

Genetický výskum osteoporózy: možnosti a experimentálne východiská

R. OMELKA¹, M. MARTINIAKOVÁ¹, I. ŽOFKOVÁ²

¹Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, ²Endokrinologický ústav, Praha

SÚHRN

Omelka R., Martiniaková M., Žofková I.: **Genetický výskum osteoporózy: možnosti a experimentálne východiská**

Výskum genetickej podmienosti osteoporózy predstavuje perspektívnu a rýchlo sa rozvíjajúcu oblasť genetiky ľudských chorôb. Osteoporóza je charakterizovaná multifaktoriálnou etiológiou. Z doterajších štúdií vyplýva, že viaceré ukazovatele (rizikové faktory) osteoporózy sú geneticky podmienené vrátane hustoty kostného minerálu (BMD). Gény, resp. lokusy (QTL) ovplyvňujúce patogenézu osteoporózy je možné odhaliť pomocou väzbových štúdií v rámci rodín a súrodeneckých párov, alebo na základe asociačných analýz kandidátskych génov v rámci populácie. V niektorých prípadoch sa na väzbové štúdie výhodne využívajú modelové organizmy. Nezástupiteľné miesto v detekcii genetickej variability zastávajú metódy molekulárnej biológie. Popri „klasických“ postupoch, ktoré sú založené na použití špecifických sond alebo polymerázovej reťazovej reakcii (PCR), sa do popredia dostávajú nové metódy, najmä DNA čipy a real-time PCR, ktoré umožňujú aj analýzu génovej expresie. Predovšetkým čipová analýza predstavuje perspektívny prístup v genetickom výskume multifaktoriálnych ochorení. Nové molekulárno-biologické metódy v súčasnosti poskytujú oveľa väčšie možnosti pre vytvorenie komplexného pohľadu na genetickú podmienenosť osteoporózy, ako kedykoľvek predtým, čo by v budúcnosti mohlo viesť k oveľa širším možnostiam jej liečby.

Kľúčové slová: osteoporóza, genetické metódy, QTL, kandidátske gény

SUMMARY

Omelka R., Martiniaková M., Žofková I.: **Genetic research in osteoporosis: perspectives and experimental bases**

Research into the genetic determination of osteoporosis represents a perspective and rapidly developing area of human disease genetics. Osteoporosis is characterized by a multifactorial etiology. The previous studies suggest that numerous markers of osteoporosis, including bone mineral density (BMD), are genetically determined. Genes or loci (QTL) affecting the pathogenesis of osteoporosis may be detected by linkage studies within families and sibling pairs or by association analyses of candidate genes within a population. In some cases, the linkage studies conveniently use model organisms. In genetic variability detection, molecular biology methods are irreplaceable. In addition to „traditional“ procedures based on the use of specific probes or polymerase chain reaction (PCR), new methods have come to the fore, mainly DNA chips and real-time PCR, also enabling gene expression analysis. The chip analysis in particular represents a promising approach to genetic research on multifactorial diseases. More than ever before, the current new molecular biology methods provide a much higher potential for creating a complex view of the genetic determination of osteoporosis which may significantly enhance the future therapeutic options.

Keywords: osteoporosis, genetic methods, QTL, candidate genes

Osteologický bulletin 2007;12(1):11–17

Adresa: RNDr. Radoslav Omelka, PhD., Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Trieda A. Hlinku 1, 949 01 Nitra, tel.: +421 907 670 200, e-mail: romelka@pobox.sk

Došlo do redakcie: 22. 2. 2007

Prijato k tisku: 6. 3. 2007

Úvod

Osteoporóza je spoločensky najzávažnejšie ochorenie pohybového aparátu. Vyznačuje sa multifaktoriálnou etiológiou, t. j. na jej vznik a priebeh majú vplyv genetické i negenetické faktory. Kým štúdium negenetických faktorov (vek, výživa, fajčenie, alkoholizmus, telesné cvičenie, chronické ochorenia apod.) vo vzťahu k osteoporóze prebieha už desaťročia, genetický a molekulárno-biologický výskum tohto ochorenia je relatívne nový. Z genealogického, genealogického a molekulárno-genetického výskumu vyplýva, že viaceré rizikové faktory osteoporózy sú dedičné. Výrazne geneticky podmienená je napríklad hustota kostného minerálu (bone mineral density – BMD), hodnota heritability BMD sa pohybuje medzi 0,5–0,9 [1,2]. To znamená, že až

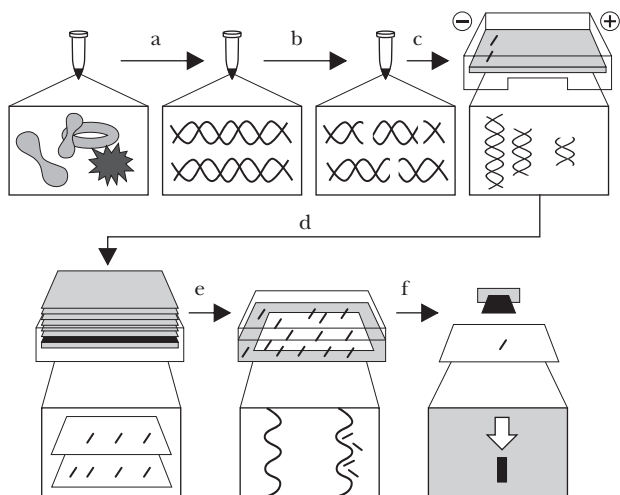
50–90 % variability BMD je možné pripísať genetickým faktorom, kým 10–50 % variability spôsobuje vplyv prostredia. Geneticky podmienené sú aj ďalšie ukazovatele, spojené s osteoporózou a rizikom fraktúr, napríklad geometria krčka *femuru* [1], biochemické markery kostného obratu [3] alebo BMI [4]. Heritabilita samotných fraktúr je závislá od veku (so zvyšujúcim sa vekom klesá), do 65. roka sa pohybuje v rozmedzí od 0,27–0,65 [5,6].

Genetické faktory majú polygénny charakter, čiže pozostávajú z veľkého počtu tzv. génov malého účinku, ktoré nemajú dostatočne veľký efekt na vyvolanie veľkých, kvalitatívnych rozdielov medzi jedincami. Naopak, variabilita v niekoľkých, prípadne mnohých génoch malého účinku spoločne spôsobuje kontinuálnu (kvantitatívnu) variabilitu

v danom znaku medzi jedincami. Odhalenú variabilitu v DNA so známou dedičnosťou, asociovanú s istým fenotypom (napríklad ochorenie) je možné využiť na predikciu vzniku tohto ochorenia. Uvedenú variabilitu v DNA potom

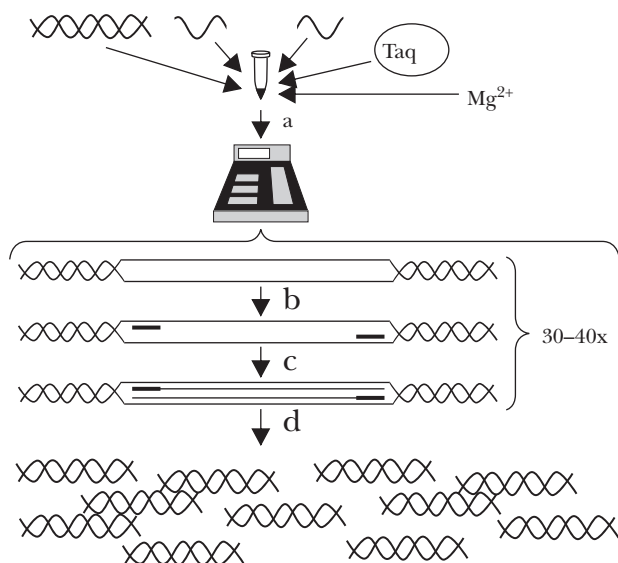
Obr. 1

Využitie sond pri detekcii polymorfizmov. Po izolácii DNA napríklad z krvi (a) sa nukleová kyselina enzymaticky štiepi (b), následne separuje elektroforeticky (c), jednotlivé fragmenty sa prenásu na membránu (d), membrána sa inkubuje s príslušnou sondou (e) a miesta hybridizácie sa napokon vizualizujú (f). V rámčekoch je znázornená molekulárna úroveň jednotlivých procesov.



Obr. 2

Schéma polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Všetky komponenty reakcie sa zmiešajú v skúmavke a umiestnia v programovateľnom prístroji – termocykleri (a), kde sa cyklicky striedajú denaturácia DNA, hybridizácia primerov (b) a polymerizácia (c). Výsledkom reakcie sú milióny kópií nasyntetizovaného úseku DNA (d).



nazývame genetický marker. Oblasti chromozómov, ktoré obsahujú gény, resp. lokusy pre kvantitatívne znaky sa označujú QTL (Quantitative Trait Loci).

Hľadanie QTL a génov ovplyvňujúcich vznik osteoporózy

Gény, resp. lokusy ovplyvňujúce patogenézu polygénne založených ochorení ako osteoporóza, je možné odhaliť pomocou väzbových štúdií v rámci rodín a súrodeneckých párov, alebo na základe asociačných analýz v rámci populácie. V niektorých prípadoch sa na väzbové štúdie výhodne využívajú modelové organizmy (napríklad inbredné línie myší).

Aplikácia väzbovej analýzy si vyžaduje existenciu tzv. referenčných rodín (známe a informatívne rodokmene, súrodenecké páry) s rozdielmi v danom znaku. Táto metóda je úspešná najmä pri identifikácii génov, zodpovedných za monogénové ochorenia kosti, napríklad *osteopetrosis* [7]. Na druhej strane sa využíva aj pri hľadaní QTL, čiže v súvislosti s kvantitatívnymi znakmi [8]. V takomto prípade sa stanovujú rozdiely v genotypoch ľahko detegovateľných DNA markerov a študuje sa sila genetickej väzby medzi jednotlivými markermi v rámci QTL alebo miera segregácie fenotypu (napríklad BMD) s jednotlivými markermi (LOD score). K najdôležitejším a najviac používaným markerom pre väzbovú analýzu patria mikrosatelity – opakujúce sa sekvencie s dĺžkou 2 až 6 nukleotidov, ktoré sú v ideálnom prípade roztrúsené po celom genóme približne v 10 cM intervaloch. Podobne je možné využiť aj minisatelity, tvorené sekvenciou s väčším počtom nukleotidov (10–100), ktoré sa tandemovo opakujú. Tieto sekvencie sa tak často označujú VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Najnovšie sa vo väzbových analýzach začali využívať jednonukleotidové polymorfizmy (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), čiže zámenny jedného nukleotidu. SNP sa v genóme vyskytujú veľmi často – možno ich nájsť v priemere každých 100–300 nukleotidov. Výsledky s použitím SNP naznačujú, že tento typ DNA markerov by mohol byť efektívnejší ako mikrosatelity [9]. Väzbová analýza za optimálnych podmienok zahŕňa stovky testovaných jedincov a stovky DNA markerov. Umožňuje identifikovať všetky lokusy s výrazným vplyvom na študovanú vlastnosť bez ohľadu na to, či je ich existencia vopred známa, nedokáže však identifikovať jednotlivé gény. Pri analýze kvantitatívnych znakov má väzbová analýza isté obmedzenia, najmä nízku citlivosť pre identifikáciu príslušných QTL a vyššiu pravdepodobnosť získania falošne negatívnych výsledkov [37]. Ďalšiu nevýhodu predstavuje limitovaný počet vhodných referenčných rodín.

Prvotné väzbové analýzy boli zamerané predovšetkým na hľadanie QTL pre BMD ako najexaktnejšie merateľného komponentu v súvislosti so vznikom osteoporózy. Príslušné QTL boli odhalené takmer na všetkých chromozómoch s výnimkou chromozómu Y [10–13]. Neskôr sa zistili QTL aj pre iné ukazovatele napríklad dĺžku kostí na chromozómoch 4p, 4q, 5q, 17q, 19p [14], alebo koncentráciu osteokalcínu na chromozómoch 16q, 20q [15]. Doposiaľ sú známe údaje z viac ako dvadsiatich väzbových analýz, v ktorých bolo odhalených viac ako 60 QTL, ovplyvňujúcich vznik osteoporózy [16,17]. Dvadsať QTL bolo opakovane potvrdených minimálne v dvoch analýzach: 1p36, 1q21–24, 2p21–24, 2q33–37, 3q12–26, 4p15–16, 4q31–34,

5q33–35, 6p21, 8q24, 10q26, 11q23–24, 12q23–24, 13q31–34, 14q12–24, 14q31–32, 16p13, 17p11–13, 19p13–q13, 21q22. Niektoré QTL vykazovali závislosť od pohlavia [8,18]. Napokon rozsiahla metaanalýza, zahŕňajúca výsledky deviatich väzbových štúdií (spolu takmer 12 000 jedincov), potvrdila QTL pre BMD na chromozómoch 1, 3, 5, 9, 11, 12, 14, 17 a na rozdiel od predchádzajúcich štúdií aj na chromozóme 18 [19].

Využitie experimentálnych zvierat ako genetických modelov pri štúdiu genetickej podmienenosti osteoporózy so sebou prináša niektoré výhody. Umožňuje prípravu línii s výraznými rozdielmi v sledovanom znaku a následnú realizáciu kríženia v rámci väzbovej analýzy. Nespornú výhodu predstavuje dostatočné množstvo jedincov, genetická homogenita a tiež eliminácia variability vo faktoroch prostredia. Na druhej strane aplikácia výsledkov, získaných na modelových organizmoch, v genetike človeka môže byť viac či menej limitovaná. Najčastejšie využívaným experimentálnym zvieratom pre väzbovú analýzu v súvislosti s geneticou podmienenosťou osteoporózy je myš, ktorej genóm vykazuje 75 % homológiu s ľudským genómom [17]. Na kríženie sa využívajú inbredné línie myší, výrazne sa odlišujúce v sledovanom znaku (napríklad myši s vysokou BMD a myši s nízkou BMD). Krížením takýchto línii vzniká F1 generácia, ktorá sa následne spätne kríži s niektorým z rodičov alebo medzi sebou do F2 generácie s vysokou variabilitou sledovaného znaku [20]. Uskutočnením väzbovej analýzy pri krížencoch je možné odhaliť príslušné QTL a porovnať ich s homologickými oblasťami genómu človeka.

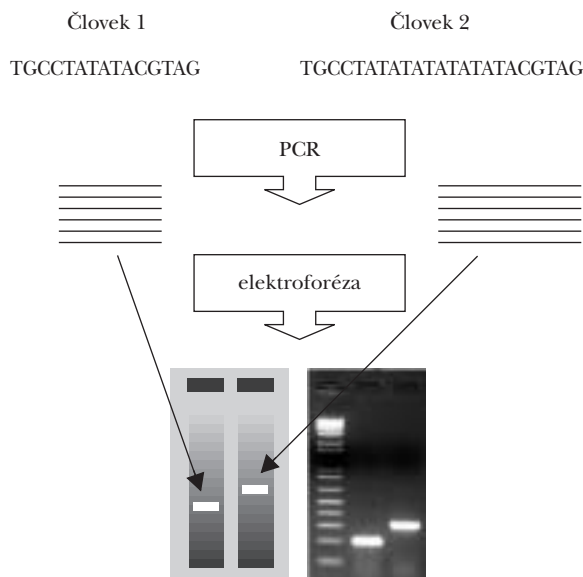
Doposiaľ najviac väzbových analýz odhalilo QTL pre BMD [21,22]. V jednom prípade boli výsledky zvlášť puzbudujúce, vzhľadom na objav Alox15 génu v jednom QTL [23,24]. Neskôr boli identifikované aj QTL pre štruktúrne ukazovatele kosti, dĺžku kosti, mechanické vlastnosti a biochemické markery [25,26].

Asociačná analýza zahŕňa štúdium tzv. kandidátskych génov, u ktorých sa na základe poznatkov z fyziológie človeka, prípadne iných vedných odborov, predpokladá vplyv na daný znak a v prípade odhalenia polymorfizmu sa zisťuje jeho podiel na variabilite znaku. Funkčné zmeny môžu zahŕňať napríklad sekvenčnú variabilitu v exónovej oblasti, vedúcu k zmene aminokyselinového zloženia proteínu. Genetická variabilita (polymorfizmus) v 5' oblasti génu môže spôsobiť rozdiely v expresii génu, ktoré sa prejavujú nižšou intenzitou transkripcie a teda nižším počtom molekúl vznikajúcej mRNA. Podobný vplyv môžu mať polymorfizmy v 3' oblasti génu, vedúce k rozdielom v degradácii mRNA. Pri vyššej intenzite degradácie sa počet molekúl mRNA znižuje. Asociačná analýza umožňuje hodnotenie väčšieho počtu jedincov a tým poskytuje štatisticky spoľahlivejšie výsledky. Výhodou je aj jednoduché uskutočnenie experimentu, resp. využitie rýchlych a relatívne jednoduchých metód. Na druhej strane je potrebný starostlivý výber jedincov a použitých štatistických metód. Nevýhodou predstavuje najmä variabilita vo faktoroch prostredia (napríklad výživa), genetická heterogenita a častokrát, najmä v podmienkach „malých“ výskumov, početne limitovaný súbor.

V súvislosti s osteoporózou bolo doposiaľ testované množstvo kandidátskych génov v rôznych populáciách, predovšetkým vo vzťahu k BMD a riziku fraktúr. Výskum sa

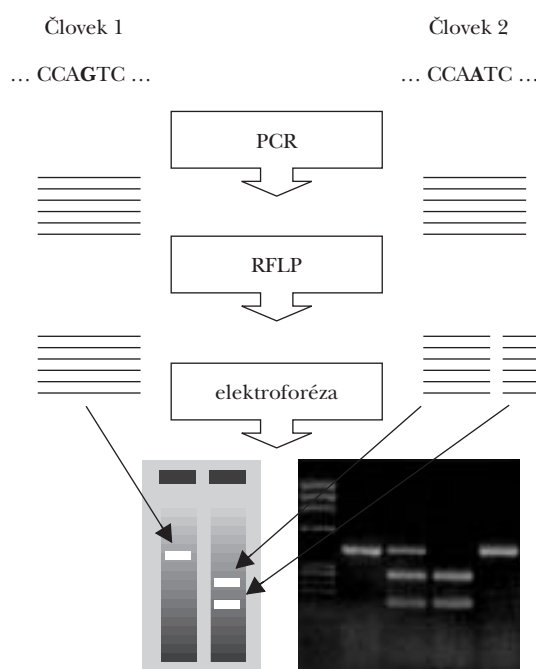
Obr. 3

Detekcia dĺžkového polymorfizmu pomocou metód PCR a elektroforézy. Úsek DNA s polymorfizmom sa namnoží pomocou PCR a produkty PCR sa následne separujú elektroforeticky. Rôzne genotypy sa odlišujú veľkosťou fragmentov (vzdialenosťou od štartu elektroforézy).



Obr. 4

Detekcia bodového polymorfizmu pomocou metód PCR, RFLP a elektroforézy. Úsek DNA s polymorfizmom sa namnoží pomocou PCR, produkty PCR sa následne štiepia restriktčným enzýmom a separujú elektroforeticky. Vzhľadom na prítomnosť štiepného miesta v prípade jedného genotypu a jeho neprítomnosť v prípade druhého genotypu, vznikajú rôzne veľké fragmenty DNA. Jednotlivé genotypy sa potom odlišujú veľkosťou fragmentov (vzdialenosťou od štartu elektroforézy) alebo ich rôznym počtom.



zameriava najmä na gény pre hormóny so vzťahom ku kosti a ich receptory, gény pre komponenty kostnej matrix a enzýmy kostného metabolizmu, gény pre cytokíny a ich receptory, gény pre regulačné faktory osteoblastov a osteoklastov a ďalšie proteíny, zasahujúce do metabolizmu kostného tkaniva. Medzi najvýznamnejšie gény, ktoré boli analyzované v najpočetnejších štúdiách a metaanalýzach, možno zaradiť gén pre receptor vitamínu D (VDR, [27,28]), gén pre kolagén typu I α I (COL1A1, [29]) alebo gén pre estrogénový receptor α (ESR1, [30]). Novšie výskumy zahŕňajú napríklad gén pre lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5, [31]), gén pre sklerostin (SOST, [32]), gén pre kalcitonínový receptor (CTR, [33]), gén pre transformačný rastový faktor β 1 (TGF β 1, [34]), gén pre kostný morfogénny

proteín 4 (BMP4, [35]), gén pre 17- β -hydroxylázu (CYP17, [36]) a mnoho ďalších [16,17,37]. Menšie štúdie niektorých kandidátskych génov boli uskutočnené aj v Českej republike a na Slovensku [38–43]. Vo viacerých štúdiách sa zistil významný vplyv génových interakcií na analyzované ukazovatele [44,45].

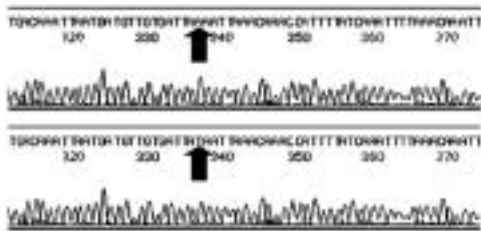
Využitie molekulárno-biologických metód

Klasické molekulárno-biologické postupy detekcie QTL, resp. kandidátskych génov sú vo väčšine prípadov založené na použití špecifických, rôzne označených sond – krátkych oligonukleotidov, komplementárnych k príslušnej sekvencii DNA – alebo na amplifikácii špecifického úseku DNA *in vitro* pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). V prvom prípade sa DNA, izolovaná napríklad z krvi jedinca, enzymaticky štiepi na kratšie úseky, ktoré sa od seba separujú podľa veľkosti elektroforézou, čiže pomocou elektrického prúdu v poréznom nosiči. Súbor separovaných fragmentov sa následne prenesie na membránu a nechá sa hybridizovať s príslušnou sondou. Miesto hybridizácie sondy s DNA je možné vizualizovať podľa typu označenia sondy, najčastejšie fluorescenčne. Jednotlivé genotypy môžeme potom rozlíšiť podľa polohy (vzdialenosti) jednotlivých fragmentov na membráne (obr. 1). V druhom prípade ide o namnoženie špecifickej sekvencie DNA do miliónov kópií pomocou PCR. PCR predstavuje v princípe jednoduchú, avšak veľmi účinnú metódu detekcie polymorfizmov najmä v kombinácii s ďalšími metódami. Jej princípom je cyklické striedanie troch krokov – denaturácie DNA (izolovanej napríklad z krvi), hybridizácie tzv. primerov (krátkych oligonukleotidov, vymedzujúcich amplifikovaný úsek DNA) a polymerizácie, čiže syntézy nových vlákien DNA. Uvedené kroky sa opakujú, pričom dochádza k zdvojnásobeniu počtu molekúl DNA v každom cykle (obr. 2). Produkty PCR sa následne rôzne analyzujú, v najjednoduchšom prípade sa separujú elektroforeticky a jednotlivé genotypy sa stanovujú na základe rôznej veľkosti fragmentov (obr. 3). V prípade, že v dôsledku polymorfizmu vzniká alebo zaniká cieľové miesto pre niektorú z restriktčných endonukleáz (enzýmy schopné štiepiť DNA v špecifických miestach), produkty PCR môžeme vystaviť pôsobeniu takéhoto enzýmu a až potom separovať elektroforeticky. Uvedená metóda sa nazýva RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Jednotlivé genotypy sa po separácii odlišujú v počte fragmentov alebo ich rôznej veľkosti (obr. 4). Detekciu polymorfizmov je možné uskutočniť aj sekvenovaním, čiže priamym stanovením poradia nukleotidov v DNA. Pre tento účel sa používajú automatizované prístroje – sekvenátory, ktoré najčastejšie kombinujú syntézu komplementárnych vlákien DNA k DNA analyzovaného jedinca a elektroforetickú separáciu v tenkých kapilárach. Jednotlivé genotypy je možné jednoducho určiť priamo z grafického výstupu sekvenačnej reakcie (obr. 5).

Veľmi perspektívnou oblasťou v rámci analýzy génov vo vzťahu k osteoporóze je štúdium génovej expresie. Kost predstavuje systém so špecifickým metabolizmom, čo je odrazom špecifických expresií rôznych génov, pôsobiacich v kostnom tkanive. Jednou z moderných metód analýzy génovej expresie (množstva a typu RNA) je real-time PCR, ktorá umožňuje veľmi presné stanovenie koncentrácie

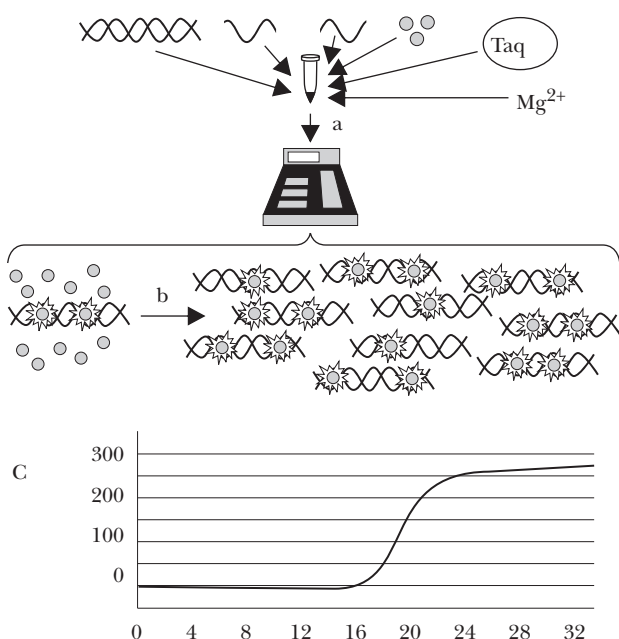
Obr. 5

Schéma záznamu zo sekvenovania úseku DNA s polymorfizmom. Šípky označujú polymorfizmus – zmenu A-T.



Obr. 6

Schéma real-time PCR. Všetky komponenty reakcie sa zmiešajú v skúmavke a umiestnia v programovateľnom prístroji – termocykleri (a), kde dochádza k namnoženiu špecifického úseku DNA. Počas syntézy sa do DNA inkorporuje fluorescenčná látka, ktorá po naviazaní na DNA fluoreskuje (b), výsledkom reakcie je signál v podobe špecifickej krivky (c).



mRNA konkrétného génu v rôznych typoch tkanív. Z príslušného tkaniva sa najskôr izoluje celková RNA, z ktorej sa časť, nesúca genetickú informáciu pre štruktúru polypeptidu (mRNA), následne enzymaticky „prepíše“ do komplementárnej DNA. Takáto DNA je potom využitá v real-time PCR na kvantifikáciu. V prípade real-time PCR ide o modifikovaný PCR, v ktorej je syntéza nových vlákien DNA sprevádzaná zvýšením fluorescence v reakčnej zmesi. V najjednoduchšom prípade (pri najjednoduchšom prevedení) sa do reakčnej zmesi pridá fluorescenčná látka, ktorá fluoreskuje po naviazaní na DNA. So syntézou DNA rastie aj fluorescenčný signál v podobe špecifickej krivky, z ktorej je možné aproximovať počítačový počet molekúl DNA (obr. 6).

Doposiaľ je známych len niekoľko štúdií, porovnávajúcich génovú expresiu v osteoporotickom a neosteoporotickom kostnom tkanive najmä vo vzťahu k expresii cytokínov [46], alebo analyzujúcich monocytov vo vzťahu k patofyziológii osteoporózy [47].

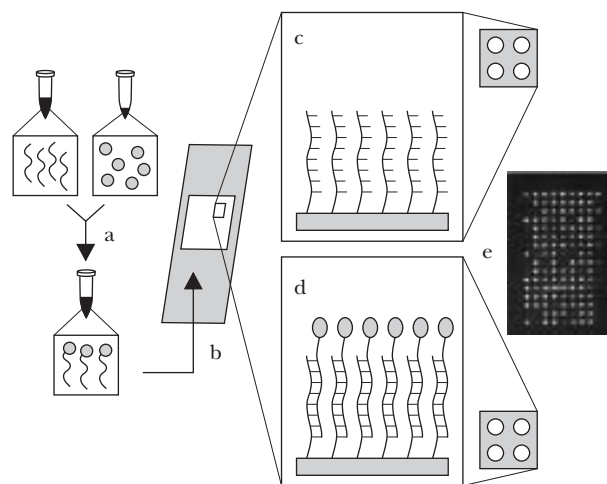
Najnovšie postupy analýzy génov a tiež ich expresií využívajú technológiu DNA čipov (tzv. microarrays). DNA čip obsahuje množstvo špecifických oligonukleotidových sond na malej ploche, ktoré sú komplementárne k špecifickým úsekom analyzovanej DNA. V jednoduchšom prevedení je možné DNA čip využiť na detekciu polymorfizmov v DNA – vtedy čip obsahuje sondy komplementárne k jednotlivým alelám. Izolovaná DNA jedinka sa najskôr fluorescenčne označí a nechá sa hybridizovať so sondami na čipe. V prítomnosti konkrétnej alely dôjde k hybridizácii DNA s príslušnými sondami na čipe, čím v mieste hybridizácie vzniká, vzhľadom na značenie DNA, fluorescenčný signál. Jednotlivé signály sa detegujú špeciálnym skenerom a vyhodnocujú pomocou počítača. V prípade analýzy génových expresií sú sondy na čipe komplementárne k špecifickým častiam analyzovaných génov, resp. sekvencií (obr. 7). Touto technikou je možné porovnať úroveň expresie analyzovaných génov s génmi, ktoré sa exprimujú konštantne vo všetkých tkanivách (tzv. „housekeeping“ gény) a úroveň ich expresie je známa. Ďalšiu možnosť predstavuje porovnanie expresie génov v dvoch rôznych vzorkách, napríklad zo „zdravého“ tkaniva a tkaniva postihnutého študovaným ochorením. Vzorky nukleovej kyseliny z obidvoch zdrojov sa v takomto prípade odlišne fluorescenčne označia a po hybridizácii na čipe sa porovnáva intenzita jednotlivých signálov. Týmto spôsobom je možné zistiť, ktoré gény majú vyššiu, resp. nižšiu úroveň expresie v študovanom tkanive oproti kontrole.

Technika DNA čipov umožňuje realizovať veľké množstvo reakcií, čiže analyzovať rádovo tisíce génov súčasne v jednej vzorke. Navyše, vyhodnotením analýz mnohých génov súčasne je možné určiť interakcie génov, príp. ich reguláciu. Istú nevýhodu čipovej analýzy predstavuje pomerne finančne náročné prístrojové vybavenie. Okrem toho v mnohých prípadoch vznikajú ťažkosti s interpretáciou výsledkov analýzy. Napriek tomu je čipová analýza veľmi perspektívnou metódou.

Väčšina analýz rôznych ochorení, súvisiacich s kostným tkanivom, využíva tkanivové kultúry ľudských a myšiek bunkových línií [48]. Väčšinou sú zamerané na štúdium génovej expresie v procese diferenciácie osteoblastov [49].

Obr. 7

Schéma DNA čipovej analýzy. Analyzovaná DNA sa fluorescenčne označí (a) a nechá sa hybridizovať so sondami na čipe (b). Ak žiadny úsek DNA nie je komplementárny k sekvencii sondy, nukleová kyselina sa nenaviaže (c). V prípade komplementarity dochádza k naviazaniu označenej nukleovej kyseliny na príslušné sondy, čo sa prejaví fluorescenčným signálom (d). Jednotlivé genotypy sú vyhodnotené počítačom na základe skenovania fluorescenčného signálu (e). V rámčekoch je znázornená molekulárna úroveň jednotlivých procesov.



Záver

Pred viac ako desiatimi rokmi, kedy na základe práce Morrisona et al. [27] vo svete začal intenzívny výskum genetickej podmienosti osteoporózy, sa zdalo, že genetické predispozície pre vznik tohto ochorenia by mohli byť podmienené niekoľkými génmi s veľkým účinkom. Počiatočné výsledky povzbudzovali k ideám využiť tieto gény pre terapeutické ciele ako aj pre hodnotenie rizika vzniku osteoporózy. V súčasnosti je jasné, že genetická podmienosť osteoporózy je sprostredkovaná veľkým počtom génov s rôznymi účinkami a interakciami. Mnohé oblasti genómu i samotné gény už boli odhalené, väčšinu z nich však bude potrebné overiť v rozsiahlejších štúdiách a na identifikácii ďalších, ovplyvňujúcich najmä ukazovatele asociované s osteoporózou (napríklad riziko fraktúr), sa tiež intenzívne pracuje. Nové molekulárno-biologické metódy v súčasnosti poskytujú oveľa väčšie možnosti pre vytvorenie komplexného pohľadu na genetickú podmienosť osteoporózy ako kedykoľvek predtým, čo by v budúcnosti mohlo viesť k oveľa širším možnostiam jej liečby.

Práca vznikla s podporou grantov KEGA 3/3040/05, ASO SK-05/06-BA-016, KEGA 3/4040/06 a KEGA 3/4032/06.

Všetky obrázky použité v príspevku sú originálne zhotovené autormi.

Literatúra

1. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: A study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res* 1996;11:530–534.
2. Ng MY, Sham PC, Paterson AD, Chan V, Kung AV. Effect of environmental factors and gender on the heritability of bone mineral density and bone size. *Ann Hum Genet* 2006;70:428–38.

3. Hunter D, de Lange M, Snieder H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker RV, Spector TD. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *J Bone Miner Res* 2001;16:371–378.
4. Kaprio J, Rimpela A, Winter T, Viken RJ, Rimpela M, Rose RJ. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol* 1995;67:739–753.
5. Andrew T, Antoniadou L, Scurrah KJ, MacGregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. *J Bone Miner Res* 2005;20:67–74.
6. Michaelsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlborn A, Pedersen NL. Genetic liability to fractures in the elderly. *Arch Intern Med* 2005;165:1825–30.
7. Balemans W, Van Wesenbeeck L, Van Hul W. A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcif. Tissue Int* 2005;77:263–274.
8. Ralston SH. Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:475–479.
9. Sawcer SJ, Maranian M, Singlehurst S, Yeo T, Compston A, Daly MJ, De Jager PL, Gabriel S, Hafler DA, Ivinson AJ, Lander ES, Rioux JD, Walsh E, Gregory SG, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Barcellos L, Hauser SL, Oksenberg JR, Kenealy SJ, Haines JL. Enhancing linkage analysis of complex disorders: An evaluation of high-density genotyping. *Hum Mol Genet* 2004;13:1943–1949.
10. Karasik D, Myers RH, Cupples LA, Hannan MT, Gagnon DR, Herbert A, Kiel DP. Genome screen for quantitative trait loci contributing to normal variation in bone mineral density: the Framingham Study. *J Bone Miner Res* 2002;17:1718–27.
11. Peacock M, Koller DL, Hui S, Johnston CC, Foroud T, Econs MJ. Peak bone mineral density at the hip is linked to chromosomes 14q and 15q. *Osteoporos Int* 2004;15:489–96.
12. Xiao P, Shen H, Guo YF, Xiong DH, Liu YZ, Liu YJ, Zhao LJ, Long JR, Guo Y, Recker RR, Deng HW. Genomic regions identified for BMD in a large sample including epistatic interactions and gender-specific effects. *J Bone Miner Res* 2006;21:1536–44.
13. Hsu YH, Xu X, Terwedow HA, Niu T, Hong X, Wu D, Wang L, Brain JD, Bouxsein ML, Cummings SR, Rosen CJ, Xu X. Large-Scale Genome-Wide Linkage Analysis for Loci Linked to BMD at Different Skeletal Sites in Extreme Selected Sibships. *J Bone Miner Res* 2007;22:184–94.
14. Xu FH, Liu YJ, Deng H, Huang QY, Zhao LJ, Shen H, Liu YZ, Dvornyk V, Conway T, Li JL, Davies KM, Recker RR, Deng HW. A follow-up linkage study for bone size variation in an extended sample. *Bone* 2004;35:777–84.
15. Mitchell BD, Cole SA, Bauer RL, Iturria SJ, Rodriguez EA, Blangero J, MacCluer JW, Hixson JE. Genes influencing variation in serum osteocalcin concentrations are linked to markers on chromosomes 16q and 20q. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1362–6.
16. Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol* 2003;177:147–96.
17. Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH, Recker RR, Deng HW. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. *J Bone Miner Res* 2006;21:1511–35.
18. Peacock M, Koller DL, Lai D, Hui S, Foroud T, Econs MJ. Sex-specific quantitative trait loci contribute to normal variation in bone structure at the proximal femur in men. *Bone* 2005;37:467–73.
19. Ioannidis JP, Ng MY, Sham PC, Zintzaras E, Lewis CM, Deng HW, Econs MJ, Karasik D, Devoto M, Kammerer CM, Spector T, Andrew T, Cupples LA, Duncan EL, Foroud T, Kiel DP, Koller D, Langdahl B, Mitchell BD, Peacock M, Recker R, Shen H, Sol-Church K, Spotila LD, Uitterlinden AG, Wilson SG, Kung AW, Ralston SH. Meta-analysis of genome-wide scans provides evidence for sex- and site-specific regulation of bone mass. *J Bone Miner Res* 2007;22:173–83.
20. Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol* 2000;166:235–45.
21. Klein OF, Carlos AS, Vartanian KA, Chambers VK, Turner EJ, Phillips TJ, Belknap JK, Orwoll ES. Confirmation and fine mapping of chromosomal regions influencing peak bone mass in mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:1953–61.
22. Koller DL, Schrieffer J, Sun Q, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Foroud T, Beamer WG, Turner CH. Genetic effects for femoral biomechanics, structure, and density in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred mouse strains. *J Bone Miner Res* 2003;18:1758–65.
23. Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G, Orwoll ES. Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene Alox15. *Science* 2004;303:229–232.
24. Ichikawa S, Koller DL, Johnson ML, Lai D, Xuei X, Edenberg HJ, Klein RF, Orwoll ES, Hui SL, Foroud TM, Peacock M, Econs MJ. Human ALOX12, but not ALOX15, is associated with BMD in white men and women. *J Bone Miner Res* 2006;21:556–564.
25. Volkman SK, Galecki AT, Burke DT, Miller RA, Goldstein SA. Quantitative trait loci that modulate femoral mechanical properties in a genetically heterogeneous mouse population. *J Bone Miner Res* 2004;19:1497–505.
26. Bouxsein ML, Uchiyama T, Rosen CJ, Shultz KL, Donahue LR, Turner CH, Sen S, Churchill GA, Muller R, Beamer WG. Mapping quantitative trait loci for vertebral trabecular bone volume fraction and microarchitecture in mice. *J Bone Miner Res* 2004;19:587–99.
27. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly P, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284–287.
28. Thakkinian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004;19:419–28.
29. 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; GENOMOS Investigators. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: The GENOMOS study. *PLoS Med* 2006;3:e90.
30. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;15:307–20.
31. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hagens W, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. 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* 2006;21:141–150.
32. 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. Polymorphisms in the sclerosteosis/ van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am J Hum Genet* 2004;75:1032–1045.
33. Masi L, Becherini L, Colli E, Gennari L, Mansani R, Falchetti A, Becorpi AM, Cepollaro C, Gonnelli S, Tanini A, Brandi ML. Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;9:190–5.
34. Langdahl BL, Carstens M, Stenkaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the transforming growth factor α 1 gene and osteoporosis. *Bone* 2003;32:297–310.
35. Ramesh BL, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Devine A, Prince RL. Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone* 2005;36:555–561.
36. Somner J, McLellan S, Cheung J, Mak YT, Frost ML, Knapp KM, Wierzbicki AS, Wheeler M, Fogelman I, Ralston SH, Hampson GN. Polymorphisms in the P450 c17 (17-hydroxylase/17,20-Lyase) and P450 c19 (aromatase) genes: association with serum sex steroid concentrations and bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:344–51.
37. Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 2006;15:2492–506.
38. Zofkova I, Hill M, Zajickova K. Association of C/T polymorphism in the LRP5 gene with circulating follicle stimulating hormone in white postmenopausal women. *Physiol Res* 2006;6 (v tlači)
39. Zofkova I, Zajickova K, Hill M, Vankova M. Role of intron 5 C/T polymorphism of the calcium sensing receptor gene in the regulation of the serum FSH and LH in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2005;28:638–42.
40. Zajickova K, Zofkova I, Hill M. Vitamin D receptor polymorphisms, bone ultrasound and mineral density in post-menopausal women. *Aging Clin Exp Res* 2005;17:121–4.
41. Weichetova M, Bohuslavova R, Skodova Z, J J, Adamkova V. No associations between genetic polymorphisms of TGF β s, PAI-1, and COL1A1, and bone mineral density in Caucasian females. *Endocr Regul* 2006;40:107–12.
42. Omelka R, Martiniaková M, Krajčovičová V, Galbavý D, Bauerová M. Variability in the ESR and CALCR genes in Slovak postmenopausal women and its associations with bone mineral density, bone-related biochemical markers and fracture incidence. *Am J Phys Anthropol* 2007 (v tlači)
43. Omelka R, Krajčovičová V, Galbavý D, Martiniaková M, Bauerová M. Effects of the estrogen receptor, calcitonin receptor and osteoprotegerin genes on bone mineral density, bone-related biochemical markers and fracture incidence in Slovak postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2007 (v tlači)
44. Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type I α 1 gene in susceptibility to fracture. *J Bone Miner Res* 2001;16:379–85.
45. Rivadeneira F, van Meurs JB, Kant J, Zillikens MC, Stolk L, Beck TJ, Arp P, Schuit SC, Hofman A, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in interaction with estrogen receptor alpha (ESR1) and insulin-like growth factor I (IGF1) variants influence the risk of fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2006;21:1443–56.
46. Walsh CA, Birch MA, Fraser WD, Ginty AF, Gallagher JA. Cytokine expression by cultured osteoblasts from patients with osteoporotic fractures. *Int J Exp Pathol* 2000;81:159–63.
47. Liu YZ, Dvornyk V, Lu Y, Shen H, Lappe JM, Recker RR, Deng HW. A novel pathophysiological mechanism for osteoporosis suggested by an in vivo gene expression study of circulating monocytes. *J Biol Chem* 2005;12:29011–6.
48. Dvornyk V, Recker RR, Deng HW. Gene expression studies of osteoporosis: implications for microarray research. *Osteoporos Int* 2003;14:451–61.
49. Power RA, Iwaniec UT, Wronski TJ. Changes in gene expression associated with the bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in aged ovariectomized rats. *Bone* 2002;31:143–8.