kan fastsættes gennem mere end 2-3 generationer. Koblings-studier har identificeret forskellige QTLs, men har kun i meget begrænset omfang kunnet identificere de underliggende genetiske varianter[6-9]. GWAS har identificeret flere gener, der er associeret med BMD og risiko for fraktur [10-12]. I de klassiske koblingsstudier har været anvendt 350-400 genetiske markører jævnt fordelt over kromosomerne. GWAS bygger på chip

teknologi, giver mulighed for at undersøge mere end 500.000 genetiske varianter fordelt på genomet. Begge metoder har desuden med stor succes været anvendt til identifikation af genetiske varianter, der er ansvarlige for mere udtalte fænotyper, fx meget høj knoglemasse[13;14]. Dyre modeller, typisk mus, har også været anvendt til identifikation af gener, der har betydning for BMD. Fordelen ved dyre modeller er at det, i modsætning til undersøgelser af mennesker, er muligt ikke alene at sikre ensartede miljøforhold men også at studere BMD i mange generationer og store søskendeflokke[15].

Indtil videre bygger vores viden om specifikke genetiske varianters indflydelse på BMD og fraktur risiko derfor primært på andre typer studier, nemlig undersøgelse af variationer i kandidat gener, hyppigt enkelt nukleotid polymorfier (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Et kandidat gen er typisk udvalgt på baggrund af dets funktion, fx receptor for et hormon med virkning på knoglevæv (vitamin D receptoren (VDR) og østrogenreceptoren (ER)) eller strukturelle proteiner, der er højt udtrykt i knogle (kollagen type 1 α 1 (COL1A1) og osteocalcin). Kandidat gener kan også være udvalgt på baggrund af lokaliseringsstudier eller fra studier, der har vist højt eller lavt ekspression af det pågældende gen i celler eller væv fra patienter med osteoporose.

Strukturelle proteiner

Knogle matrix udgøres hovedsageligt af kollagen og heraf udgør kollagen type I mere end 90 %. Kollagen er en triple helix bestående af 2 kollagen type I α 1 (COL1A1) og 1 kollagen type I α 2 (COL1A2) molekyler. Det er velkendt at mutationer i disse to gener medfører Osteogenesis Imperfecta. Kollagen type I generne er på den baggrund oplagte kandidat gener i forhold til osteoporose. Begge gener er da også blevet undersøgt for polymorfier i de kodende regioner hos patienter med

osteoporose. Der fandtes kun få og sjældne polymorfier uden overbevisende effekt på BMD eller risiko for fraktur.

Efterfølgende er promoter og første intron af COL1A1 også blevet undersøgt. Disse to regioner er interessante, da de i de fleste gener er ansvarlig for kontrol af transskription af genet. I første intron fandtes 3 polymorfier, hvoraf 2 er meget sjældne. Den 3. er en guanin til thymidin substitution i en Sp1 transkriptionsfaktor bindende lokalisation. Denne polymorfi er associeret med nedsat BMD og forekomst af osteoporotiske frakturer[16]. Der er udført to metaanalyser, som begge finder association mellem denne polymorfi og nedsat BMD samt en delvis BMD uafhængig association med fraktur risiko. Risikoen for at få osteoporotiske brud øges med 52-86 % afhængig af om personen er hetero- eller homozygot for det osteoporose-associerede allel[17;18]. Mann et al. har også undersøgt funktionen af denne polymorfi. Studierne tyder på at polymorfien medfører at Sp1 transkriptionsfaktoren binder sig stærkere til bindingsstedet og at der derved produceres relativt for meget COL1A1 og der dannes COL1A1 triple helices, som hos patienter med nogle former af Osteogenesis Imperfecta patienter er vist at have dårligere styrke end de normale triple helices[17]. Nye studier tyder på at også polymorfier i promoteren og specielt samspillet mellem Sp1 polymorfien og polymorfierne i promoteren har betydning for både BMD og frakturrisiko [19-21].

Calcium homeostase

I starten af 1990'erne troede man at "osteoporosegenet" var fundet, da et studie tydede på, at op til 75 % af den genetiske variation i BMD kunne forklares ud fra én ikke-kodende SNP (BsmI) i genet for vitamin D receptoren (VDR)[22]. Disse resultater blev dog senere delvis trukket tilbage[23] og efterfølgende studier og metaanalyser af denne og andre koblede polymorfier har da også kun kunne påvise en

svag sammenhæng[24]. Herudover ser det ud til, at der er en betydelig interaktion med andre faktorer så som calcium indtagelse, vægt og alder, således at negative effekter på knoglevævet associeret med genotype muligvis kun udtrykkes på bestemte tidspunkter i livet eller hos personer, der på anden måde har øget risiko for osteoporose.

Kønshormonsystemet

Inaktiverende mutationer i $ER\alpha$ genet medfører østrogenresistens. De fleste studier af betydningen af genetiske varianter i $ER\alpha$ genet for udvikling af osteoporose omfatter to delvis koblede SNPs i første intron (PvuII og XbaI). Association mellem XbaI og BMD og fraktur (relativ risiko for fraktur på 66 % for XX genotypen) er vist i en metaanalyse af 30 studier[25]. De to SNPs i første intron er koblede til en mikrosatellit (TA-repeat) i promoter regionen, som muligvis er en bedre markør for BMD og fraktur[26]. Funktionaliteten af polymorfierne er ikke klarlagt.

Generne for androgen receptoren (AR) og aromatase (CYP19) som omdanner androgen til østrogen er også oplagte, men knap så velundersøgte kandidat gener for osteoporose. En CAG mikrosatellit i AR er tilsyneladende betydende for receptorens funktion (transaktivering af respons gener), og polymorfien er fundet associeret til BMD og fraktur[27]. I CYP19 genet har man lokaliseret dels en TTTA mikrosatellit, men også SNPs, der i nogle studier er relateret til BMD eller effekten af hormon substitution på BMD[28].

Enzymsystemer

Genetiske variationer i en række enzymer er undersøgt for mulig sammenhæng med knoglemasse og frakturrisiko. Den bedst undersøgte polymorfi i et enzym er en SNP (C677T) i Methylen Tetrahydrofolat Reduktase (MTHFR) genet, en alanin til valin substitution, som forårsager en termolabil variant af MTHFR med nedsat aktivitet.

MTHFR katalyserer reduktionen af 5, 10-methylenetetrahydrofolat til 5-methyltetrahydrofolat, som er vigtig for remethyleringen af homocystein til methionin. Talrige studier har vist, at MTHFR (C677T) polymorfien er associeret med forhøjede værdier af s-homocystein, specielt hos individer med TT genotypen. Patienter med homocystinuri, som har svær hyperhomocysteinæmi, har defekter i collagen cross-linking og udvikler meget tidligt svær osteoporose[29]. To nylige, store, prospektive populationsbaserede studier har endvidere vist, at risikoen for frakturer er øget med en faktor 2-4 hos personer med s-homocystein niveauer i den højeste kvartil i forhold til den laveste kvartil[30;31]. Flere studier har i overensstemmelse med det således forventede vist, at TT genotypen er associeret med lav knoglemasse og frakturrisiko[32-34], men der er også studier, der ikke har kunnet bekræfte denne sammenhæng[35]. Endelig har flere studier fundet, at effekten af polymorfien afhænger af s-folat.

RANK/RANKL/OPG, LRP-5, vækstfaktorer og cytokiner

Mange cytokiner og vækstfaktorer er pga. deres indflydelse på knoglemetabolismen potentielle kandidat gener. Adskillige er da også undersøgt og for nogle er der fundet associationer mellem polymorfier og BMD eller frakturrisiko, det gælder TGF-beta1[36], IL-1 systemet[37;38], IL-6[39], IGF-I og -II[40] og TNF systemet[41]. Generne for RANK, RANKL og OPG er også blevet undersøgt for genetiske varianter. Der er påvist adskillige polymorfier i OPG genet og flere af polymorfierne i promoter regionen er vist at være associeret med nedsat BMD og fraktur risiko. Specielt er association med A163G polymorfien fundet i flere studier[42]. Der er endnu ikke funktionelle studier af denne polymorfi, men den ændrer et såkaldt Hox bindings sted. Studier af både RANK og RANKL er i gang. Der er fundet association mellem polymorfier i både RANK og OPG og Paget's sygdom[43;44].

Endelig har Lipoprotein Related Peptide (LRP)-5/6 og sclerostin (SOST) generne tiltrukket sig meget opmærksomhed efter opdagelsen af betydningen af mutationer i disse gener for tilstande karakteriseret ved enten meget høj eller lav BMD. Disse mutationer forekommer ikke hos befolkningen generelt, men der er påvist almindeligt forekommende polymorfier i begge gener. To polymorfier i SOST genet, henholdsvis en 3 basepar insertion i promoter regionen og en SNP i regionen, der er associeret med van Buchem's sygdom, er vist at være associeret med nedsat BMD, men ikke med risiko for fraktur. Effekten blev tydeligere med stigende alder og der kunne påvises en additiv effekt mellem den førstnævnte polymorfi og Sp1 polymorfien i COL1A1 omtalt tidligere[45]. I en gruppe perimenopausale kvinder kunne der ikke påvises effekt af disse polymorfier på BMD[46].

I både LRP-5 og det homologe gen LRP-6 findes adskillige polymorfier, som er undersøgt for association med BMD og fraktur risiko. De to polymorfier, der mest stabilt har vist sig at være associeret med nedsat BMD og øget fraktur risiko er to polymorfier i den kodende del af genet, der forårsager ændringer i aminosyrefrekvensen fra valin til methionin (position 667) i exon 9 og alanin til valin (position 1330) i exon 18[47]. Nogle studier tyder på at effekten er kraftigere hos mænd[48;49] og udviser interaktion med fysisk aktivitet[50].

De ovenfor nævnte polymorfier er mulige genetiske markører for osteoporotiske frakturer. Det er imidlertid endnu kun et fåtal, der er velundersøgt, og hvor vi har nogen information om virkningsmekanisme, fx COL1A1, vitamin D og østrogen receptorerne. Disse genetiske markører for BMD og fraktur risiko vil måske en gang i fremtiden kunne anvendes til identifikation af personer med øget risiko for at pådrage sig osteoporotiske frakturer. Fordelen ved dette frem for måling af BMD, som anvendes i dag, er at personerne vil kunne identificeres tidligere, og ændring af

livsstil samt evt. forebyggende behandling vil kunne iværksættes på et tidligere tidspunkt end i dag. Før disse genetiske markører vil kunne få en plads i den kliniske hverdag, er det imidlertid nødvendigt at påvise disse polymorfiers funktionelle betydning. Udover i forbindelse med identifikation af personer med øget risiko for udvikling af osteoporose kan viden om genetiske varianter indflydelse på BMD og/eller fraktur risiko også få stor betydning for udvikling af nye behandlingsprincipper eller valg af eksisterende behandling til patienter med visse af disse genotyper.

Fokus på genetiske årsager til udvikling af osteoporose kan imidlertid også have en negativ effekt. Mange patienter får fejlagtigt den opfattelse at når deres nedsatte BMD til dels skyldes arvelige faktorer er der ikke noget at gøre. Det er derfor vigtigt at informere om at de genetiske faktorer kun er bestemmende for ca. 50 % af den interindividuelle variation, men at de resterende 50 % bestemmes for en stor del af livsstilsfaktorer, som patienterne har indflydelse på og at livsstilsændringer kan modificere den genetisk betingede risiko.

Reference List

1. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G (1995) Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J.Bone Miner.Res.* 10:2017-2022
2. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD (1996) The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J.Bone Miner.Res.* 11:530-534
3. Kelly PJ, Nguyen T, Hopper J, Pocock N, Sambrook P, Eisman J (1993) Changes in axial bone density with age: a twin study. *J.Bone Miner.Res.* 8:11-17
4. MacGregor A, Snieder H, Spector TD (2000) Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people. Twin data support genetic contribution to risk of fracture. *BMJ* 320:1669-1670
5. Michaelsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlborn A, Pedersen NL (2005) Genetic liability to fractures in the elderly. *Arch.Intern.Med.* 165:1825-1830
6. Koller DL, Econs MJ, Morin PA, Christian JC, Hui SL, Parry P, Curran ME, Rodriguez LA, Conneally PM, Joslyn G, Peacock M, Johnston CC, Foroud T (2000) Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85:3116-3120
7. Devoto M, Shimoya K, Caminis J, Ott J, Tenenhouse A, Whyte MP, Sereda L, Hall S, Considine E, Williams CJ, Tromp G, Kuivaniemi H, Ala-Kokko L, Prockop DJ, Spotila LD (1998) First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur.J.Hum.Genet.* 6:151-157
8. Wilson SG, Reed PW, Bansal A, Chiano M, Lindersson M, Langdown M, Prince RL, Thompson D, Thompson E, Bailey M, Kleyn PW, Sambrook P, Shi MM, Spector TD (2003) Comparison of genome screens for two independent cohorts provides replication of suggestive linkage of bone mineral density to 3p21 and 1p36. *Am.J.Hum.Genet.* 72:144-155
9. Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K (2003) Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS.Biol.* 1:E69
10. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D (2007) Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC.Med.Genet.* 8 Suppl 1:S14
11. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD (2008) Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 371:1505-1512
12. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2008) Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N.Engl.J.Med.* 358:2355-2365
13. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am.J.Hum.Genet.* 70:11-19

14. Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, Ramesar R, Peltonen L, Somer H, Hirose T, Dallapiccola B, De Paepe A, Swoboda W, Zabel B, Superti-Furga A, Steinmann B, Brunner HG, Jans A, Boles RG, Adkins W, van den Boogaard MJ, Olsen BR, Warman ML (1996) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am.J.Hum.Genet.* 59:146-151
15. Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G, Orwoll ES (2004) Regulation of bone mass in mice by the lipoxigenase gene *Alox15*. *Science* 303:229-232
16. Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH (1996) Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic *Sp1* binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat.Genet.* 14:203-205
17. Mann V, Ralston SH (2003) Meta-analysis of *COL1A1 Sp1* polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 32:711-717
18. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Scollen S, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Diez-Perez A, Dunning AM, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Mellibovsky L, Del Monte F, Pols HA, Reeve J, Reid DM, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Sherlock RE, Ioannidis JP (2006) Large-scale evidence for the effect of the *COL1A1 Sp1* polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS.Med.* 3:e90
19. Garcia-Giralt N, Nogues X, Enjuanes A, Puig J, Mellibovsky L, Bay-Jensen A, Carreras R, Balcells S, Diez-Perez A, Grinberg D (2002) Two new single-nucleotide polymorphisms in the *COL1A1* upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density. *J.Bone Miner.Res.* 17:384-393
20. Husted LB, Harslof T, Gonzalez-Bofill N, Schmitz A, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL (2009) Haplotypes of promoter and intron 1 polymorphisms in the *COL1A1* gene are associated with increased risk of osteoporosis. *Calcif.Tissue Int.* 84:85-96
21. Garcia-Giralt N, Enjuanes A, Bustamante M, Mellibovsky L, Nogues X, Carreras R, Diez-Perez A, Grinberg D, Balcells S (2005) In vitro functional assay of alleles and haplotypes of two *COL1A1*-promoter SNPs. *Bone* 36:902-908
22. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 May 1;387(6628):106]. *Nature* 367:284-287
23. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA (1997) Correction: Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 387:106
24. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, Reid DM, Amidei A, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Diez-Perez A, Dobnig H, Dunning AM, Enjuanes A, Fahrleitner-Pammer A, Fang Y, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Mavilia C, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Pols HA, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Scollen S, Sherlock RE, Ioannidis JP (2006) The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann.Intern.Med.* 145:255-264
25. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG (2004) Differential genetic effects of *ESR1* gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 292:2105-2114
26. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF (2000) A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J.Bone Miner.Res.* 15:2222-2230

27. Langdahl BL, Stenkjaer L, Carstens M, Tofteng CL, Eriksen EF (2003) A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures. *Calcif.Tissue Int.* 73:237-243
28. Tofteng CL, Kindmark A, Brandstrom H, Abrahamsen B, Petersen S, Stiger F, Stilgren LS, Jensen JE, Vestergaard P, Langdahl BL, Mosekilde L (2004) Polymorphisms in the CYP19 and AR Genes-Relation to Bone Mass and Longitudinal Bone Changes in Postmenopausal Women With or Without Hormone Replacement Therapy: The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Calcif.Tissue Int.* 74: 25-34.
29. Parrot F, Redonnet-Vernhet I, LaCombe D, Gin H (2000) Osteoporosis in late-diagnosed adult homocystinuric patients. *J.Inherit.Metab Dis.* 23:338-340
30. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N.Engl.J.Med.* 350:2042-2049
31. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der KM, de Jonge R, Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG (2004) Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N.Engl.J.Med.* 350:2033-2041
32. Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, Stilgren L, Bladbjerg EM, Kristensen SR, Brixen K, Mosekilde L (2003) A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study. *J.Bone Miner.Res.* 18:723-729
33. Villadsen MM, Bünger MH, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL (2005) The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism (C677T) is a weak predictor of BMD and associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos.Int.* 16:411-416
34. Bathum L, von Bornemann HJ, Christiansen L, Madsen JS, Skytthe A, Christensen K (2004) Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporos.Int.* 15:659-664
35. Jorgensen HL, Madsen JS, Madsen B, Saleh MM, Abrahamsen B, Fenger M, Lauritzen JB (2002) Association of a Common Allelic Polymorphism (C677T) in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene with a Reduced Risk of Osteoporotic Fractures. A Case Control Study in Danish Postmenopausal Women. *Calcif.Tissue Int.* 71:386-392
36. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF (2003) Polymorphisms in the transforming growth factor beta1 gene and osteoporosis. *Bone* 32:297-310
37. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF (2000) Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1--receptor antagonist gene but not with polymorphisms in the interleukin-1beta gene. *J.Bone Miner.Res.* 15:402-414
38. Keen RW, Woodford-Richens KL, Lanchbury JS, Spector TD (1998) Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone* 23:367-371
39. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M (2001) A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J.Hum.Genet.* 46:267-272
40. Kim JG, Roh KR, Lee JY (2002) The relationship among serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal women in Korea. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 186:345-350
41. Ota N, Nakajima T, Ezura Y, Iwasaki H, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Ito H, Emi M (2002) Association of a single nucleotide variant in the human tumour necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Ann.Hum.Biol.* 29:550-558

42. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF (2002) Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J.Bone Miner.Res.* 17:1245-1255
43. Wuyts W, Van Wesenbeeck L, Morales-Piga A, Ralston S, Hocking L, Vanhoenacker F, Westhovens R, Verbruggen L, Anderson D, Hughes A, Van Hul W (2001) Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget's disease of bone. *Bone* 28:104-107
44. Daroszewska A, Hocking LJ, McGuigan FE, Langdahl B, Stone MD, Cundy T, Nicholson GC, Fraser WD, Ralston SH (2004) Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *J.Bone Miner.Res.* 19:1506-1511
45. Uitterlinden AG, Arp PP, Paepers BW, Charmley P, Proll S, Rivadeneira F, Fang Y, van Meurs JB, Britschgi TB, Latham JA, Schatzman RC, Pols HA, Brunkow ME (2004) Polymorphisms in the sclerosteosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am.J.Hum.Genet.* 75:1032-1045
46. Balemans W, Foerzler D, Parsons C, Ebeling M, Thompson A, Reid DM, Lindpaintner K, Ralston SH, Van Hul W (2002) Lack of association between the SOST gene and bone mineral density in perimenopausal women: analysis of five polymorphisms. *Bone* 31:515-519
47. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hagens W, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG (2006) Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J.Bone Miner.Res.* 21:141-150
48. Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, Chevalley T, Bonjour JP, Dermizakis ET, Rizzoli R, Antonarakis SE (2004) Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am.J.Hum.Genet.* 74:866-875
49. Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C, Cohen-Solal M, Ostertag A, Antonarakis SE, Rizzoli R, De Vernejoul MC (2005) LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone* 37:770-775
50. Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA, Karasik D, Manen D, Imamovic A, Herbert AG, Dupuis J (2007) Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone* 40:587-596