



Osteoporoz Epigenetiği

Epigenetics of Osteoporosis

İD Şengül Tural, İD Esra Tekcan*, İD Ercan Tural**

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Laboratuvarı, Samsun, Türkiye

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Samsun Türkiye

Öz

Osteoporoz (OP), düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikromimarisinin bozulması, bunun sonucunda kemik kırılabilirliğinde ve kırılma eğiliminde artış ile karakterize sistemik bir hastalıktır. Prenatal dönem dahil olmak üzere yaşamın erken dönemindeki çevresel faktörler, yaşamın sonraki dönemlerinde kemik kütlesini ve dolayısıyla OP riskini etkileyebilir. Epigenetik esas olarak transkripsiyon sonrası düzenleyici bir rol oynar ve biyolojik sinyal düzenleyici yolda önemli işlevlere sahiptir. Epigenetik mekanizmalar, kemik oluşumu ve kemik erimesinden sorumlu olan kemik hücrelerinin, osteoblastların ve osteoklastların farklılaşmasında önemli rol oynar. Birkaç çalışma, OP'lu hastalarda bazı farklı şekilde metillenmiş genler göstermiştir. Anormal epigenetik düzenleme, OP gibi bir dizi kemik metabolizması ile ilgili hastalığa yol açabilir. Bunlar, osteoblast farklılaşmasının önemli bir düzenleyicisi olan *Wnt* yoluna ait genleri ve iskeletin gelişiminde rol oynayan diğer genleri içerir. Benzer şekilde, bu hastalarda bazı MikroRNA'lar farklı şekilde eksprese edilebilir. Ancak, bu sonuçların diğer kohortlarda tekrarlanması önerilmektedir. Genomdan farklı olarak, epigenom hücreye özgüdür ve yaşlanma ve çevresel faktörlerle değişir. Bu nedenle, epigenetik epidemiyoloji çalışmalarının tasarımı ve yorumlanması birtakım pratik zorluklar doğurmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, kemik oluşumu ve kemik erimesinden sorumlu olan kemik hücrelerinin, osteoblastların ve osteoklastların farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır.

Anahtar kelimeler: Osteoporoz, epigenetik, menopoz sonrası kadınlar

Abstract

Osteoporosis (OP) is a systemic disease characterized by low bone mass and deterioration of the microarchitecture of bone tissue, resulting in increased bone fragility and fracture tendency. Environmental factors early in life, including the prenatal period, can affect bone mass later in life and thus the risk of OP. Epigenetics mainly plays a post-transcriptional regulatory role and has important functions in the biological signal-regulatory pathway. Epigenetic mechanisms play an important role in the differentiation of bone cells, osteoblasts, and osteoclasts, which are responsible for bone formation and bone resorption. Several studies have shown some differentially methylated genes in patients with OP. The abnormal epigenetic regulation can lead to a number of bone metabolism-related diseases such as OP. These include genes for the *Wnt* pathway, an important regulator of osteoblast differentiation, and other genes involved in skeletal development. Similarly, some MicroRNA's may be differentially expressed in these patients. However, it is recommended that these results should be replicated in other cohorts. Unlike the genome, the epigenome is cell-specific and changes with aging and environmental factors. Therefore, the design and interpretation of epigenetic epidemiology studies pose a number of practical challenges. Epigenetic mechanisms play an important role in the differentiation of bone cells, osteoblasts, and osteoclasts, which are responsible for bone formation and bone resorption.

Keywords: Osteoporosis, epigenetics, postmenopausal women

Giriş

Osteoporoz (OP), azalmış kemik kütlesi ve kemik dokusunun bozulması ile karakterizedir, bu da kemik gücünde azalmaya ve kırılma eğilimine yol açar. Menopoz sonrası kadınların üçte birinden fazlasını ve 60 yaş üstü erkeklerin %10-16'sını etkileyen yaygın bir hastalıktır (1,2). Kemik kütlesi birikimi intrauterin yaşamda başlar ve büyüme periyodu boyunca devam eder,

böylece kemik kütlesi insanlarda yaşamın üçüncü on yılında zirveye ulaşır. Birkaç yıl stabil kaldıktan sonra, kemik kütlesi menopozu takip eden 5-10 yıl içinde kadınlarda hızlanan ilerleyici bir düşüşe başlar. Bu nedenle OP, büyüme periyodu sırasında yetersiz kemik birikiminden ve/veya doruk kemik kütlesine ulaşıldıktan sonra hızlanan kemik kaybindan kaynaklanabilir (3,4). Kemik mineral yoğunluğunu (KMY) birçok çevresel faktör etkilemekle birlikte, çeşitli ikiz ve aile çalışmaları kemik oluşumunda genetik

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Doç. Dr. Şengül Tural, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Tel.: +90 362 312 19 19-2846 E-posta: stural@omu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-8946-8165

Geliş Tarihi/Received: 05.03.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 09.06.2022

©Telif Hakkı 2023 Türkiye Osteoporoz Derneği /Türk Osteoporoz Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır. CC BY-NC-ND tarafından lisanslanmıştır.

faktörlerin etkisinin %50-80 olduğunu göstermektedir. Kemik kütlesini etkileyen birçok genin varlığı bildirilmiştir. Asosiyasyon çalışmaları, aday gen polimorfizmleri, meta-analizler ve daha yeni olan genom çaplı çalışmalar ile KMY ve OP fenotipiyle ilişkili diğer genler belirlenmiştir. Epigenetik mekanizmaların kemik metabolizmasının düzenlenmesindeki önemli rolü göz önüne alındığında, osteojenik farklılaşmadaki epigenetik mekanizmalar (DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlayıcı olmayan RNA'lar) OP'nin patogenezi konusunda kemik metabolizması ile ilişkili hastalıkların tedavisi için yol gösterici olacaktır.

DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardan biridir (5). Palindromik sitozin-fosfat-guanin (CpG) dinükleotitlerinde sitozinin 5' pozisyonuna kovalent olarak bağlı bir metil grubundan oluşur, 5mC olarak kısaltılır. CpG dinükleotitleri seyrek olarak meydana gelir, memeli genomunun sadece %2'si, esas olarak gen promotörleri ve düzenleyici bölgeler ile ilişkili olan CpG adacıkları olarak adlandırılan kısa yüksek frekanslı CpG uzantıları içerir (5). Metil gruplarının sitozine eklenmesi, DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından katalize edilir. Metilasyon sonucu, temel transkripsiyon faktörlerinin hedeflerine bağlanmasını doğrudan veya dolaylı olarak bloke ederek aracılık edebilen transkripsiyonel baskılamadır. Bununla birlikte, *in vivo* erken oluşturulan DNA metilasyon paterni genellikle dış çevreden etkilenir ve küçük farklılıklar, malign olmayan hastalıkların başlangıcıyla bağlantılı fenotip çeşitliliği üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir (5). DNMT'ler embriyogenez, gelişim ve metilasyon süreçlerinde önemli rol oynar. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda genom stabilitesi, gen ekspresyonu bireysel gelişimde önemlidir

(6,7). DNA metilasyonunun modifikasyonları esas olarak DNMT ailesi proteinleri tarafından kontrol edilir ve CpG adalarındaki sitozin kalıntıları için metil donörü olarak S-adenosilmetiyonin kullanılır (8). Normalde genlerdeki CpG adaları metillenmemiş halde bulunur ve bu adalardaki sitozinlerin metilasyonu genin ekspresyonunu engelleyebilir (9). Belirli bir hipometilasyon durumu, ilgili genlerin ekspresyonuna elverişliyen, hipermetilasyon durumu, gen sessizleşmesine yol açabilir (8). Bu alanda giderek artan çalışmalar, DNA metilasyonunun, OP patomekanizmasında önemli bir rol oynadığı, osteoblastların ve osteoklastların farklılaşmasını ve apoptozunu düzenleyebileceğini göstermiştir (7). DNA metilasyon modifikasyonu ile düzenlenen osteojenik farklılaşma belirteçleri Tablo 1'de görülmektedir (Tablo 1).

Histon Modifikasyonu

Beş tipi (H1, H2A, H2B, H3 ve H4) bulunan histonlar, pozitif yüklü bazik amino asitler (arginin ve lizin) bakımından zengin ve DNA'daki negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girebilen küçük moleküllü proteinlerdir. Histon kimyasal modifikasyonu, proteinin N-terminal kuyruğunda, özellikle H3 ve H4 bölgesinde meydana gelir ve kromatinde değişikliklere neden olur. Histon kuyruğu 20 amino asitten oluşur ve belirli bir hipometilasyon durumu, ilgili genlerin ekspresyonuna elverişliyen, bir hipermetilasyon durumu gen sessizleşmesine yol açabilir (8). Artan çalışmalar, DNA metilasyonunun, OP'nin patomekanizmasında önemli bir rol oynadığı ve osteoblastların ve osteoklastların farklılaşmasını ve apoptozunu düzenleyebileceğini göstermiştir (7). Nükleozom, birkaç histon alt biriminden oluşan bir kompleks olup, DNA'yı ve epigenetik bilgiyi korur. Histonların transkripsiyon sonrası modifikasyonu önemli bir adımdır. Yeniden katlanan

Tablo 1. DNA metilasyon modifikasyonu ile düzenlenen osteojenik farklılaşma belirteçleri

Genler	Metilasyon seviyesi	Osteopeneziste gen fonksiyonu	Referans
<i>RUNX2</i>	Düşük	TF, hedef genlerin ekspresyonunu ve osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(10)
<i>OSX</i>	Düşük	TF, hedef genlerin ekspresyonunu ve osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(10)
<i>BMP2</i>	Düşük	Kemik büyüme faktörü, osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(11)
<i>SOST</i>	Yüksek	Glikoprotein, osteojenik farklılaşmayı inhibe eder.	(12)
<i>ALP</i>	Düşük	Hidroksiapatit birikimi için gerekli fosforik asidi sağlamak üzere fosfat esteri hidrolize edin ve aynı zamanda kemik tuzu oluşumu üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmak için pirofosfatı hidrolize eder.	(13)
<i>OCN</i>	Düşük	Normal kemik mineralizasyonunu korur.	(13)
<i>Frizzled1</i>	Düşük	<i>Wnt</i> yolunu aktive eder ve osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(14)
<i>RANKL</i>	Yüksek	Osteoklast farklılaşmasını uyarır ve kemik rezorpsiyonunu destekler.	(15)
<i>OPG</i>	Düşük	Osteoklast farklılaşmasını inhibe eder.	(16)
<i>LOX</i>	Düşük	Osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(17)
<i>ESR1</i>	Düşük	Osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(18)
<i>DLX5</i>	Düşük	Osteojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(19)
<i>Alu elements</i>	Yüksek	Kemik oluşumu ile negatif korelasyon	(20)

RUNX2: Runt-related transcription factor 2, OSX: Osterix, BMP2: Kemik morfojenik proteini-2, SOST: Sklerostin, ALP: Alkalen fosfataz, OCN: Osteokalsin, RANKL: Nükleer faktör kappa-β ligandının reseptör aktivatörü, OPG: Osteoprotegerin, LOX: Lizil oksidaz, ESR1: Östrojen reseptörü 1, DLX5: Distal-Less homeobox 5

kovalent histon modifikasyonları, çoğunlukla kimyasal olarak kararsız amino asit kalıntılarının (örneğin; lizin, arginin, serin, treonin, tirozin ve histidin) amino ve karboksil uçlarında ve ayrıca histonun versiyonu sırasında veya nükleozomal çekirdeklerin kor alanlarında meydana gelir (21). Her modifiye edilmiş histon kalıntısı spesifik bilgi taşıyıcı ve genel olarak H3K3 bölgesindedir. Bilgi iletimi, histonların kendi aralarındaki veya histonlar ile DNA arasındaki etkileşimi değiştirmek dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla olabilir (22). Histon deasetilazlar, hedef histonlar ve osteoblast farklılaşmasındaki rolleri Tablo 2’de görülmektedir. Histon deasetilazlar, hedef histonlar ve osteoblast farklılaşmasındaki rolleri Tablo 3’te görülmektedir.

Kodlamayan RNA’lar

Kodlamayan RNA, genomdan kopyalanan ancak bir proteini kodlamayan bir RNA türüdür (41). RNA’nın uzunluğuna göre, kodlama yapmayan RNA üç tipe ayrılır: Bunlardan ilki

mikroRNA’lar dahil 50 nt’den az uzunlukta mikroRNA’lar (miRNA), küçük enterferans yapan RNA’lar siRNA ve yeni kodlamayan küçük RNA’lar priRNA; ikincisi ribozomal RNA ve transfer RNA dahil olmak üzere 50 ila 500 nt arasında değişen uzunlukta dardır; ve üçüncüsü geleneksel lineer RNA’dan farklı olan uzun kodlayıcı olmayan RNA’lar lncRNA ve dairesel RNA’lar circRNA dahil olmak üzere çeşitlidir (42,43). Geçmişte, bilim adamları genellikle kodlamayan RNA’nın rolünü “önemsiz RNA” olarak gördüler. Bilimsel düşünce ve laboratuvar teknolojisinin ilerlemesiyle, artan sayıda çalışma, kodlamayan RNA’nın anormal ifadesi ile kemik metabolik hastalıklarının gelişimi arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir (7,43). Kodlamayan RNA’nın kemik metabolizması sürecindeki anahtar rolü belirlenirse, kemik metabolizmasıyla ilişkili hastalıkları temelde bloke etmesi ve tedavi etmesi beklenen hedefe yönelik tedavi için ilaçlar tasarlanabileceği öne sürülmektedir. lncRNA’lar hedef genleri ve fonksiyonları Tablo 4’te görülmektedir.

Tablo 2. Histon deasetilazlar, hedef histonlar ve osteoblast farklılaşmasındaki rolleri

HDAC	Hedef histonlar	Fonksiyon	Referans
HDAC1	H2A, H2B, H3, H4		(23)
HDAC2	H2A, H2B, H3, H4	Osteoblast farklılaşmasını düzenler.	(23)
HDAC3	H2A, H2B, H3K27, H3, H4	Osteoblast gen ekspresyonunu inhibe eder.	(24)
HDAC4	H2A, H2B, H3K9, H3, H4	Kondrositlerin transkripsiyonunu, hipertrofisini ve kemikleşmesini düzenler.	(25)
HDAC5	H2A, H2B, H3K9, H3, H4	Kondrositlerin transkripsiyonunu, hipertrofisini ve kemikleşmesini düzenler.	(25)
HDAC6	H2A, H2B, H3K9, H3, H4	RUNX2 aktivitesini ve gen ekspresyonunu düzenler.	(26)
HDAC7	H2A, H2B, H3K9, H3, H4	Osteoblast gen ekspresyonunu inhibe eder.	(27)
HDAC8	H2A, H2B, H3K9, H3, H4	Maksillofasiyal kemik gelişimi	(28)
SIRT1	H3, H4	BMMSC’lerin çoğalmasını ve osteoblast farklılaşmasını düzenler.	(29)
SIRT6	H3, H4, H3K9, H3K56	Kondrosit proliferasyonunu düzenler.	(30)

BMMSC: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Tablo 3. Histon deasetilazlar, hedef histonlar ve osteoblast farklılaşmasındaki rolleri

HDM	Hedef histonlar	Hedef genler	Fonksiyon	Referans
LSD1/KDM1A	H3K4me3	<i>Wnt7B, BMP2</i>	Osteoblast farklılaşmasını inhibe eder.	(31)
KDM2B	H3K4me3, H3K36me1/2	<i>AP-2a</i>	Erken ve geç ameloblast hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra dentinin farklılaşmasında yer alır.	(32)
KDM4A	H3K9me3	<i>Sfrp4, C/EBPa</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder ve kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını inhibe eder.	(33)
KDM4B	H3K9me3, H3K27me3	<i>DLX</i>	Osteoblast farklılaşmasını teşvik eder.	(34)
KDM5A	H3K4me3	<i>BMP2, RUNX2</i>	Osteoblast farklılaşmasını inhibe eder.	(35)
JMJD3/KDM6B	H3K9me3, H3K27me3/2	<i>HOX</i>	Osteoblast farklılaşmasını teşvik eder.	(36)
KDM7A	H3K9me2, H3K27me2	<i>C/EBPa, Wnt pathway</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder ve osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(37)
NO66	H3K4, H3K36	<i>OSX</i>	Osteoblast farklılaşmasını inhibe eder.	(38)
RBP2/JARID1A	H3K4me3/2	<i>RUNX2</i>	Osteoblast farklılaşmasını inhibe eder.	(39)
JMJD7	-	<i>c-fos, Dc-stamp, CtsK, Acp5 and Nfatc1</i>	Osteoblast farklılaşmasını inhibe eder.	(40)

Mikro RNA'lar

MiRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, kodlama yapmayan küçük, tek sarmallı bir RNA türüdür. Hedef gen mRNA'sına diziyeye özgü baz eşleştirmesi yoluyla bağlanır (7). miRNA'lar, osteojenik farklılaşma ile ilgili hedef genleri düzenleyerek kemik metabolizmasını düzenlediği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Bazı önemli miRNA'lar ve etkileri Tablo 5'te görülmektedir.

Yetersiz Pik Kemik Kütlesi

OP genç bireylerde nadirdir. Aslında, yetersiz bir tepe kemik kütlesine sahip bireyler bile büyüme döneminde yetersiz kemik kütlesi birikimi nedeniyle nadiren OP'ye bağlı kırıklara maruz kalır. Bununla birlikte, bu bireyler daha sonraki yaşamlarında kırıklar için yüksek risk altındadır, çünkü zaten düşük bir kemik kütlesi üzerine bindirilmiş yaşa bağlı azalan kemik kütlesi kırık eşliğini düşürür (62). Doruk kemik kütlesinin güçlü bir genetik

bileşene sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, çeşitli etnik kökenlere sahip ebeveynlerin kemik kütleleri ile çocukları arasında doğrudan korelasyonlar bildirilmiştir (63,64). Bununla birlikte, kemik kütlesi üzerindeki kalıtsal etkiyi açıklayan genler tam olarak aydınlatılmamıştır. *Wnt* ailesinin üyeleri de dahil olmak üzere bazı genlerin genç bireylerde kemik kütlesi ile ilişkili olduğu tutarlı bir şekilde tanımlanmıştır (65). Bir dizi edinilmiş faktörün büyüyen iskelet üzerinde derin etkileri vardır. Besin faktörlerini, egzersizi, komorbid bozuklukları vb. içerirler. Rahim içinde veya doğumdan sonra etki edebilirler. Aslında, daha sonraki yıllarda rahim içi büyüme ile kemik kütlesi arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar vardır (66,67). Örneğin; gözlemsel bir meta-analiz çalışması, doğum ağırlığı ile yaşamın sonraki dönemlerindeki kemik kütlesi arasında bir ilişki bildirmiştir. Doğum ağırlığı, KMY'den daha çok kemik mineral içeriği ile ilişkili bulunmuştur (68). Bu, ilişkinin tercihen kemik yoğunluğundan ziyade doğum ağırlığının gelecekteki kemik boyutu ile bir korelasyonu

Tablo 4. LncRNA'lar hedef genleri ve fonksiyonları

LncRNA'lar	Hedef genler	Fonksiyonlar	Referans
H19	<i>miR-675, miR-141, miR-22,</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(42)
	<i>CTCF/H19/HDAC pathway</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(43)
LncRNA	<i>p21 Wnt/β-actin pathway</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(44)
Bmcob	<i>SBP2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(31)
HIF1α-AS1	<i>HOXD10, SIRT1</i>	İnhibisyon	(45)
LncRNA TUG1	<i>Wnt/β-actin pathway</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(46)
XR-111050	<i>RUNX2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(47)
DNACR	<i>P38 MAPK pathway</i>	Osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(48)
AK-096529, uc003ups, AK05611	<i>Smurf1, RUNX2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(45)
HOTAIR	<i>BMP/TGF-β pathway</i>	Osteoblastik farklılaşmayı iteşvik eder.	(49)
lncRNA MALAT1	<i>RANK/RANKL/OPG pathway</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(50)
MODR	<i>MiR-454/RUNX2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(51)
AK141205	<i>CXCL13</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(52)
MEG3	<i>MiR-133a-3p</i>	Osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(53)
ANCR	<i>EZH2, RUNX2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(45)
BDNF-AS	<i>RUNX2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(54)
Plnc1	<i>PPAR-g2</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(45)
ADINR	<i>C/EBPα</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder.	(55)
HoxA-AS3	<i>EZH2</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder, osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(56)
ORLNC1	<i>ORLNC1-miR-296-PTEN</i>	Adipojenik farklılaşmayı teşvik eder, osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(57)
Bmncr	<i>BMP2, TAZ, RUNX2, PPARG</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder, adipojenik farklılaşmayı inhibe eder.	(58)
lncRNA	<i>RUNX2</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder, adipojenik farklılaşmayı inhibe eder.	(59)
LncRNA BDNF-AS	<i>miR-204-5p, miR-125a-3p</i>	Osteoblastik farklılaşmayı inhibe eder.	(54)
Linc-ROR	<i>miR-138, miR-145</i>	Osteoblastik farklılaşmayı teşvik eder.	(54)

tarafından yönlendirildiğini göstermektedir. Yavruların iskelet kütlesini etkileyen doğum öncesi çevresel faktörler arasında annenin D vitamini seviyeleri çok dikkat çekmiştir (69). Bu çalışmalar, intrauterin olayların iskelet fenotipini etkilediğini göstermektedir. Deney hayvanlarında bazı düşündürücü verilere rağmen (70), gerçek epigenetik mekanizmaların intrauterin çevresel faktörlerin insan iskeleti üzerindeki etkisini ne ölçüde açıkladığı açıklanamamıştır. Bununla birlikte, birkaç çalışma, doğumdaki DNA metilasyon modelinin iskelet homeostazını etkileyebileceğini öne sürmüştür. Bu nedenle, bazı çalışmalar kordon kanındaki eNOS (nitrik oksit sentezinden sorumlu bir enzim) ve retinoid-X reseptörü metilasyonunun çocukluk çağı kemik kütlesi ile ilişkilerini bildirmiştir (71,72).

Hızlı Kemik Kaybı

Epigenetik mekanizmalar kemik hücrelerinin farklılaşması ve aktivitesinde önemli rollere sahiptir. Bununla birlikte, epigenetik mekanizmaların OP riskini ve diğer iskelet bozukluklarını nasıl etkilediği hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Kemik kütlesinde zıt yönde değişiklik gösteren iki bozukluk olan OP ve osteoartrit arasındaki DNA metilasyonundaki farklılıklar araştırılmış, bu bozuklukların gelişimsel bir bileşeni olduğu hipotezi doğrultusunda, farklı şekilde metillenmiş genler arasında, iskeletin gelişiminde rol oynayan birkaç yolak üyesi bulunmuştur (73). Ayrıca, bu konseptte uygun olarak, sklerostin promotörlerinin ve *Wnt* yolunun diğer genlerinin metilasyon durumunun OP riskini etkilediği öne sürülmüştür (74,75). Ancak, kesin sonuçlara varmadan önce bu sonuçların diğer gruplarda tekrarlanması gerekir. Kodlamayan RNA'lar ayrıca kemiğin yeniden şekillenmesinin ana etkenleri olan osteoblastların ve osteoklastların farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynar (76,77). Aslında, insan doku örneklerinde miRNA'ların miktarını analiz eden çalışmalarda, birkaç miRNA'nın OP'de farklı şekilde eksprese edildiği bulunmuştur (78,79). OP'nin patogenezinde hangi miRNA'ların gerçekte rol oynadığını belirlemek için ilave araştırmalara ihtiyaç vardır.

Epigenetik Epidemiyoloji Çalışmalarının Yorumlanması

Mevcut teknolojiler, aday ve epigenom çapında çalışmaların verimli bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanır. Bu nedenle,

beklenmedik bir şekilde, epigenetik epidemiyoloji üzerine yayınlanmış çalışmaların sayısı katlanarak artmaktadır (80).

Çalışma Konuları

İlk olarak, bireylerin fenotipi açıkça belirlenmelidir. Çalışma hastalıklı denekleri içeriyorsa hastaların fenotipinin tüm hastalık spektrumunu veya sadece bozukluğun belirli bir evresini veya varyantını temsil edip etmediğini incelememiz gerekir. Genomdan farklı olarak epigenomun yaşla ve çevresel etkilerle değişebileceğini belirtmek önemlidir. Bu nedenle, bireylerin yaşı ve önceki tedaviler de dahil olmak üzere diğer olası karıştırıcı etkenlerin dikkate alınması gerekir. Diğer yandan, çalışma hastaları ve kontrolleri karşılaştırdıysa kontrol grubunun çalışılan hasta grubu için yeterli olup olmadığını kontrol etmek önemlidir. Yaş, cinsiyet, etnik köken ve beslenme gibi özellikler ve diğer çevresel etkiler her iki grup arasında karşılaştırılabilir olmalıdır.

Örnek Konular

Epigenomun hücreye özgü olması, epigenomik çalışmalara özgü bir zorluktur. Diğer bir deyişle, genetik dizilerden farklı olarak, epigenetik değişimler hücreler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle, ilgili dokularda hastalığın epigenetik değişimlerini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmalıdır. Ancak uygun doku örneklerinin alınması etik ve pratik problemler doğurabilir. Bu nedenle, bazı durumlarda, keşif analizlerinde vekil olarak erişilebilir doku veya sıvıların (kan, tükürük, idrar) kullanılması faydalı olabilir. Ek olarak, bu yaklaşım, epigenetik işaretlerin biyobelirteçler olarak kullanılması için yararlı bilgiler sağlayabilir. Bununla birlikte, patofizyolojik bir perspektiften, iskelet bozuklukları çalışılırken sonuçların kemik gibi ilgili doku örneklerinde doğrulanması gerekir. Farklı bireylerden alınan numuneler karşılaştırılacaksa hücre kompozisyonundaki farklılıklara dikkat etmek önemlidir ve bu faktörün potansiyel etkisi dikkate alınmalıdır (81). Kan örneklerinin DNA metilasyonu çalışmalarında hücre kompozisyonu ayarlamaları yapmaya uygun algoritmalar vardır (82). Bununla birlikte, katı numuneler analiz edildiğinde benzer ayarlamalar daha zordur. Lazer destekli mikrodiseksiyon ve ardından az sayıda hücrenin CpG metilasyonunun analizi için optimize edilmiş yöntemler bir alternatif olabilir (83). Son olarak, aynı bireyin hastalıklı ve kontrol dokularının eşleştirilmiş çalışmalarında, kontrol dokusu, çalışma amaçlarına bağlı olarak dikkatli bir şekilde seçilmelidir. Yalnızca

Tablo 5. Bazı önemli miRNA'lar ve etkileri

miRNA	Hedef gen	Sonuç	Referans
miR-2861	<i>RUNX2</i> <i>HDAC5</i>	Mutasyon genç bireylerde osteoporozu neden olur.	(19)
miR-214	<i>ATF-4</i>	Osteoporozu yatkınlık	(59)
miR-21 miR-23 ^a -24 miR-100 miR-125b	<i>PDCD4</i> <i>RUNX2</i> <i>BMPR2</i>	Osteoporozda ifadesi farklıdır.	(60)
miR-518 miR-187	<i>WISP1</i> <i>CTNBP1</i> <i>IL6, TNF</i>	Osteoporozda ifadesi farklıdır.	(61)

hastalığın değil, aynı zamanda konakçı yanıtlarının da doku kompozisyonunda ve epigenetik işaretlerde değişikliklere neden olabileceğini düşünmek önemlidir. Örneğin; tümör dokusunun epigenetik imzası, sıklıkla bitişik tümörsüz dokununkiyile karşılaştırılır. Bununla birlikte, sonucusu, konakçı bağışıklık tepkisi nedeniyle değiştirilmiş bir hücre bileşimine sahip olabilir ve sonuç olarak, gerçek normal dokunun iyi bir temsili olmayabilir.

Teknoloji ve Veri Analizi

Tüm araştırma makalelerinde olduğu gibi, metodoloji/detaylar ve kullanılan teknolojinin tam olarak açıklanması gerekir. Özellikle epigenom çapındaki çalışmalarda kapsamın dikkate alınması önemlidir. Genomda yaklaşık 25 milyon CpG vardır. Metilasyon seviyelerini keşfetmek, maliyetli tam bisülfitor dizilimi gerektirebilir. Sık kullanılan alternatif prosedürler, yaklaşık 5 milyon CpG'yi (84) inceleyebilen popüler 450K array'dir. DNA metilom oluşturmak için nispeten daha ucuz ve uygun metottur. Ancak, bu dizilerin yaklaşık 485.000 CpG bölgesini sorguladığını bilmek önemlidir (85); bu, potansiyel olarak metillenmiş CpG'lerin sadece yaklaşık %2'sini keşfeder. Bu nedenle, birçok bölge keşfedilmemiş durumdadır. Bu bilgi, özellikle olumsuz sonuçları olan çalışmalarda dikkate alınmalıdır. Sonuçların teyit edilmesi için, aynı teknikte tekrar çalışılabilir ya da başka tekniklerle doğrulanabilir. Örneğin; metilasyon dizileriyle elde edilen veriler, piro-sıralama veya MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) verileriyle teyit edilebilir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi örneklem büyüklüğü önemli bir konudur. Çalışmanın istatistiksel gücü ve buna bağlı olarak tip II hata olasılığı (yani, çalışılan gruplar arasında gerçek farklılıklar olduğunda olumsuz bir sonuç elde edilmesi) dikkate alınmalıdır. Numune boyutu ve ölçümün değişkenliği (yani, CpG metilasyon seviyesi, miRNA bolluğu vb.) istatistiksel gücü etkileyen başlıca faktörlerdir. Epigenom çapındaki çalışmalar, birçok lokusta (birkaç milyona kadar) potansiyel gruplar arası farklılıkları araştırır. Bu nedenle, tip I hatanın şişirilmesi (yani, tesadüfen bulunan bir farkın istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmesi) bir sorundur. Bunu en aza indirmek için istatistiksel olarak anlamlılık için olağan 0,05 eşliği artık uygun değildir. Yapılan karşılaştırma sayısına göre ayarlanan yeni bir eşliğe indirilmelidir.

Bu tür bir ayarlamayı gerçekleştirmek için Bonferroni prosedürü ve daha az katı olan yanlış keşif oranı hesaplaması dahil olmak üzere çeşitli yöntemler mevcuttur.

Tek Lokus, Genomik Bölgeler ve Ağlar

İlk adım olarak, veri analizi genellikle tekli CpG'lerin metilasyon düzeyi veya bireysel miRNA'ların miktarı gibi tekli analiz birimine odaklanır. Gruplandırma prosedürleriyle daha derin bir sonuç elde edilebilir. DNA metilasyonu için bireysel CpG'lerin analizinden sonra, diğer yaygın prosedürler, gen gövdeleri, promotör bölgeleri, CpG adaları, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri vb. gibi ilgili genomik bölgelerde gruplandırılmış CpG'lerin analizini içerir. Bu verilerin ardından, genellikle bir tür ağ analizi yapılmalıdır. Basit yol analizi, özel bir özellik gösteren genlerin (örneğin; çalışılan gruplar arasındaki diferansiyel metilasyon), genel genomla karşılaştırıldığında belirli bir "yolda" fazla temsil

edilip edilmediğini bulmaya çalışır. Diğer çalışmalar, bireysel analizde önemli olarak tanımlanan genler veya genomik bölgeler arasındaki ilişkileri bulmaya çalışır. Bir dizi ticari yazılım paketinin yanı sıra internette ücretsiz olarak bulunan diğer araçlar (DAVID, GESEA, WebGestalt, EnrichNet, NetworkAnalyst, vb.), yolların ve ağ analizlerinin gerçekleştirilmesine yardımcı olur (86).

Fonksiyonel Çalışmalar

Fonksiyonel deneyler, çalışmanın sonuçlarını geliştirir. Örneğin; bir gen promotörünün bir hastalığı olan hastalarda kontrollere göre daha fazla metillendiğini gösteren bir çalışmada, hasta grubunda gen ekspresyonunda azalma veya baskılayıcı histon kuyruk işaretleri gösterilirse bu bulgunun geçerliliği ve ilgisi artacaktır. Bazı durumlarda, hipotezi doğrulayan veriler aranarak mevcut veri tabanları araştırılabileceğinden, in silico doğrulama uygundur.

Ancak, çalışmanın amaçlarına bağlı olarak fonksiyonel veriler elde etmek için *in vitro* deneyler gerekebilir (87).

Sonuçların Önemi ve Genelleştirilmesi

Bireylerin bağımsız kohortlarında tekrar önemlidir. Bir yandan, ilk sonuçların teknik geçerliliğini destekler; diğer yandan, sonuçların keşif kohortunda temsil edilenlerin dışındaki popülasyonlara uygulanabileceğini doğrular. Yine de tekrar olmamasının, çalışılan kohorttaki sonucun sahte olduğu anlamına gelmediğini belirtmek önemlidir. Genetik arka plan ve çevresel koşullar dahil olmak üzere bir dizi faktörün epigenom üzerinde güçlü etkileri vardır. Bu nedenle bazı durumlarda epigenetik farklılıklar ancak bireyler belirli çevresel faktörlere maruz kaldıklarında veya belirli bir etnik kökene sahip olduklarında gözlemlenebilir.

Doğrudan ve Ters Nedensellik

Genom gebelikten itibaren stabildir. Bu nedenle, genetik çalışmalarda ters nedensellik sorunu önemli değildir. Bununla birlikte, epigenetik çalışmaların yorumlanması için kesinlikle bir endişe nedenidir. Bir grup hasta ile bir grup kontrol arasındaki farklı epigenetik işaretleri gösteren bir çalışmada, hastalığa epigenetik farklılıkların mı neden olduğu yoksa tersi mi sorusunu sormalıyız. İnsan çalışmalarında bu, çözülmesi çok zor bir soru olabilir. Ancak bazı durumlarda, hastalığın erken ve geç evrelerindeki epigenetik imzaların karşılaştırılması bazı yararlı ipuçları sağlayabilir (88,89).

Bilimsel ve Klinik Uygunluk

Epigenetik çalışmalar, hücre farklılaşmasını ve işlevini düzenleyen moleküler mekanizmalara daha iyi bir bakış açısı sağladığı için bilimsel açıdan çok önemli olan yeni verileri ortaya çıkarıyor. Çalışmalar hastalığın patogenezi aydınlatmak, hastalığın tanısını veya prognozunu belirlemek için yeni biyobelirteçleri kullanmak ve özellikle terapötik hedefler bulmak için yeni pencereler açarsa biyomedikal açıdan önemi daha da artar bu durumda daha etkili ve güvenli tedavilere yol açabilir (88,89).

Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Literatür Arama: E.T., Er.T., Yazan: Ş.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 1971;80:147-54.
2. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2001;2:165-71.
3. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63-76.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
5. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013;38:23-38.
6. Yang S, Duan X. Epigenetics, Bone Remodeling and Osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016.
7. Letarouilly JG, Broux O, Clabaut A. New insights into the epigenetics of osteoporosis. *Genomics* 2019;111:793-8.
8. Xu F, Liu J, Na L, Chen L. Roles of Epigenetic Modifications in the Differentiation and Function of Pancreatic β -Cells. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:748.
9. Niu YD, Lin YH, Zhang HQ, Tao T and Xu LT. Research progress on the role of DNA methylation in bone metabolism regulation and osteoporosis. *Chin Bull Life Sci* 2020;2:162-169.
10. Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, He X, Stein G, Lian J, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res* 2011;26:1953-63.
11. Raje MM, Ashma R. Epigenetic regulation of BMP2 gene in osteoporosis: a DNA methylation study. *Mol Biol Rep* 2019;46:1667-74.
12. Cao Y, Wang B, Wang D, Zhan D, Mai C, Wang P, et al. Expression of Sclerostin in Osteoporotic Fracture Patients Is Associated with DNA Methylation in the CpG Island of the SOST Gene. *Int J Genomics* 2019;2019:7076513.
13. Licini C, Vitale-Brovarone C, Mattioli-Belmonte M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2019;49:59-69.
14. Wu F, Jiao J, Liu F, Yang Y, Zhang S, Fang Z, et al. Hypermethylation of Frizzled1 is associated with Wnt/ β -catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis. *Exp Mol Med* 2019;51:1-9.
15. Behera J, George AK, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide epigenetically mitigates bone loss through OPG/RANKL regulation during hyperhomocysteinemia in mice. *Bone* 2018;114:90-108.
16. Wang P, Cao Y, Zhan D, Wang D, Wang B, Liu Yet al. Influence of DNA methylation on the expression of OPG/RANKL in primary osteoporosis. *Int J Med Sci* 2018;15:1480-5
17. Thaler R, Agsten M, Spitzer S, Paschalis EP, Karlic H, Klaushofer K, et al. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1, and epigenetic DNA methylation. *J Biol Chem* 2011;286:5578-88.
18. Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, Sollazzo V, Traina G, del Senno L, et al. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;91:1-9.
19. Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009;119:3666-77.
20. Jintaridith P, Tungtrongchitr R, Preutthipan S, Mutirangura A. Hypomethylation of Alu elements in post-menopausal women with osteoporosis. *PLoS One* 2013;8:e70386.
21. Ren J, Huang D, Li R, Wang W, Zhou C. Control of mesenchymal stem cell biology by histone modifications. *Cell Biosci* 2020;10:11.
22. Longbotham JE, Zhang MY, Fujimori DG. Domain cross-talk in regulation of histone modifications: Molecular mechanisms and targeting opportunities. *Curr Opin Chem Biol* 2020;57:105-13.
23. Rahman MM, Kukita A, Kukita T, Shobuiki T, Nakamura T, Kohashi O. Two histone deacetylase inhibitors, trichostatin A and sodium butyrate, suppress differentiation into osteoclasts but not into macrophages. *Blood* 2003;101:3451-9.
24. Hesse E, Saito H, Kiviranta R, Correa D, Yamana K, Neff L, et al. Zfp521 controls bone mass by HDAC3-dependent attenuation of Runx2 activity. *J Cell Biol* 2010;191:1271-83.
25. Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem* 2006;281:16502-11.
26. Kim HN, Lee JH, Bae SC, Ryoo HM, Kim HH, Ha H, et al. Histone deacetylase inhibitor MS-275 stimulates bone formation in part by enhancing Dlx3-mediated TNAP transcription. *J Bone Miner Res* 2011;26:2161-73.
27. Pham L, Kaiser B, Romsa A, Schwarz T, Gopalakrishnan R, Jensen ED, et al. HDAC3 and HDAC7 have opposite effects on osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2011;286:12056-65.
28. Fu Y, Zhang P, Ge J, Cheng J, Dong W, Yuan H, et al. Histone deacetylase 8 suppresses osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by inhibiting histone H3K9 acetylation and RUNX2 activity. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;54:68-77.
29. Edwards JR, Perrien DS, Fleming N, Nyman JS, Ono K, Connelly L, et al. Silent information regulator (Sir)T1 inhibits NF- κ B signaling to maintain normal skeletal remodeling. *J Bone Miner Res* 2013;28:960-9.
30. Nagai K, Matsushita T, Matsuzaki T, Takayama K, Matsumoto T, Kuroda R, et al. Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:1412-20.
31. Sun X, Yuan Y, Xiao Y, Lu Q, Yang L, Chen C, Guo Q. Long non-coding RNA, Bmcob, regulates osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;506:536-42.
32. Fan Z, Yamaza T, Lee JS, Yu J, Wang S, Fan G, et al. BCOR regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms. *Nat Cell Biol* 2009;11:1002-9.
33. Qi Q, Wang Y, Wang X, Yang J, Xie Y, Zhou J, et al. Histone demethylase KDM4A regulates adipogenic and osteogenic differentiation via epigenetic regulation of C/EBP α and canonical Wnt signaling. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:2407-21.
34. Ye L, Fan Z, Yu B, Chang J, Al Hezaimi K, Zhou X, et al. Histone demethylases KDM4B and KDM6B promotes osteogenic differentiation of human MSCs. *Cell Stem Cell* 2012;11:50-61.
35. Flowers S, Beck GR Jr, Moran E. Transcriptional activation by pRB and its coordination with SWI/SNF recruitment. *Cancer Res* 2010;70:8282-7.
36. Hoang M, Kim JJ, Kim Y, Tong E, Trammell B, Liu Y, et al. Alcohol-induced suppression of KDM6B dysregulates the mineralization potential in dental pulp stem cells. *Stem Cell Res* 2016;17:111-21.
37. Yang X, Wang G, Wang Y, Zhou J, Yuan H, Li X, et al. Histone demethylase KDM7A reciprocally regulates adipogenic and osteogenic differentiation via regulation of C/EBP α and canonical Wnt signalling. *J Cell Mol Med* 2019;23:2149-62.

38. Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol* 2015;12:381-8.
39. Ge W, Shi L, Zhou Y, Liu Y, Ma GE, Jiang Y, et al. Inhibition of osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells by retinoblastoma binding protein 2 repression of RUNX2-activated transcription. *Stem Cells* 2011;29:1112-25.
40. Liu H, Liu Q, Wu XP, He HB, Fu L. MiR-96 regulates bone metabolism by targeting osterix. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018;45:602-13.
41. Yang S, Duan X. Epigenetics, Bone Remodeling and Osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016.
42. Liang WC, Fu WM, Wang YB, Sun YX, Xu LL, Wong CW, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Sci Rep* 2016;6:20121.
43. Hoang M, Kim JJ, Kim Y, Tong E, Trammell B, Liu Y, et al. Alcohol-induced suppression of KDM6B dysregulates the mineralization potential in dental pulp stem cells. *Stem Cell Res* 2016;17:111-21.
44. Xia W, Zhuang L, Deng X, Hou M. Long noncoding RNA p21 modulates cellular senescence via the Wnt/ β catenin signaling pathway in mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2017;16:7039-47.
45. Zhu J, Wang Y, Yu W, Xia K, Huang Y, Wang J, et al. Long Noncoding RNA: Function and Mechanism on Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Embryonic Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2019;14:259-67.
46. Chen J, Jia YS, Liu GZ, Sun Q, Zhang F, Ma S, et al. Role of LncRNA TUG1 in intervertebral disc degeneration and nucleus pulposus cells via regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;491:668-74.
47. Zhang W, Dong R, Diao S, Du J, Fan Z, Wang F. Differential long noncoding RNA/mRNA expression profiling and functional network analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:30.
48. Tong X, Gu PC, Xu SZ, Lin XJ. Long non-coding RNA-DANCR in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015;79:732-7.
49. Wei B, Wei W, Zhao B, Guo X, Liu S. Long non-coding RNA HOTAIR inhibits miR-17-5p to regulate osteogenic differentiation and proliferation in non-traumatic osteonecrosis of femoral head. *PLoS One* 2017;12:e0169097.
50. Che W, Dong Y, Quan HB. RANKL inhibits cell proliferation by regulating MALAT1 expression in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2015;61:7-14.
51. Weng J, Peng W, Zhu S, Chen S. Long Noncoding RNA Sponges miR-454 to Promote Osteogenic Differentiation in Maxillary Sinus Membrane Stem Cells. *Implant Dent* 2017;26:178-86.
52. Xu Y, Wang S, Tang C, Chen W. Upregulation of long non-coding RNA HIF 1 α -anti-sense 1 induced by transforming growth factor- β -mediated targeting of sirtuin 1 promotes osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Mol Med Rep* 2015;12:7233-8.
53. Wang Q, Li Y, Zhang Y, Ma L, Lin L, Meng J, Jiang L, Wang L, Zhou P, Zhang Y. LncRNA MEG3 inhibited osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from postmenopausal osteoporosis by targeting miR-133a-3p. *Biomed Pharmacother* 2017;89:1178-86.
54. Feng L, Shi L, Lu YF, Wang B, Tang T, Fu WM, et al. Linc-ROR Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Functioning as a Competing Endogenous RNA for miR-138 and miR-145. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018;11:345-53.
55. Xiao T, Liu L, Li H, Sun Y, Luo H, Li T, et al. Long Noncoding RNA ADINR Regulates Adipogenesis by Transcriptionally Activating C/EBP α . *Stem Cell Reports* 2015;5:856-65.
56. Zhu XX, Yan YW, Chen D, Ai CZ, Lu X, Xu SS, et al. Long non-coding RNA HoxA-AS3 interacts with EZH2 to regulate lineage commitment of mesenchymal stem cells. *Oncotarget* 2016;7:63561-70.
57. Yang L, Li Y, Gong R, Gao M, Feng C, Liu T, et al. The Long Non-coding RNA-ORLNC1 Regulates Bone Mass by Directing Mesenchymal Stem Cell Fate. *Mol Ther* 2019;27:394-410.
58. Li CJ, Xiao Y, Yang M, Su T, Sun X, Guo Q, Huang Y, Luo XH. Long noncoding RNA Bmncr regulates mesenchymal stem cell fate during skeletal aging. *J Clin Invest* 2018;128:5251-66.
59. Wang Q, Cai J, Cai XH, Chen L. miR-346 regulates osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting the Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS One* 2013;8:e72266.
60. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2014;29:1718-28.
61. Garmilla-Ezquerro P, Sañudo C, Delgado-Calle J, Pérez-Núñez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2015;96:30-7.62. Hernandez CJ, Beaupré GS, Carter DR. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14:843-7.
62. Hernandez CJ, Beaupré GS, Carter DR. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14:843-7.
63. Ohta H, Kuroda T, Onoe Y, Nakano C, Yoshikata R, Ishitani K, et al. Familial correlation of bone mineral density, birth data and lifestyle factors among adolescent daughters, mothers and grandmothers. *J Bone Miner Metab* 2010;28:690-5.
64. Cvijetić Avdagić S, Colić Barić I, Keser I, Rumbak I, Šatalić Z. Influence of heredity and environment on peak bone density: a review of studies in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63:11-6.
65. Medina-Gomez C, Kemp JP, Estrada K, Eriksson J, Liu J, Reppe S, et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the WNT16 locus. *PLoS Genet* 2012;8:e1002718.
66. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: a lifecourse approach. *J Bone Miner Res* 2014;29:1917-25.
67. Harvey NC, Mahon PA, Robinson SM, Nisbet CE, Javaid MK, Crozier SR, et al. Different indices of fetal growth predict bone size and volumetric density at 4 years of age. *J Bone Miner Res* 2010;25:920-7.
68. Baird J, Kurshid MA, Kim M, Harvey N, Dennison E, Cooper C. Does birthweight predict bone mass in adulthood? A systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2011;22:1323-34.
69. Zhu K, Whitehouse AJ, Hart PH, Kusel M, Mountain J, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and bone mass in offspring at 20 years of age: a prospective cohort study. *J Bone Miner Res* 2014;29:1088-95.
70. Holroyd C, Harvey N, Dennison E, Cooper C. Epigenetic influences in the developmental origins of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012;23:401-10.
71. Harvey NC, Lillycrop KA, Garratt E, Sheppard A, McLean C, Burdge G, et al. Evaluation of methylation status of the eNOS promoter at birth in relation to childhood bone mineral content. *Calcif Tissue Int* 2012;90:120-7.
72. Harvey NC, Sheppard A, Godfrey KM, McLean C, Garratt E, Ntani G, et al. Childhood bone mineral content is associated with methylation status of the RXRA promoter at birth. *J Bone Miner Res* 2014;29:600-7.
73. Delgado-Calle J, Fernández AF, Sainz J, Zarrabeitia MT, Sañudo C, García-Renedo R, et al. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:197-205.
74. García-Ibarbia C, Delgado-Calle J, Casafont I, Velasco J, Arozamena J, Pérez-Núñez MI, et al. Contribution of genetic and epigenetic

- mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene* 2013;532:165-72.
75. Reppe S, Noer A, Grimholt RM, Halldórsson BV, Medina-Gomez C, Gautvik VT, et al. Methylation of bone SOST, its mRNA, and serum sclerostin levels correlate strongly with fracture risk in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2015;30:249-56.
 76. Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr Genomics* 2012;13:252-63.
 77. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:212-27.
 78. Garmilla-Ezquerria P, Sañudo C, Delgado-Calle J, Pérez-Nuñez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2015;96:30-7.
 79. Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009;119:3666-77.
 80. Heijmans BT, Mill J. Commentary: The seven plagues of epigenetic epidemiology. *Int J Epidemiol* 2012;41:74-8.
 81. Liang L, Cookson WO. Grasping nettles: cellular heterogeneity and other confounders in epigenome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2014;23.
 82. Jaffe AE, Irizarry RA. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol* 2014;15:R31.
 83. Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, Krueger F, Saadeh H, Peat J, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 2014;11:817-20.
 84. Nagarajan A, Roden C, Wajapeyee N. Reduced representation bisulfite sequencing to identify global alteration of DNA methylation. *Methods Mol Biol* 2014;1176:23-31.
 85. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* 2011;6:692-702.
 86. Riancho JA. Epigenetics of Osteoporosis: Critical Analysis of Epigenetic Epidemiology Studies. *Curr Genomics* 2015;16:405-10.
 87. Tural S, Kara N, Alaylı G. Osteoporoz genetiği. *Türk Osteoporoz Dergisi* 2011;17:100-9.
 88. Xu F, Li W, Yang X, Na L, Chen L, Liu G. The Roles of Epigenetics Regulation in Bone Metabolism and Osteoporosis. *Front Cell Dev Biol* 2021;8:619301.
 89. Letarouilly JG, Broux O, Clabaut A. New insights into the epigenetics of osteoporosis. *Genomics* 2019;111:793-8.