Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Nauck)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

# Assoziation zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel im Rahmen einer populationsbasierten Studie

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:
**Jörn Steinke**
geb. am: 29. Oktober 1989
in: Wolgast

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachterin: Prof. Dr. rer. med. Nele Friedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Christof Schober

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, DZ7, Seminarraum J04.33/34

Tag der Disputation: 13. Juni 2023

# Inhaltsverzeichnis

**Inhaltsverzeichnis ..... III**

**Abkürzungsverzeichnis ..... V**

**1. Einleitung ..... 1**

1.1 Chitinasen, Chitinase-ähnliche Proteine und YKL-40 ..... 1

1.2 Die Bedeutung von YKL-40 im Rahmen inflammatorischer Prozesse ..... 2

1.3 YKL-40 und der Knochenstoffwechsel ..... 3

1.4 Die Bedeutung inflammatorischer Prozesse für den Knochenabbau ..... 3

1.5 Herleitung der Fragestellung ..... 4

**2. Methoden ..... 5**

2.1 Die *Study of Health in Pomerania* (SHIP) ..... 5

2.2 Die Studienpopulationen ..... 5

2.3 Erhebung der Studiendaten ..... 7

2.4 Labormessungen ..... 8

2.5 QUS-Messungen ..... 9

2.6 Genotypisierung und Auswahl der SNPs ..... 10

2.7 Statistische Analysen ..... 10

**3. Ergebnisse ..... 13**

3.1 Charakteristika der Studienpopulation ..... 13

3.2 Zusammenhang zwischen YKL-40 und den BTMs sowie QUS-basierten Parametern ..... 14

3.3 Zusammenhang zwischen YKL-40 und Entzündungsparametern ..... 15

3.4 Zusammenhang zwischen YKL-40 und der genetischen Variation in *CHI3L1* ..... 16

3.5 Zusammenhang zwischen der genetischen Variation in *CHI3L1* und den BTMs sowie QUS-basierten Parametern ..... 18

**4. Diskussion ..... 20**

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse ..... 20

4.2 Der Bezug von YKL-40 zum Knochenstoffwechsel ..... 20

4.3 Der Einfluss der genetischen Variation in *CHI3L1* auf die Knochenstruktur, den Knochenumbau und die YKL-40-Konzentration ..... 21

4.4 Der Zusammenhang zwischen YKL-40 und Entzündungsreaktionen ..... 21

4.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede ..... 24

4.6 Stärken der Studie ..... 25

4.7 Limitationen der Studie ..... 26

4.8 Schlussfolgerung ..... 26

**5. Zusammenfassung ..... 27**

**6. Literaturverzeichnis ..... 28**

**7. Wissenschaftliche Arbeit ..... 34**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 25OHD | 25-Hydroxy-Vitamin D |
| APRIL | *a proliferation inducing ligand* |
| ATC | Anatomisch-Therapeutisch-Chemisches Klassifikationssystem |
| b | Base |
| BTM | *bone turnover marker* |
| BUA | broadband ultrasound attenuation |
| *CHI3L1* | *chitinase-3-like protein 1* |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung |
| CTX | *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen* |
| FDR | *false discovery rate* |
| HbA1c | Hämoglobin A1c |
| hsCRP | hochsensitives C-reaktives Protein |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| LC-MS/MS | Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie |
| mRNA | *messenger ribonucleic acid* |
| NSAR | nichtsteroidale Antirheumatika |
| Pa | Partikel |
| PINP | *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen* |
| QUS | quantitativer Ultraschall |
| RANK | *Receptor Activator of NF-κB* |
| RANKL | *Ligand of Receptor Activator of NF-κB* |
| $r_S$ | Spearman'scher Korrelationskoeffizient |
| SE | *standard error*, Standardfehler |
| SHIP | *Study of Health in Pomerania* |
| SNP | *single nucleotide polymorphism* |
| SOS | *speed of sound* |
| $T_H$ | T-Helferzelle |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TNFSF | *tumor necrosis factor ligand superfamily member* |

# 1. Einleitung

## 1.1 Chitinasen, Chitinase-ähnliche Proteine und YKL-40

Chitinasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse glykosidischer Bindungen in Chitin katalysieren können, einem Polysaccharid, welches als Komponente der Zellwand und Bestandteil des Exoskeletts von Pilzen, Gliederfüßern und Weichtieren gebildet wird.[1] Obwohl der Mensch selbst kein Chitin synthetisiert, werden Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine (Chitinasen ohne enzymatische Aktivität) von verschiedenen Zelltypen des Menschen gebildet, beispielsweise von Fibroblasten, Chondrozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen.[2,3] Die Funktion dieser Proteine im humanen Stoffwechsel ist bislang nicht genau geklärt. Vermutungen zufolge könnten sie Teil der Abwehrreaktion gegen Chitin-bildende Pathogene sein.[1] Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sie am Gewebeumbau beteiligt sind. So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Chondrozyten, Synovialzellen, Endothelzellen und Fibroblasten und der Expression des Chitinase-ähnlichen Proteins YKL-40, welches Thema dieser Arbeit sein soll, beschrieben.[4–6]

Der Name YKL-40 bezieht sich auf die N-terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L) des Proteins sowie auf seine molekulare Masse von 40 kDa.[7] YKL-40 wird vom Gen *chitinase-3-like protein 1* (*CHI3L1*) auf Chromosom 1 kodiert. Die Konzentration von zirkulierendem YKL-40 unterliegt dabei unter anderem der genetischen Variation im *CHI3L1* Genlocus. Vor allem *single nuclotide polymorphisms* (SNPs) in der *upstream* Region des Gens beeinflussen die zirkulierende YKL-40-Konzentration.[8,9]

In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass bestimmte genetische Varianten in *CHI3L1* mit dem Auftreten von Krankheiten assoziiert sind. Beispielsweise steht der SNP rs4950928 in *CHI3L1* mit der Entwicklung von Leberfibrose[10] und Schizophrenie[11] in Zusammenhang. Die Forscher um Ober *et al*.[9] haben zudem eine Verbindung zu Asthma und bronchialer Hyperreaktivität beschreiben können und vermuten, dass das Minor-Allel des rs4950928 SNPs, welches mit geringeren YKL-40-Konzentrationen assoziiert ist, protektiv gegen Lungenerkrankungen dieser Art wirken könnte.

Auch der direkte Zusammenhang zwischen der Konzentration von YKL-40 im Blut und dem Vorkommen verschiedener Erkrankungen wurde bereits untersucht. So ist die YKL-40-Konzentration mit dem Auftreten von Osteoarthritis[12] assoziiert, spielt möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung entzündlicher Darmerkrankungen[13] und wird als potentieller Biomarker für die Charakterisierung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD)[14] diskutiert. Interessanterweise ist all diesen Krankheitsbildern ein inflammatorischer Hintergrund gemein.

### 1.2 Die Bedeutung von YKL-40 im Rahmen inflammatorischer Prozesse

Verschiedene Forschergruppen haben sich mit dem Zusammenhang zwischen YKL-40 und den Entzündungsreaktionen im Körper beschäftigt.[15–19] So konnte nachgewiesen werden, dass proinflammatorische Zytokine die Bildung von YKL-40 induzieren können. Beispielsweise sekretieren mesenchymale Stammzellen im Rahmen der Differenzierung zu Osteoblasten YKL-40, wenn sie mit Interleukin (IL)-6 stimuliert werden.[15] Eine *in vivo* Studie von Nielsen *et al.*[16] konnte zeigen, dass die Konzentration von YKL-40 im Blut gesunder Männer ansteigt, wenn diese 24 Stunden zuvor IL-6 erhalten haben. Die Forscher vermuten deshalb eine Schlüsselrolle des Zytokins bei der Regulation der YKL-40 Sekretion im Verlauf von Entzündungsprozessen.[16] Eine weitere Studie zeigte, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöhte YKL-40-Konzentrationen im Serum und der Synovia aufwiesen, wobei die Serumkonzentration von YKL-40 mit der des Tumornekrosefaktors (TNF)-α und IL-1β assoziiert war.[17]

Die genaue Rolle von YKL-40 im Rahmen dieser pathophysiologischen Vorgänge ist bislang weitgehend ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass YKL-40 inflammatorische Prozesse direkt fördern könnte. Mäuse, denen durch ein *CHI3L1-Knockout* die Möglichkeit zur YKL-40-Bildung fehlt, entwickelten in Untersuchungen zur bakteriellen Kolitis eine weniger schwere inflammatorische Reaktion als Wildtyp-Mäuse. Dabei wiesen die Forscher eine verringerte IL-6-Produktion in den *Knockout*-Mäusen nach.[18] Außerdem zeigten *CHI3L1-Knockout*-Mäuse eine schwächere Antigen-induzierte allergische Reaktion in der Lunge, welche durch verminderte Entzündungs- und Fibrosierungsprozesse gekennzeichnet war.[19]

### 1.3 YKL-40 und der Knochenstoffwechsel

Neben der YKL-40-Synthese im Rahmen inflammatorischer Reaktionen beschäftigten sich einige wenige Studien mit dem Zusammenhang zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten *CHI3L1*-mRNA bilden, während reife Osteozyten das *CHI3L1*-Gen nicht exprimieren.[20,21] Des Weiteren führt das *Silencing* von *CHI3L1* in Osteoklasten zu einer signifikant reduzierten Aktivität der Zellen in Hinblick auf die Knochenresorption.[21] Eine der wenigen klinischen Untersuchungen auf diesem Gebiet stammt von den Wissenschaftlern um Mylin *et al.*[22], in deren Studie knapp die Hälfte der Patienten mit multiplem Myelom YKL-40-Konzentrationen oberhalb einer altersspezifischen Referenzkonzentration aufwiesen. Diese Patienten zeigten einen gesteigerten Knochenabbau im Vergleich zu Patienten, deren YKL-40-Konzentration im Referenzbereich lag. Die Forscher vermuten, dass die YKL-40-Konzentration, zumindest in diesem Kontext, ein Prognosemarker für skelettale Komplikationen im Rahmen der Erkrankung sein könnte.[22]

### 1.4 Die Bedeutung inflammatorischer Prozesse für den Knochenabbau

Osteoporose ist eine häufige, chronische Erkrankung des Skelettsystems im Erwachsenenalter. Dabei handelt es sich um eine Stoffwechselstörung, die durch einen fehlregulierten Umbau der Knochensubstanz und eine erhöhte Anfälligkeit für Frakturen gekennzeichnet ist. Als Hauptrisikofaktoren gelten ein Östrogenmangel (insbesondere in der Menopause), Mangelernährung, körperliche Inaktivität sowie eine genetische Prädisposition.[23] Des Weiteren begünstigen chronisch entzündliche Prozesse den Knochenabbau, beispielsweise im Rahmen inflammatorischer Gelenkerkrankungen.[24–26] So leiden Patienten mit rheumatoider Arthritis schon früh im Krankheitsverlauf an einer verminderten Knochendichte.[26] Auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es häufig zur Ausbildung osteoporotischer Veränderungen.[27] In vielen Fällen werden insbesondere proinflammatorische Zytokine und deren Wechselwirkungen mit den Zellen des Knochenstoffwechsels als ursächlich für den Knochenverlust diskutiert.[24,25,27,28] Untersuchungen im Rahmen der Osteoimmunologie

haben gezeigt, dass vor allem Zytokine wie IL-1β, IL-6, IL-17A und TNF-α Entzündungsprozesse vermitteln und die Reifung von Osteoklasten fördern.[24,28]

### 1.5 Herleitung der Fragestellung

Vorangegangene Studien zeigten, dass das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40, welches bislang vor allem im Rahmen entzündlicher Prozesse und Erkrankungen untersucht wurde, auch mit Prozessen des Knochenstoffwechsels in Zusammenhang stehen könnte. Diese Hypothese leitet sich jedoch überwiegend aus *in vitro* Studien ab. Klinische Studien zu dieser Fragestellung sind bisher rar und auf selektierte Patientengruppen beschränkt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration in humanem Plasma und verschiedenen Markern der Knochenstruktur sowie des Knochenumbaus in der Allgemeinbevölkerung zu untersuchen. Da inflammatorische Vorgänge im Körper Knochenumbauprozesse fördern, sollte zudem geprüft werden, ob die Konzentration von YKL-40 mit der Konzentration verschiedener weiterer Zytokine im Blut zusammenhängt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es mittels eines *Mendelian Randomization* Ansatzes der Frage nachzugehen, ob die beobachteten Assoziationen zwischen YKL-40 und den Markern des Knochenstoffwechsels kausal sind.

# 2. Methoden

## 2.1 Die *Study of Health in Pomerania* (SHIP)

Die *Study of Health in Pomerania* (SHIP) ist eine epidemiologische Studie, welche Gesundheitsdaten der Bevölkerung im Nordosten Deutschlands erhebt und analysiert.[29] SHIP besteht aus drei unabhängigen populationsbasierten Kohorten, SHIP, SHIP-TREND und SHIP-NEXT, welche jeweils erwachsene Männer und Frauen aus der Studienregion, den Städten Greifswald, Stralsund, Anklam und den umliegenden Gemeinden, einschließen. In allen drei Kohorten wurden, basierend auf repräsentativen Stichproben, Probanden im Alter von 20 bis 79 Jahren aufgenommen, welche jeweils anhand der lokalen Einwohnermelderegister zufällig ausgewählt wurden.

Die SHIP-Kohorte umfasst 4308 Frauen und Männer, wobei die Basis-Untersuchungen (SHIP-0) zwischen 1997 und 2001 durchgeführt wurden. Nachfolgend wurden vier Folgeuntersuchungen der SHIP-Kohorte veranlasst: SHIP-1 (2002-2006), SHIP-2 (2008-2012), SHIP-3 (2014-2016) sowie SHIP-4 (2019-2021). Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurden Daten aus SHIP-1 (3300 Probanden) und SHIP-2 (2333 Probanden) genutzt.

An den SHIP-TREND Erstuntersuchungen (SHIP-TREND-0) zwischen 2008 und 2012 beteiligten sich 4420 Probanden. Auch Daten dieser Untersuchungen gingen in die Analysen der vorliegenden Arbeit ein. Daten aus SHIP-TREND-1 (2016 bis 2019), der ersten Folgeuntersuchung, waren nicht Teil dieser Arbeit.

Die Studien folgen den Bestimmungen der Deklaration von Helsinki und wurden von der Ethikkommission der Universität Greifswald genehmigt. Alle Teilnehmer erklärten ihr schriftliches Einverständnis.

## 2.2 Die Studienpopulationen

Für diese Arbeit wurden aus den vorhandenen Daten verschiedener Studienwellen (SHIP-TREND-0, SHIP-1 und SHIP-2) drei Studienpopulationen gebildet um für jede der eingangs definierten Forschungsfragen die maximale Anzahl an Teilnehmern analysieren zu können. Eine Übersicht bezüglich der Studienpopulationen findet sich in Abbildung 1.

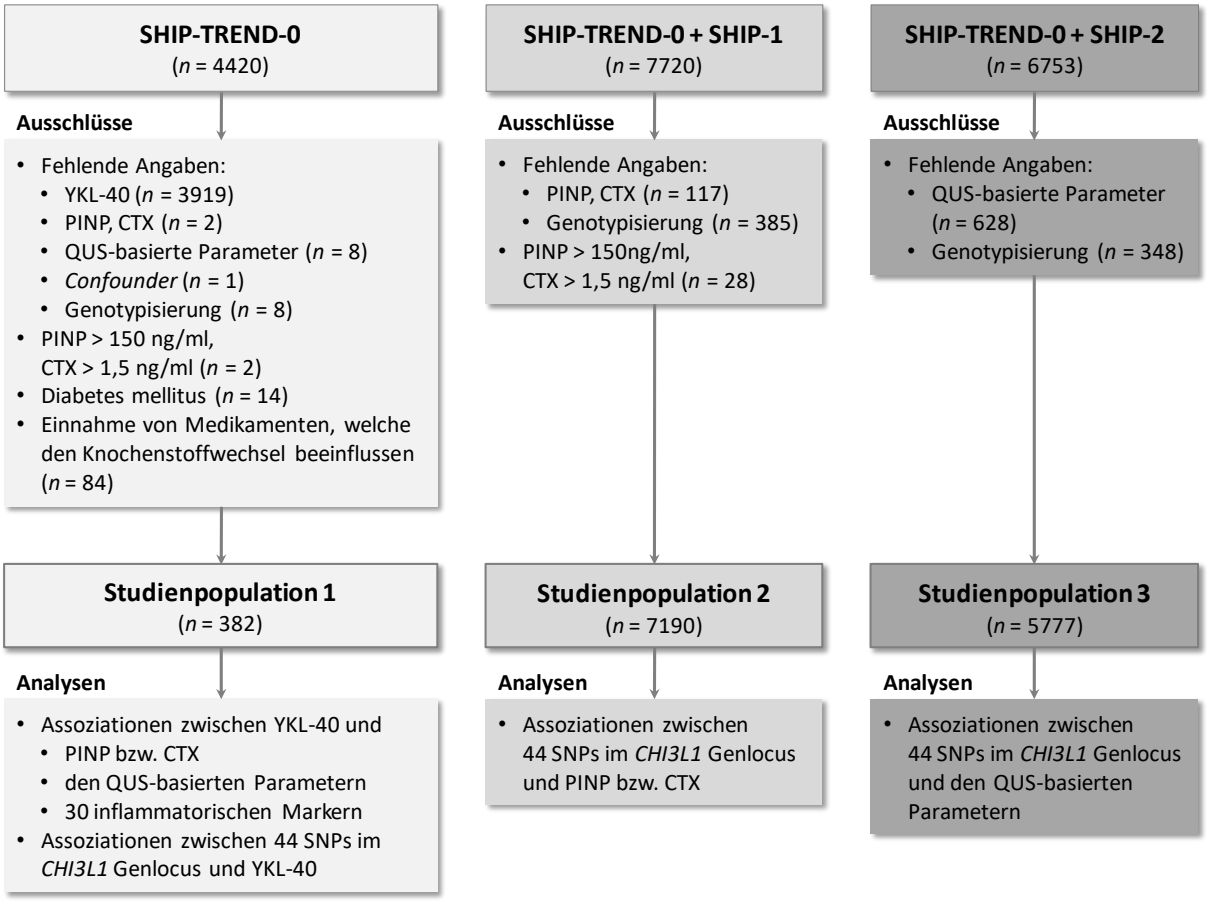



**Abbildung 1** - Zusammensetzung der Studienpopulationen und durchgeführte Analysen

CTX, *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen*; PINP, *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen*; QUS, quantitativer Ultraschall; SHIP, *Study of Health in Pomerania*; SNP, *single nucleotide polymorphism*; *n*, Anzahl

Die Plasmakonzentration von YKL-40 wurde in einer Subpopulation von SHIP-TREND-0-Probanden ohne bekannten Diabetes mellitus gemessen. Zur Charakterisierung des Knochenumbaus wurden zwei Biomarker (*bone turnover markers*, BTMs) genutzt: Zum einen das *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen* (PINP), ein Marker für den Knochenaufbau, zum anderen das *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen* (CTX), welches mit dem Knochenabbau assoziiert ist.[30] Zur Charakterisierung der Knochenstruktur dienten quantitative Ultraschall (QUS)-Untersuchungen an der Ferse der Studienteilnehmer. Ausgehend von SHIP-TREND-0 Probanden mit YKL-40-Messwerten (*n* = 501) wurden all jene von den Analysen ausgeschlossen, bei denen die BTM-Konzentrationen, die QUS-Messungen, die genetischen Informationen oder Informationen bezüglich der Kovariaten fehlten.

Weiterhin wurden Probanden mit extrem hohen BTM-Konzentrationen (oberhalb der 99,75 % Perzentile: PINP > 150 ng/ml, CTX > 1,5 ng/ml) von den Analysen ausgeschlossen. Außerdem gingen Probanden, welche Medikamente einnahmen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen, oder deren Diabetes mellitus Status nicht bekannt war, nicht in die Analysen ein. Daraus resultierte eine Studienpopulation von 382 Probanden (Studienpopulation 1). In dieser wurden die Zusammenhänge zwischen der Plasmakonzentration von YKL-40 und den BTM-Konzentrationen, den QUS-basierten Parametern sowie der genetischen Variation im *CHI3L1*-Genlocus untersucht. Zudem wurde in Studienpopulation 1 der Zusammenhang zwischen YKL-40 und verschiedenen Entzündungsmediatoren näher betrachtet.

Um die statistische Power für die Detektion von Assoziationen zwischen der genetischen Variation in *CHI3L1* und den BTMs bzw. den QUS-basierten Parametern zu maximieren, wurden zusätzlich zu den Daten aus SHIP-TREND-0, Daten aus SHIP-1 bzw. SHIP-2 verwendet. In diesen beiden Studienwellen wurden ebenfalls Daten zum Knochenumbau (SHIP-1: BTM-Konzentrationen) bzw. zur Knochenstruktur (SHIP-2: QUS-Messungen) erhoben. Daher setzte sich die Studienpopulation, in welcher eine Abhängigkeit zwischen einzelnen SNPs in *CHI3L1* und den BTM-Konzentrationen untersucht wurde, aus allen SHIP-1 und SHIP-TREND-0 Teilnehmern zusammen ($n$ = 7720). Nach Ausschluss von Probanden mit fehlender Genotypisierung sowie fehlenden oder extrem hohen BTM-Konzentrationen blieben für die Analysen 7190 Datensätze übrig (Studienpopulation 2).

Die dritte Studienpopulation, in der die Assoziation zwischen der genetischen Variation in *CHI3L1* und den QUS-basierten Parametern untersucht wurde, bestand zunächst aus allen SHIP-2 und SHIP-TREND-0 Teilnehmern ($n$ = 6753), wovon nach Ausschluss von Probanden mit fehlender Genotypisierung oder QUS-Messung 5777 Datensätze übrig blieben (Studienpopulation 3).

### 2.3 Erhebung der Studiendaten

Im Rahmen der SHIP-Studienerhebungen wurden die Probanden einer Vielzahl von medizinischen Untersuchungen und umfangreichen computergestützten Interviews unterzogen. In individuellen Gesprächen wurden von den Probanden sozio-demografische Hintergründe und Lebensgewohnheiten erfasst und eine ausführliche medizinische

Anamnese erhoben. Die Medikation der Studienteilnehmer wurde dokumentiert und folgende Substanzen in dieser Arbeit als den Knochenstoffwechsel beeinflussend definiert: Bisphosphonate (Anatomisch-Therapeutisch-Chemisches Klassifikationssystem (ATC) M05BA-BB), selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (ATC G03XC), Nebenschilddrüsen-hormone und -analoga (ATC H05AA), systemisch eingenommene Glukokortikoide (ATC H02AB, H02BX) , nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR; ATC M01, N02), orale Kontrazeptiva (ATC G03A) sowie Medikamente der menopausalen Hormontherapie (ATC G03C, G03D, G03F). Der menopausale Status wurde anhand der Selbstauskunft der Teilnehmerinnen bzw. anhand des Alters der Frauen definiert. Frauen, welche jünger als 40 Jahre alt waren und Frauen zwischen 40 und 60 Jahren, die über einen bestehenden Menstrualzyklus berichteten, wurden als prämenopausal definiert, alle anderen als postmenopausal. Ein Diabetes mellitus wurde bei einer selbst berichteten ärztlich gestellten Diagnose, bei Einnahme von Antidiabetika oder bei einem HbA1c ≥ 6,5 % bzw. einer Spontan-Glukose-Konzentration im Serum ≥ 11,1 mmol/l definiert. Der Taillenumfang wurde mit Hilfe eines unelastischen Bandes, welches mittig zwischen dem unteren Rippenbogen und dem Beckenkamm um den Körper gelegt wurde, bestimmt.

### 2.4 Labormessungen

In jeder SHIP-Untersuchungswelle wurde allen einwilligenden Studienteilnehmern venöses Blut entnommen und die gewonnenen Proben im Anschluss bei -80 °C gelagert. In den Plasmaproben von 501 SHIP-TREND-0 Teilnehmern wurden nach Herstellerangaben mittels eines *Bead*-basierten Assays (Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Assay Panel 1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) in Kombination mit der FLEXMAP3D$^{TM}$ Technologie (Luminex Corp.) die Konzentrationen von 31 verschiedenen inflammatorisch wirksamen Proteinen inklusive YKL-40 bestimmt. Weitere Details zur Messung sind im publizierten Manuskript angegeben.[31] Es stellte sich heraus, dass sowohl die Position der Proben auf der 96-Well-Titerplatte als auch die Thrombozytenzahl im Plasma einen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen hatten. Aus diesem Grund wurden die beiden Parameter in den nachfolgenden statistischen Analysen als Kovariaten berücksichtigt. Die Serumkonzentrationen von PINP und CTX wurden mit dem IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyser (Immunodiagnostic System, Frankfurt am Main, Deutschland) in SHIP-1

und SHIP-TREND-0 bestimmt.[32] Die 25-Hydroxy-Vitamin D (25OHD) Konzentration wurde ebenfalls mit dem IDS-iSYS System gemessen. Das hochsensitive C-reaktive Protein (hsCRP) wurde am Dimension Vista (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) bestimmt. Die Konzentrationen der Sexualhormone Testosteron und Östradiol wurden im Rahmen von SHIP-TREND-0 massenspektrometrisch mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ermittelt. Weitere Informationen zu den Labormethoden finden sich im publizierten Manuskript.[31]

### 2.5 QUS-Messungen

In den Studienwellen SHIP-2 und SHIP-TREND-0 wurden QUS-Messungen an der Ferse (*Os calcaneus*) der Probanden durchgeführt.[33] Studienteilnehmer mit Kontraindikationen wie Implantaten, Prothesen, Amputationen, offenen Wunden oder Infektionen im oder unterhalb des Knies wurden von den Messungen ausgeschlossen. Für Probanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung im Rollstuhl saßen, deren Füße für die Messung nicht korrekt platziert werden konnten oder die von relevanten Verletzungen oder Operationen unterhalb des Knies in den letzten 12 Monaten vor der Untersuchung berichteten, wurden erhobene Messwerte vor der Analyse verworfen.

Die QUS-Messungen wurden an beiden Füßen mit dem Ultrasonometer Achilles InSight (GE Medical Systems Ultrasound, GE Healthcare, USA) durchgeführt. Der Ablauf der Messung wird im Folgenden kurz beschrieben: Zunächst wurde der Fuß des sitzenden Probanden auf der Fußplatte des Geräts platziert. Die Ferse wurde dabei zwischen zwei mit Wasser gefüllten Membranen in Position gehalten. Ein Schallkopf auf einer Seite der Ferse sendete Schallwellen aus, die durch das Wasser und die Ferse des Studienteilnehmers drangen. Ein Sensor auf der gegenüberliegenden Seite der Ferse empfing die Schallwellen und wandelte diese in ein elektrisches Signal um. Auf diese Weise wurde neben der Schallgeschwindigkeit (*speed of sound*, SOS) auch die frequenzabhängige Dämpfung der Schallwellen (*broadband ultrasound attenuation*, BUA) gemessen, wobei eine höhere Schallgeschwindigkeit sowie eine stärkere Schalldämpfung für dichteres Knochengewebe sprechen. Die beiden Werten ermöglichen die Berechnung des sogenannten *Stiffness index,* einem Maß für die Knochenfestigkeit, nach folgender Formel:

$$\textit{Stiffness index} = (0{,}67 \times \text{BUA}) + (0{,}28 \times \text{SOS}) - 420$$

Zur Einschätzung des osteoporotischen Frakturrisikos wurde der individuelle *Stiffness index* mit den Ergebnissen einer jungen gesunden Referenzpopulation (in der Software des Geräts hinterlegt) verglichen.[33] Die QUS-Messungen wurden an beiden Füßen durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurden die Daten des Fußes mit dem geringeren *Stiffness index* genutzt. SOS, BUA und der *Stiffness index* werden als QUS-basierte Parameter zusammengefasst.

### 2.6 Genotypisierung und Auswahl der SNPs

Im Rahmen der SHIP-Studie wurde das Genom der SHIP- und SHIP-TREND-Teilnehmer mit Arrays der Firmen Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, USA) oder Illumina (San Diego, Kalifornien, USA) gemäß der Standardprotokolle der Hersteller typisiert. Basierend auf veröffentlichten Daten[8] wurden 44 SNPs innerhalb der 40 kb *downstream*- und 100 kb *upstream*-Region des *CHI3L1*-Genlocus ausgewählt und ihre Zusammenhänge mit der Konzentration von YKL-40, den BTMs und den QUS-basierten Parametern untersucht. Der SNP rs4950928 wurde dabei als *Lead*-SNP für die nachfolgenden Analysen verwendet, da dieser eine starke Assoziation zur Konzentration von YKL-40 aufweist, die bereits mehrfach beschrieben wurde.[8,9] Details zur Genotypisierung, den Qualitätskontrollen, der Imputation sowie eine vollständige Übersicht der 44 untersuchten SNPs sind dem veröffentlichten Manuskript zu entnehmen.[31]

### 2.7 Statistische Analysen

Generelle Charakteristika der Studienpopulation 1 wurden für Männer und Frauen getrennt beschrieben. Kontinuierliche Daten wurden als Median (1.-3. Quartil), nominale Daten als Anteile angegeben. Gruppenunterschiede zwischen den Geschlechtern wurden mittels Kruskal-Wallis- (kontinuierliche Daten) bzw. Chi-Quadrat-Test (nominale Daten) auf statistische Signifikanz geprüft. Wenn nicht anders angegeben, wurden p-Werte $< 0{,}05$ als statistisch signifikant definiert.

In Studienpopulation 1 wurden geschlechtsspezifische Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration im Plasma und den BTM-Konzentrationen sowie den QUS-basierten Parametern mittels linearer Regressionsmodelle analysiert. Die YKL-40- und BTM-Konzentrationen wurden hierfür, sowie in allen weiteren Regressionsmodellen, $log_2$-tranformiert. Aus den linearen Regressionsmodellen wurden β-Koeffizienten mit den zugehörigen Standardfehlern und p-Werten berechnet. Die Modelle wurden für die folgenden Parameter adjustiert: Alter, Taillenumfang, Raucherstatus, 25OHD-Konzentration, Einnahme von Analgetika, Plattenposition der Proben während der Messungen sowie Thrombozytenzahl.

In einer ersten Sensitivitätsanalyse wurde ein möglicher Einfluss der Sexualhormone auf die Assoziation zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel geprüft. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Knochenstoffwechsel sind bekannt[34,35] und eine zusätzliche Adjustierung der Hauptmodelle für Testosteron und Östradiol daher naheliegend. Des Weiteren wurden die Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration und der Testosteron- bzw. Östradiolkonzentration in linearen Regressionsmodellen, adjustiert für Alter, Taillenumfang, Raucherstatus, Plattenposition und Thrombozytenzahl, untersucht. In einer zweiten Sensitivitätsanalyse wurden die linearen Regressionsmodelle zusätzlich für hsCRP, als klassischen Marker inflammatorischer Reaktionen, adjustiert. Auch hier wurde die Assoziation zwischen der YKL-40- und der hsCRP-Konzentration mittels eines linearen Regressionsmodells untersucht, welches für das oben genannte Parameterset adjustiert wurde. Abschließend wurden die Zusammenhänge zwischen YKL-40 und 30 weiteren inflammatorischen Markern mittels Spearman-Korrelationsanalysen bewertet.

Um einen Hinweis auf das Vorliegen eines Kausalzusammenhangs zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel zu erhalten, wurde ein *Mendelian Randomization* (Mendelsche Randomisierung) Ansatz genutzt.[36] Bei dieser Methode wird zunächst ein genetischer Marker (beispielsweise ein SNP) gewählt, der mit einem Merkmal (der *Exposition*) assoziiert ist. Anschließend wird geprüft, ob dieser Marker auch mit der untersuchten Erkrankung bzw. den krankheitsspezifischen Parametern (dem *Outcome*) in Zusammenhang steht. Da die Studienteilnehmer in Hinblick auf den genetischen Marker aufgrund der zufälligen Verteilung der Allele von Vater und Mutter randomisiert sind, können kausale Zusammenhänge zwischen *Exposition* und *Outcome* detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation zwischen der genetischen Variation im *Lead*-SNP rs4950928 und der YKL-40-Konzentration als *Exposition* (Studienpopulation 1) bzw. den BTM-Konzentrationen (Studienpopulation 2) und den QUS-basierten Parametern (Studienpopulation 3) als *Outcome* analysiert. Dazu wurden zunächst geschlechtsspezifische Boxplots für die *Exposition* und *Outcomes* in Abhängigkeit vom Genotyp des *Lead*-SNPs erstellt. Mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließender Bonferroni-Korrektur wurden paarweise Gruppenvergleiche durchgeführt. Anschließend wurde mittels linearer Regressionsmodelle das Vorliegen der oben genannten Assoziationen geprüft. Aus diesen Modellen wurden ß-Koeffizienten mit Standardfehlern und p-Werten angegeben. Modelle, welche die Assoziation zwischen der genetischen Variation und der YKL-40-Konzentration untersuchten, wurden für das Alter, die Plattenposition der Proben während der YKL-40-Messungen und die Thrombozytenzahl adjustiert. Modelle, welche den Einfluss der genetischen Variation auf die BTM-Konzentrationen bzw. die QUS-basierten Parameter untersuchten, wurden für das Alter und die Studienwelle adjustiert. Alle Modelle wurden im Anschluss an die Analyse zum *Lead*-SNP für alle anderen 43 SNPs wiederholt. Um den Einfluss des multiplen Testens zu beachten, wurden die p-Werte durch das Benjamini-Hochberg-Prozedere korrigiert (*false discovery rate* (FDR) = 5%). Alle statistischen Analysen wurden mittels der SAS 9.4 Software (SAS Institute Inc., Cary, New York City, USA) durchgeführt.

# 3. Ergebnisse

### 3.1 Charakteristika der Studienpopulation

Die allgemeinen Charakteristika der 382 SHIP-TREND-0 Teilnehmer aus Studienpopulation 1 sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1** - Charakteristika der Studienpopulation 1 getrennt nach Geschlecht

| Charakteristika | Männer (*n* = 201) | Frauen (*n* = 181) | p-Wert |
|---|---|---|---|
| Alter [Jahre] | 49 (40 - 61) | 53 (43 - 60) | 0,12 |
| Postmenopausale Frauen [%] | - | 57,5 | |
| Taillenumfang [cm] | 93,0 (85,6 -103,0) | 82,1 (75,2 - 90,1) | < 0,01 |
| Aktuelle Raucher [%] | 24,4 | 10,4 | 0,36 |
| Einnahme von Analgetika [%] | 3,98 | 7,73 | 0,12 |
| Thrombozyten [Gpt/l] | 205 (176 - 233) | 237 (200 - 272) | < 0,01 |
| 25-Hydroxy-Vitamin D [ng/ml] | 24,0 (17,4 - 31,3) | 23,1 (16,6 - 32,6) | 0,86 |
| Testosteron [nmol/l] | 17,5 (14,3 - 20,3) | 0,79 (0,61 - 1,06) | < 0,01 |
| Östradiol [nmol/l]* | 74,0 (59,0 - 89,0) | 272,6 (120,4 - 562,2) | < 0,01 |
| hsCRP [mg/l] | 0,90 (0,47 - 2,08) | 1,24 (0,55 - 3,52) | 0,04 |
| YKL-40 [ng/ml] | 9,3 (7,4 - 11,0) | 8,8 (7,1 - 10,5) | 0,19 |
| *Stiffness index* | 97 (85 - 109) | 90 (80 - 99) | < 0,01 |
| PINP [ng/ml] | 46,7 (37,1 - 58,0) | 46,4 (34,7 - 58,2) | 0,51 |
| CTX [ng/ml] | 0,29 (0,20 - 0,39) | 0,25 (0,16 - 0,36) | 0,01 |

Die angegebenen Werte entsprechen dem Median (1. - 3. Quartil) bzw. dem prozentualen Anteil. Gruppenunterschiede wurden mittels Chi-Quadrat- bzw. Kruskal-Wallis-Test bestimmt. *n*, Anzahl der Studienteilnehmer; hsCRP, hochsensitives C-reaktives Protein; CTX, *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen*; PINP, *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen*. *Die Östradiolkonzentration wurde bei 176 Männern und 99 Frauen bestimmt.

Innerhalb dieser Studienpopulation wiesen Frauen einen signifikant kleineren Taillenumfang ($p < 0,01$) sowie höhere Thrombozyten- ($p < 0,01$) und hsCRP-Konzentrationen ($p = 0,04$) im Vergleich zu Männern auf. Zudem wurden bei den Frauen signifikant niedrigere Testosteron- und höhere Östradiolkonzentrationen (jeweils $p < 0,01$) gemessen. Hinsichtlich Knochenfestigkeit und -stoffwechsel waren der *Stiffness index* ($p < 0,01$) und die

CTX-Konzentration (p = 0,01) bei den Frauen geringer als bei den Männern. Bezüglich der YKL-40-Konzentration wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede beobachtet. Die Verteilung der YKL-40-Konzentration ist in Abbildung 2 dargestellt.

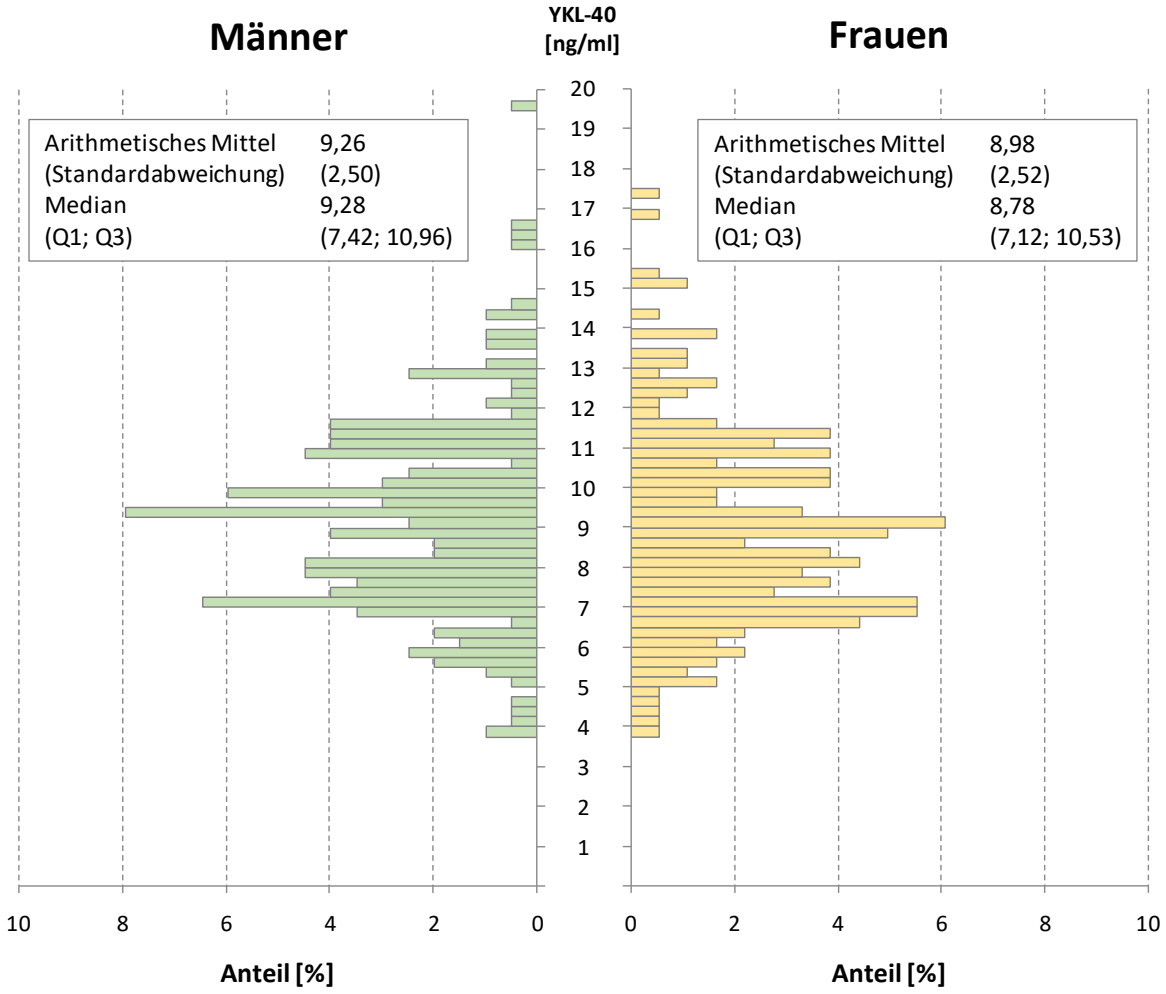



**Abbildung 2** - Verteilung der YKL-40-Konzentration bei 201 männlichen und 181 weiblichen SHIP-TREND-0 Teilnehmern

### 3.2 Zusammenhang zwischen YKL-40 und den BTMs sowie QUS-basierten Parametern

Mit Hilfe adjustierter linearer Regressionsmodelle wurden geschlechtergetrennte Analysen hinsichtlich der Assoziation zwischen YKL-40 und den BTMs sowie den QUS-basierten Parametern durchgeführt (Tabelle 2). Bei Frauen zeigte sich eine positive Assoziation zwischen YKL-40 und dem Knochenabbaumarker CTX sowie inverse Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration und allen QUS-basierten Parametern. Somit steht eine erhöhte

YKL-40-Konzentration bei Frauen mit einem erhöhten Knochenabbau sowie einer verminderten Knochenfestigkeit in Zusammenhang. Die Ergebnisse der Assoziationsanalysen zwischen der YKL-40-Konzentration und den QUS-basierten Parametern BUA und SOS zeigten sich analog zum *Stiffness index* und finden sich im Manuskript. In der Gruppe der männlichen Studienteilnehmer konnten keine signifikanten Assoziationen gefunden werden.

**Tabelle 2** - Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration ($log_2$-transformiert) und den BTMs ($log_2$-transformiert) bzw. dem *Stiffness index*

| ***Outcome*** | **Männer** | | | **Frauen** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **β-Koeffizient** | **SE** | **p-Wert** | **β-Koeffizient** | **SE** | **p-Wert** |
| PINP* | -0,029 | 0,087 | 0,74 | 0,148 | 0,103 | 0,15 |
| CTX* | 0,088 | 0,128 | 0,49 | 0,377 | 0,159 | 0,02 |
| *Stiffness index* | 3,801 | 2,905 | 0,19 | -9,122 | 2,958 | < 0,01 |

Ergebnisse geschlechtergetrennter linearer Regressionsmodelle, adjustiert für Alter, Taillenumfang, Raucherstatus, 25-Hydroxy-Vitamin D, Einnahme von Analgetika, Thrombozytenzahl und Plattenposition der Proben bei den Konzentrationsbestimmungen. SE, Standardfehler; CTX, *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen*; PINP, *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen.* *$log_2$-transformiert

Die zusätzliche Adjustierung der Modelle für die Testosteron- und Östradiolkonzentration in der ersten Sensitivitätsanalyse veränderte die Ergebnisse kaum. Nur die Assoziation zwischen der YKL-40-Konzentration mit CTX in der Gruppe der Frauen lag nun knapp über dem festgelegten Signifikanzniveau (p = 0,06, siehe Steinke *et al.*[31]). Bei der anschließenden Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der YKL-40-Konzentration und den Sexualhormonen, zeigten sich weder zur Testosteron- (Männer: p = 0,15; Frauen: p = 0,40) noch zur Östradiolkonzentration (Männer: p = 0,20; Frauen: p = 0,16) statistisch signifikante Assoziationen.

### 3.3 Zusammenhang zwischen YKL-40 und Entzündungsparametern

Die zusätzliche Adjustierung der zuvor beschriebenen linearen Regressionsmodelle für die hsCRP-Konzentration als klassischen Marker akuter inflammatorischer Reaktionen im Rahmen der zweiten Sensitivitätsanalyse hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse (siehe Steinke *et al.*[31]). Ebenso konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen YKL-40 und der

hsCRP-Konzentrationen beschrieben werden (Männer: p = 0,89; Frauen: p = 0,89). Jedoch zeigten sich im Rahmen von Spearman-Korrelationsanalysen zwischen der YKL-40-Konzentration und der Konzentration 30 weiterer inflammatorisch wirksamer Proteine mehrere signifikante Zusammenhänge (siehe Steinke *et al.*[31]). Eine Auswahl von Zytokinen, welche in den Analysen signifikant mit der YKL-40-Konzentration assoziiert waren, liefert Tabelle 3. Die vollständige Tabelle ist im Anhang des publizierten Artikels zu finden.[31]

**Tabelle 3** - Spearman-Korrelation zwischen der YKL-40-Konzentration und der Konzentration verschiedener Zytokine; Auswahl signifikanter Ergebnisse (p<0,0001)

| Zytokin | Männer | | Frauen | |
|---|---|---|---|---|
| | ***n*** | $r_S$ | ***n*** | $r_S$ |
| IFN-α2 | 201 | -0,322 | 181 | -0,336 |
| IFN-γ | 201 | -0,382 | 181 | -0,313 |
| IL-10 | 201 | 0,296 | 181 | 0,319 |
| IL-12 (p40) | 201 | -0,445 | 181 | -0,451 |
| IL-29/IFN-λ1 | 201 | -0,377 | 180 | -0,333 |
| IL-35 | 201 | -0,375 | 181 | -0,338 |
| Osteopontin | 200 | 0,474 | 181 | 0,594 |
| APRIL/TNFSF13 | 201 | 0,367 | 181 | 0,501 |

*n*, Anzahl der Studienteilnehmer; $r_S$, Spearman'scher Korrelationskoeffizient; IFN, Interferon; IL, Interleukin; APRIL, *a proliferation inducing ligand*; TNFSF, *tumor necrosis factor ligand superfamily member*

### 3.4 Zusammenhang zwischen YKL-40 und der genetischen Variation in *CHI3L1*

Ob die ausgewählten genetischen Varianten im *CHI3L1*-Genlocus einen Einfluss auf die Plasmakonzentration von YKL-40 haben, wurde zunächst anhand des *Lead*-SNPs rs4950928 untersucht (Abbildung 3). Sowohl männliche als auch weibliche Träger des Genotyps CC (*n* = 238) zeigten signifikant höhere YKL-40-Konzentrationen als heterozygote GC-Träger (*n* = 134). Männliche CC-Träger (*n* = 128) wiesen außerdem signifikant höhere YKL-40-Konzentrationen auf als Teilnehmer mit dem homozygoten Genotyp GG (*n* = 5).

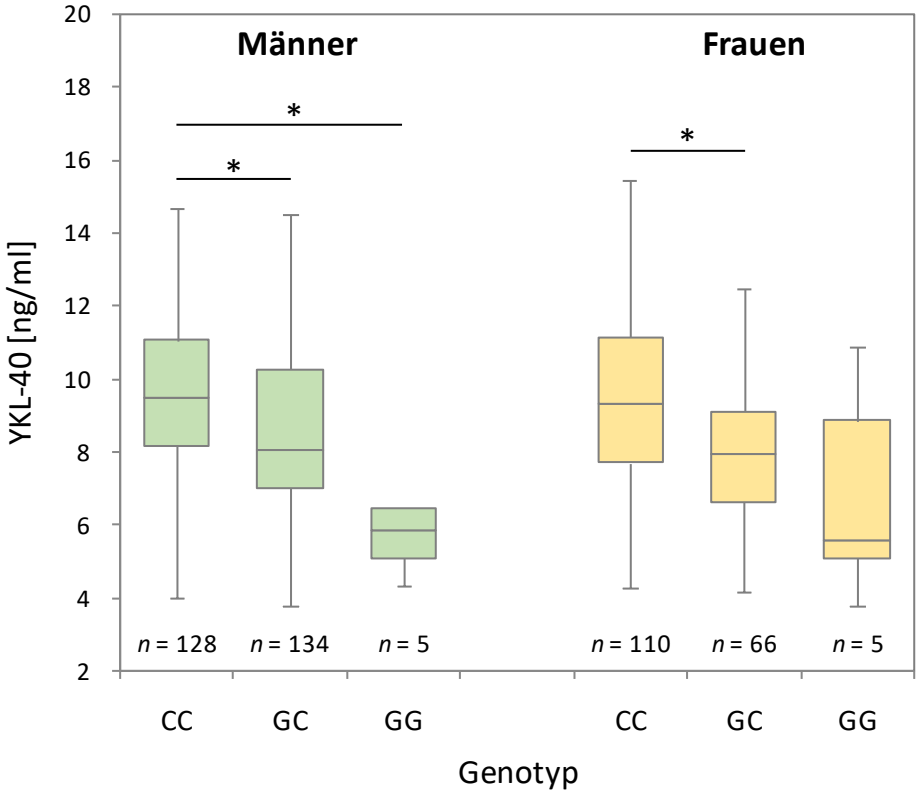



**Abbildung 3** - Geschlechtergetrennte Boxplots für die YKL-40-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom Genotyp des *Lead*-SNPs rs4950928

Paarweise Gruppenunterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test untersucht. *n*, Anzahl der Studienteilnehmer. * gibt signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Korrektur an ($p < 0{,}0167$).

Neben dem *Lead*-SNP wurde ein Panel aus 43 weiteren SNPs analysiert. In der untersuchten Kohorte war auch der SNP rs946263 mit der YKL-40-Konzentration bei Männern und Frauen assoziiert (FDR < 0,05). Zwei weitere SNPs (rs946261 und rs880633, beide mit FDR < 0,05) standen mit der YKL-40-Konzentration bei Frauen, nicht jedoch bei Männern in Zusammenhang. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 4. Die Ergebnisse aller statistischen Analysen in Bezug auf die untersuchten genetischen Varianten sind dem Anhang der Publikation Steinke *et al.*[31] zu entnehmen.

**Tabelle 4**- Assoziationen zwischen der YKL-40-Plasmakonzentration ($log_2$-transformiert) und den SNPs im *CHI3L1*-Genlocus

| SNP | *Non-effect-allele* | *Effect-allele* | Männer | | | Frauen | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ß-Koeffizient | SE | FDR | ß-Koeffizient | SE | FDR |
| rs4950928 | C | G | -0,219 | 0,049 | <0,001 | -0,256 | 0,048 | < 0,001 |
| rs946263 | A | G | -0,181 | 0,052 | <0,1 | -0,239 | 0,051 | < 0,001 |
| rs946261 | T | C | -0,103 | 0,042 | 0,12 | -0,158 | 0,041 | < 0,01 |
| rs880633 | C | T | -0,075 | 0,037 | 0,23 | -0,119 | 0,040 | 0,04 |

Ergebnisse der geschlechtergetrennten linearen Regressionsmodelle, welche für das Alter, die Thrombozytenzahl und die Plattenposition der Probe bei den Konzentrationsbestimmungen adjustiert wurden. Aufgelistet sind jene vier der insgesamt 44 untersuchten SNPs, welche signifikante Assoziationen zeigten (FDR < 0,05). SE, Standardfehler; SNP, *single nucleotide polymorphism*; FDR, *false discovery rate*

### 3.5 Zusammenhang zwischen der genetischen Variation in *CHI3L1* und den BTMs sowie QUS-basierten Parametern

Um Rückschlüsse auf die Kausalität der zuvor erhobenen Ergebnisse zu ziehen, wurde die Assoziation zwischen dem *Lead*-SNP rs4950928 und den BTMs bzw. den QUS-basierten Parametern in einem *Mendelian Randomization* Ansatz untersucht. In Studienpopulation 2 (*n* = 7190) zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem *Lead*-SNP und den BTM-Konzentrationen, der einer Korrektur für multiples Testen standhielt (Tabelle 5). Ebenso konnte in Studienpopulation 3 (*n* = 5777) kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem *Lead*-SNP und den QUS-basierten Parametern nachgewiesen werden.

Schließlich wurden die Assoziationen zwischen 43 weiteren in dieser Arbeit untersuchten SNPs innerhalb des *CHI3L1*-Genlocus und den BTMs bzw. QUS-basierten Parametern untersucht. Auch in diesen Analysen zeigte keiner der untersuchten SNPs eine signifikante Assoziation mit der BTM-Konzentration oder den QUS-basierten Parametern bei einer FDR-Schwelle von < 0,05. Die vollständigen Ergebnisse der Untersuchungen finden sich im Anhang des veröffentlichten Manuskripts.[31]

**Tabelle 5** - Assoziationen zwischen dem *Lead*-SNP rs4950928 und den BTMs bzw. dem *Stiffness index*

| ***Outcome*** | **Männer** | | | **Frauen** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ß-Koeffizient** | **SE** | **FDR** | **ß-Koeffizient** | **SE** | **FDR** |
| PINP* | -0,017 | 0,016 | 0,68 | 0,018 | 0,018 | 0,71 |
| CTX* | -0,076 | 0,026 | 0,33 | 0,058 | 0,027 | 0,47 |
| *Stiffness index* | 0,551 | 0,596 | 0,71 | 0,566 | 0,503 | 0,68 |

Ergebnisse der geschlechterspezifischen linearen Regressionsmodelle, welche für das Alter und die Studie adjustiert wurden. SE, Standardfehler; CTX, *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen*; PINP, *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen*; FDR, *false discovery rate.* *$\log_2$-transformiert

# 4. Diskussion

## 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden erstmals in einer populationsbasierten Studie die Assoziationen zwischen dem Chitinase-ähnlichen Protein YKL-40 bzw. der genetischen Variation im *CHI3L1*-Genlocus und Markern des Knochenumbaus (BTMs) und der Knochenstruktur (QUS-basierte Parameter) untersucht. Dabei zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen der Konzentration von YKL-40 und allen QUS-basierten Parametern sowie eine positive Assoziation zwischen der Konzentration von YKL-40 und dem Knochenresorptionsmarker CTX. Interessanterweise konnten diese Assoziationen nur bei Frauen nachgewiesen werden. Genetische Analysen zeigten zudem, dass vier der 44 untersuchten SNPs innerhalb des *CHI3L1*-Genlocus mit der YKL-40-Plasmakonzentration assoziiert waren. Jedoch stand keiner der untersuchten SNPs mit den BTMs oder den QUS-basierten Parametern in Relation.

## 4.2 Der Bezug von YKL-40 zum Knochenstoffwechsel

Verschiedene vorangegangene Arbeiten beschäftigten sich mit dem Zusammenhang zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel.[20–22,37] In einer der wenigen klinischen Studien in diesem Kontext fanden die Forscher um Bromińska *et al*.[37] eine positive Assoziation zwischen YKL-40 und CTX sowie PINP bei Patienten mit obstruktiver Schlafapnoe. Sie vermuteten deshalb, dass YKL-40 sowohl die Knochenformation als auch -resorption beeinflussen könnte.[37] In einer weiteren klinischen Studie wurde ein gestörter Knochenumbau bei Patienten mit multiplem Myelom beschrieben, welche zudem erhöhte YKL-40-Konzentrationen im Blut aufzeigten.[22] Die genannten Studien[22,37] beschäftigten sich jedoch nur mit dem Zusammenhang zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel im Rahmen definierter Krankheitsbilder. In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmals eine Verbindung zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel bei Frauen aus der Allgemeinbevölkerung nachgewiesen werden.

### 4.3 Der Einfluss der genetischen Variation in *CHI3L1* auf die Knochenstruktur, den Knochenumbau und die YKL-40-Konzentration

Hinweise darauf, dass die beobachteten Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration und der Knochengesundheit kausal sein könnten, lieferte eine *in vitro* Studie von Di Rosa *et al*.[21]. Mit ihren Untersuchungen zeigten die Forscher, dass das *Silencing* von *CHI3L1* in Osteoklasten zu einer signifikant geringeren Knochenresorptionsaktivität führt.[21] Um aus den vorliegenden SHIP-Daten auf Kausalität der zuvor beobachteten Assoziationen schließen zu können, wurde ein *Mendelian Randomization* Ansatz gewählt. Im Einklang mit früheren Studien[8,9,21,38] wurden vier SNPs im *CHI3L1* Genlocus bestätigt, welche mit der YKL-40-Konzentration assoziiert waren. Der *Lead*-SNP rs4950928 zeigte dabei den stärksten Einfluss auf die YKL-40-Konzentration.[31] Eine US-amerikanische Studie von Ober *et al.*[9] lässt vermuten, dass dieser SNP für 9,4 % der Varianz in der YKL-40-Serumkonzentration verantwortlich ist. Wie bereits in dieser Studie beschrieben, stand das Auftreten des Minor Allels auch in der vorgelegten Arbeit mit niedrigeren YKL-40-Konzentrationen in Zusammenhang.

Im Gegensatz zur YKL-40-Konzentration zeigten die untersuchten SNPs jedoch keine Assoziation zu den BTMs bzw. den QUS-basierten Parametern im untersuchten SHIP Kollektiv. Die genetische Variation in *CHI3L1* scheint folglich keinen direkten Einfluss auf die untersuchten Faktoren des Knochenumbaus und der Knochenstruktur zu haben. Ergebnisse der in der Literatur beschriebenen *in vitro* Studien[20,21], welche nur isolierte Zellpopulationen betrachtet haben, lassen sich also möglicherweise nicht direkt auf den Menschen übertragen.

### 4.4 Der Zusammenhang zwischen YKL-40 und Entzündungsreaktionen

Statt eines kausalen Zusammenhangs zwischen YKL-40 und der Knochenresorption wären komplexe übergeordnete Prozesse denkbar, welche beide Faktoren beeinflussen und die beobachtete querschnittliche Assoziation erklären. Ein subklinisches inflammatorisches Geschehen könnte eine solche Rolle erfüllen. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss der hsCRP-Konzentration auf die beobachteten Assoziationen betrachtet. Interessanterweise veränderte eine Adjustierung für diesen Entzündungsmarker die Ergebnisse kaum. Ebenso konnte keine Assoziation mit der YKL-40-Konzentration

nachgewiesen werden. Allerdings handelt es sich bei hsCRP um einen klinischen Marker, welcher als Akute-Phase-Protein insbesondere akute inflammatorische Prozesse charakterisiert. In der für die Analysen genutzten Studienpopulation zeigte sich die hsCRP-Konzentration im physiologischen Bereich < 5 mg/l (Median Männer: 0,90 mg/l, Frauen: 1,24 mg/l, Tabelle 1). Eine vorliegende Assoziation ist bei diesen basalen Werten möglicherweise nicht nachweisbar. Jedoch deuten auch die Ergebnisse anderer Forscher darauf hin, dass YKL-40 und hsCRP durch unabhängige Mechanismen reguliert werden und nicht miteinander in Zusammenhang stehen.[39] Die Bewertung des Entzündungsmarkers bei den hier vorliegenden Untersuchungen ist deshalb vermutlich wenig zielführend.

Bekannt ist jedoch, dass proinflammatorische Zytokine die Sekretion von YKL-40 durch Fibroblasten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Zellen fördern.[2,3] Beispielsweise steigt die YKL-40-Konzentration bei gesunden männlichen Probanden innerhalb von 24 h nach einer IL-6-Infusion an.[16] Weiterhin wird vermutet, dass die Regulation von YKL-40 und anderen Zytokinen einem gemeinsamen Mechanismus unterliegt. So wurden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöhte Serumkonzentrationen von YKL-40 nachgewiesen.[17] Diese waren zudem mit der Konzentration von TNF-α und IL-1β assoziiert.[17] Im Rahmen osteoimmunologischer Forschung konnte wiederum gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1β und IL-6 die Bildung von Proteasen fördern, welche am Abbau von Gewebe wie Knochen beteiligt sind.[24] IL-6 vermittelt zudem die Freisetzung von Glukokortikoiden, die ebenfalls zum Verlust der Knochensubstanz beitragen.[40] Des Weiteren fördern Leukozyten und Zytokine den entzündlichen Knochenabbau indem sie zum einen die Differenzierung von Osteoklasten fördern und zum anderen Osteoblasten, welche an der Bildung der Knochensubstanz beteiligt sind, inhibieren.[24,28]

Das Zusammenspiel zwischen dem *Receptor Activator of NF-κB* (RANK) und dessen Liganden RANKL stellt einen Hauptmechanismus des Knochenumbaus dar.[24] RANKL wird insbesondere von aktivierten Osteoblasten gebildet. Das Protein bindet RANK auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen, wodurch deren Differenzierung und Aktivierung gefördert wird. Auf diese Weise wird der Knochenauf- und -abbau im Gleichgewicht gehalten. Im Rahmen verschiedener, insbesondere entzündlicher Erkrankungen kann dieses Gleichgewicht jedoch gestört und zugunsten der Osteoklastenaktivierung verschoben

werden. So gelten Zellen des Immunsystems, wie aktivierte T-Zellen und dendritische Zellen als Syntheseorte von RANKL.[25] Vor allem die gut untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β, IL-6 und IL-17 fördern die Bildung von RANKL und tragen zum Knochenabbau bei.[25,28] Sie stellen also möglicherweise wichtige Kovariaten innerhalb der hier durchgeführten Analysen dar. Leider wurden diese Parameter im Rahmen der SHIP-TREND-0 Studie nicht gemessen. Ihre Bestimmung könnte zur Aufklärung der Hintergründe der hier beschriebenen Assoziationen beitragen.

Neben der YKL-40-Konzentration wurden in SHIP-TREND-0 jedoch die Konzentrationen 30 weiterer inflammatorisch wirksamer Proteine erhoben. In Korrelationsanalysen zeigte sich, dass ein Großteil dieser Zytokine signifikant mit der YKL-40-Konzentration im Zusammenhang steht, was die Verbindung zwischen YKL-40 und der Immunantwort stützt.[31] Für einige dieser Zytokine wurden bereits Wechselwirkungen mit dem Knochenstoffwechsel beschrieben.[41–48] In der vorliegenden Arbeit bestätigten sich inverse Korrelationen zwischen der YKL-40-Konzentration und der Konzentration osteoprotektiver Zytokine wie IFN-α[41] und -γ[42], IL-12[43], IL-29[44] und IL-35[45] (Tabelle 3). Die Mechanismen mit denen die Zytokine in den Knochenstoffwechsel eingreifen sind dabei oft ähnlich und wirken synergistisch. In Hinblick auf IFN-α und -γ, IL-12 und IL-29 beziehen sie sich auf eine direkte Interaktion der RANKL-abhängigen Osteoklastendifferenzierung bzw. der nachfolgenden Signaltransduktionsprozesse, welche zur Aktivierung der Zellen führen würden.[41–44] Das antiinflammatorisch wirksame Zytokin IL-35 hingegen regulierte in Parodontitis Modellen bei Mäusen die $T_H17$-Antwort herunter und verringerte so die Bildung von Zytokinen, die den Knochenabbau fördern.[45]

Dem gegenüber stehen Zytokine, welche die Osteoklastenreifung und somit die Abbauprozesse von Knochengewebe fördern. Eine Studie von Hemingway *et al.*[46] zeigte, dass APRIL (*a proliferation inducing ligand*) die Osteoklastendifferenzierung und -reifung durch RANKL-unabhängige Mechanismen unterstützt. Das Glykoprotein Osteopontin hingegen vermittelt die Verankerung von Osteoklasten an der Knochenmatrix und reguliert dadurch die Migration und Aktivierung der Zellen.[47] Sowohl für APRIL als auch für Osteopontin zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante positive Korrelation mit der YKL-40-Konzentration (Tabelle 3).

Soweit bekräftigen die nachgewiesenen Assoziationen einen indirekten Zusammenhang zwischen YKL-40 und dem Knochenstoffwechsel. Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit jedoch auch, dass die YKL-40-Konzentration positiv mit IL-10 korreliert. IL-10 ist ein gut charakterisiertes antiinflammatorisches Zytokin, welches Entzündungsreaktionen durch die Suppression proinflammatorischer Zellen im physiologischen Gleichgewicht hält. Dabei wirkt es durch die Herunterregulierung von RANKL inhibitorisch auf die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten.[48] Eine positive Korrelation mit YKL-40 steht somit zunächst im Widerspruch zur Hypothese, dass YKL-40 invers mit knochenprotektiven Zytokinen assoziiert ist. Sie deutet jedoch gleichzeitig auf die Komplexität der Regulationsmechanismen inflammatorischer Prozesse hin, da die Bildung von IL-10 im Rahmen von Entzündungsreaktionen zusammen mit der Expression proinflammatorischer Moleküle stattfindet.

Insgesamt bekräftigen die vorliegenden Ergebnisse, dass YKL-40 ein proinflammatorisches Geschehen anzeigt und in dessen Rahmen gebildet wird. In diesem Zusammenhang treten schädigende Effekte auf den Knochenumbau auf, die aber nicht direkt von YKL-40 vermittelt werden. Die Aufklärung einzelner Regulationsmechanismen und wechselseitiger Abhängigkeiten zwischen den Zytokinen bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen.

### 4.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluss des Geschlechts auf die untersuchten Zusammenhänge deutlich. Zwar unterschieden sich die gemessenen YKL-40-Konzentrationen zwischen Männern und Frauen nicht signifikant voneinander, jedoch lassen die vorliegenden Daten vermuten, dass YKL-40 nur bei Frauen mit verringerten QUS-basierten Parametern und erhöhten Knochenabbaumarkern assoziiert ist. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Knochenstoffwechsel und Hormonhaushalt sind eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung.[34,35] Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen der YKL-40-Konzentration und der Testosteron- bzw. Östradiolkonzentration nachgewiesen werden. Auch die Adjustierung der genetischen Modelle für die Sexualhormone änderte die Ergebnisse kaum. Dies spricht zunächst gegen einen Einfluss der Hormone auf die berechneten Assoziationen. Zu beachten ist jedoch, dass von den 181 Frauen, für die die YKL-40-Konzentration zur Verfügung stand (Studienpopulation 1), die Östradiolkonzentration

nur bei 99 Frauen erhoben wurde. Die Zahl der verfügbaren Datensätze war somit stark eingeschränkt und die Aussagekraft der Analyse beschränkt. Zudem setzt sich die weibliche Studienpopulation aus prä- und postmenopausalen Frauen zusammen. Bekanntermaßen kann ein postmenopausal häufig auftretendes Östrogendefizit inflammatorische Prozesse, wie die Bildung von IL-6, fördern und zu einer Hyperaktivität von Osteoklasten führen.[34,49] In der in dieser Arbeit untersuchten Studienpopulation 1 wurden 77 Frauen als prä-, 104 als postmenopausal definiert. Aufgrund dieser begrenzten Zahl konnte der Einfluss eines postmenopausalen Östrogendefizits auf die beobachteten Assoziationen statistisch nicht sinnvoll untersucht werden. Zudem ist die Definition der Menopause in der vorliegenden Analyse nicht optimal, da sie ausschließlich auf dem Alter der Frauen und einem selbst-berichteten Menstruationszyklus basiert.

Insgesamt stellt sich die hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels komplex dar und ihre genaue Analyse übersteigt aufgrund einer begrenzten Probandenzahl die Möglichkeiten dieser Arbeit. Im Rahmen einer größeren Kohorte könnten prä- und postmenopausale Frauen jedoch separat analysiert werden.

### 4.6 Stärken der Studie

Die für diese Arbeit genutzten Datensätze entstammen der *Study of Health in Pomerania,* einem langjährig angelegten Projekt, bestehend aus drei populationsbasierten Kohorten aus dem Nord-Osten von Deutschland. Die Daten der beiden untersuchten Kohorten, welche im Rahmen ausführlicher Interviews, medizinischer Untersuchungen und Laboranalysen erhoben wurden, bieten die Möglichkeit umfassende statistische Berechnungen unter Einbeziehung verschiedenster konfundierender Variablen durchzuführen. Alle Messungen wurden nach standardisierten Protokollen durch geschulte Untersucher vorgenommen, um die Integrität der Daten zu gewährleisten. Die in dieser Arbeit genutzten Ergebnisse der ultrasonometrischen Untersuchung am Os calcaneus stellen zudem eine etablierte Methode in der Forschung dar, um das osteoporotische Frakturrisiko zu bestimmen.[50] Zudem liefert die Bestimmung der Konzentration von CTX sowie PINP im Blut einen guten Indikator für ablaufende Umbauprozesse des Knochengewebes.[30]

### 4.7 Limitationen der Studie

Eine wesentliche Limitation der hier vorgestellten Arbeit ist die Beschränkung der Messung der YKL-40-Konzentration auf eine verhältnismäßig kleine Untergruppe der SHIP-TREND-0 Teilnehmer. Aus dieser Subkohorte wurden zusätzlich Probanden mit einem Diabetes mellitus ausgeschlossen, da diese Erkrankung mit der YKL-40-Konzentration[39,51], inflammatorischen Prozessen[39] und einer veränderten Knochenmineralisierung[52] assoziiert ist. Auch Studienteilnehmer, welche zum Zeitpunkt der Datenerhebung Medikamente einnahmen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen, gingen nicht in die Analysen ein. Nachdem auch Datensätze mit extremen oder fehlenden Messwerten ausgeschlossen wurden, blieben nur 382 Probanden für die Studienpopulation 1 übrig. Diese wurden für die statistischen Analysen noch in Männer und Frauen unterteilt. Um die statistische Power zu erhöhen und zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse in einer weniger gesunden Populationsgruppe bestätigen, wären Untersuchungen in einer größeren Kohorte notwendig. Zudem umfassen alle hier untersuchten Studienpopulationen nur kaukasische Teilnehmer einer einzigen Region. Folglich lassen sich die Ergebnisse möglicherweise nicht auf die breite Bevölkerung mit anderen ethnischen Hintergründen übertragen.

### 4.8 Schlussfolgerung

Mit dieser Arbeit konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen der YKL-40-Konzentration in humanem Plasma und der Knochenstruktur sowie dem Knochenumbau in der Allgemeinbevölkerung beschrieben werden. Dabei ging eine hohe YKL-40-Konzentration mit erniedrigten QUS-basierten Parametern, welche als Marker für die Knochenfestigkeit fungieren, sowie einer gesteigerten Konzentration des Knochenabbaumarkers CTX bei Frauen einher. Weiterführende Analysen konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der genetischen Variation im *CHI3L1*-Genlocus, welche die Konzentration von YKL-40 im Plasma beeinflusst, und dem Knochenumbau bzw. der Knochenstruktur nachweisen. Die beobachteten querschnittlichen Assoziationen sind daher vermutlich nicht kausal. Eine erhöhte YKL-40-Konzentration könnte jedoch Folge einer systemischen Reaktion des Körpers sein und inflammatorische Prozesse anzeigen, die zu einem gesteigerten Knochenumsatz und verminderter Knochenfestigkeit beitragen.

# 5. Zusammenfassung

YKL-40 ist ein Chitinase-ähnliches Protein, welches vom Gen *chitinase-3-like protein 1* (*CHI3L1*) auf Chromosom 1 kodiert wird. Seine genaue Funktion ist bislang weitgehend unbekannt, Studien legen jedoch einen Zusammenhang zwischen YKL-40 und Prozessen des Gewebeumbaus sowie inflammatorischen Reaktionen nahe.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals die Assoziation von YKL-40 und der genetischen Variation in *CHI3L1* mit Markern der Knochenstruktur und des Knochenumbaus bei erwachsenen Männern und Frauen der Allgemeinbevölkerung untersucht. Die Daten für die Analyse stammen dabei aus zwei Kohorten der *Study of Health in Pomerania*: SHIP und SHIP-TREND. Zur Charakterisierung der Knochenstruktur wurden quantitative Ultraschall (QUS)-Untersuchungen an der Ferse durchgeführt. Als Knochenumbaumarker (*bone turnover markers*, BTMs) dienten zum einen das *intact amino-terminal propeptide of type I procollagen* (PINP), ein Marker für den Knochenaufbau, zum anderen das *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen* (CTX), welches mit dem Knochenabbau assoziiert ist.

Assoziationen zwischen der YKL-40-Plasmakonzentration und den QUS-basierten Parametern, BTM-Konzentrationen sowie 44 *single nucleotide polymorphisims* (SNPs) wurden bei 382 Probanden untersucht. Adjustierte lineare Regressionsmodelle zeigten eine inverse Assoziation von YKL-40 mit den QUS-basierten Parametern sowie eine positive Assoziation mit CTX bei Frauen. Zwei der untersuchten SNP waren mit der YKL-40-Konzentration bei Männern und Frauen assoziiert, zwei weitere nur bei Frauen. Nachfolgend wurde die Assoziation zwischen den SNPs und den QUS-basierten Parametern bzw. der BTM-Konzentration in größeren Gruppen aus 5777 bzw. 7190 Teilnehmern untersucht. Nach Korrektur für multiples Testen war jedoch keiner der untersuchten SNPs mit den QUS-basierten Parametern oder BTMs assoziiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die beobachteten Assoziationen zwischen der YKL-40-Konzentration und der Knochenstruktur bzw. dem Knochenumbau aufgrund des fehlenden Zusammenhangs in den genetischen Untersuchungen vermutlich nicht kausal sind. Die Analysen lassen jedoch annehmen, dass erhöhte YKL-40-Konzentrationen die Folge systemischer inflammatorischer Reaktionen sein könnten, welche möglicherweise für einen gesteigerten Knochenumsatz verantwortlich sind.

# 6. Literaturverzeichnis

[1] Kumar A, Zhang KYJ. Human Chitinases: Structure, Function, and Inhibitor Discovery. *Adv Exp Med Biol* 2019;1142:221–51.

[2] Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006;53(2):172–209.

[3] Capone M, Maggi L, Santarlasci V, et al. Chitinase 3-like-1 is produced by human Th17 cells and correlates with the level of inflammation in juvenile idiopathic arthritis patients. *Clin Mol Allergy* 2016;14:16.

[4] Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 2002;365(Pt 1):119–26.

[5] Faibish M, Francescone R, Bentley B, Yan W, Shao R. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol Cancer Ther* 2011;10(5):742–51.

[6] Johansen JS, Møller S, Price PA, Bendtsen F, Junge J, Garbarsch C, Henriksen JH. Plasma YKL-40: A New Potential Marker of Fibrosis in Patients with Alcoholic Cirrhosis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1997;32(6):582–90.

[7] Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992;7(5):501–12.

[8] Ridker PM, Chasman DI, Rose L, Loscalzo J, Elias JA. Plasma levels of the proinflammatory chitin-binding glycoprotein YKL-40, variation in the chitinase 3-like 1 gene (CHI3L1), and incident cardiovascular events. *J Am Heart Assoc* 2014;3(3):e000897.

[9] Ober C, Tan Z, Sun Y, et al. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 2008;358(16):1682–91.

[10] Berres M-L, Papen S, Pauels K, Schmitz P, Zaldivar MM, Hellerbrand C, Mueller T, Berg T, Weiskirchen R, Trautwein C, Wasmuth HE. A functional variation in CHI3L1 is associated with severity of liver fibrosis and YKL-40 serum levels in chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2009;50(2):370–6.

[11] Zhao X, Tang R, Gao B, et al. Functional variants in the promoter region of Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2007;80(1):12–8.

[12] Karalilova R, Kazakova M, Batalov A, Sarafian V. Correlation between protein YKL-40 and ultrasonographic findings in active knee osteoarthritis. *Med Ultrason* 2018;1(1):57–63.

[13] Deutschmann C, Roggenbuck D, Schierack P. The loss of tolerance to CHI3L1 - A putative role in inflammatory bowel disease? *Clin Immunol* 2019;199:12–7.

[14] Tong X, Wang D, Liu S, Ma Y, Li Z, Tian P, Fan H. The YKL-40 protein is a potential biomarker for COPD: a meta-analysis and systematic review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018;13:409–18.

[15] Lieder R, Sigurjonsson OE. The Effect of Recombinant Human Interleukin-6 on Osteogenic Differentiation and YKL-40 Expression in Human, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biores Open Access* 2014;3(1):29–34.

[16] Nielsen AR, Plomgaard P, Krabbe KS, Johansen JS, Pedersen BK. IL-6, but not TNF-α, increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine* 2011;55(1):152–5.

[17] Kazakova MH, Batalov AZ, Mateva NG, Kolarov ZG, Sarafian VS. YKL-40 and cytokines - a New Diagnostic Constellation in Rheumatoid Arthritis? *Folia Med (Plovdiv)* 2017;59(1):37–42.

[18] Tran HT, Lee I-A, Low D, Kamba A, Mizoguchi A, Shi HN, Lee CG, Elias JA, Mizoguchi E. Chitinase 3-like 1 synergistically activates IL6-mediated STAT3 phosphorylation in intestinal epithelial cells in murine models of infectious colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(5):835–46.

[19] Lee CG, Hartl D, Lee GR, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 2009;206(5):1149–66.

[20] Connor JR, Dodds RA, Emery JG, Kirkpatrick RB, Rosenberg M, Gowen M. Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization. *Osteoarthr Cartil* 2000;8(2):87–95.

[21] Di Rosa M, Tibullo D, Vecchio M, Nunnari G, Saccone S, Di Raimondo F, Malaguarnera L. Determination of chitinases family during osteoclastogenesis. *Bone* 2014;61:55–63.

[22] Mylin AK, Abildgaard N, Johansen JS, Heickendorff L, Kreiner S, Waage A, Turesson I, Gimsing P. Serum YKL-40: a new independent prognostic marker for skeletal complications in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2015;56(9):2650–9.

[23] Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2019;30(1):3–44.

[24] Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(3):234–50.

[25] Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology* 2016;62(2):128–37.

[26] Gough AKS, Lilley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *The Lancet* 1994;344(8914):23–7.

[27] Bravenboer N, Oostlander AE, van Bodegraven AA. Bone loss in patients with inflammatory bowel disease: cause, detection and treatment. *Current opinion in gastroenterology* 2021;37(2):128–34.

[28] Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med* 2013;23(1):43–63.

[29] Völzke H, Alte D, Schmidt CO, et al. Cohort profile: the study of health in Pomerania. *Int J Epidemiol* 2011;40(2):294–307.

[30] Szulc P, Naylor K, Hoyle NR, Eastell R, Leary ET. Use of CTX-I and PINP as bone turnover markers: National Bone Health Alliance recommendations to standardize sample handling and patient preparation to reduce pre-analytical variability. *Osteoporos Int* 2017;28(9):2541–56.

[31] Steinke J, Samietz S, Friedrich N, Weiss S, Michalik S, Biffar R, Nauck M, Völker U, Wallaschofski H, Pietzner M, Hannemann A. Associations of plasma YKL-40 concentrations with heel ultrasound parameters and bone turnover markers in the general adult population. *Bone* 2020;141:115675.

[32] Michelsen J, Wallaschofski H, Friedrich N, Spielhagen C, Rettig R, Ittermann T, Nauck M, Hannemann A. Reference intervals for serum concentrations of three bone turnover markers for men and women. *Bone* 2013;57(2):399–404.

[33] Berg RM, Wallaschofski H, Nauck M, Rettig R, Markus MRP, Laqua R, Friedrich N, Hannemann A. Positive Association Between Adipose Tissue and Bone Stiffness. *Calcif Tissue Int* 2015;97(1):40–9.

[34] Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol* 2010;224(2):305–10.

[35] Ho-Pham LT, Nguyen ND, Nguyen TV. Quantification of the relative contribution of estrogen to bone mineral density in men and women. *BMC Musculoskelet Disord* 2013;14:366.

[36] Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol* 2003;32(1):1–22.

[37] Bromińska B, Cyrańska-Chyrek E, Kuźnar-Kamińska B, Kostrzewska M, Winiarska H, Sawicka-Gutaj N, Zybek-Kocik A, Hernik A, Wrotkowska E, Krasiński Z, Ruchała M, Batura-Gabryel H. Association between bone remodeling and inflammatory markers in obstructive sleep apnea in relation to disease severity. *Polish archives of internal medicine* 2018;128(1):9–14.

[38] Nada D, Julien C, Rompré PH, Akoume M-Y, Gorman KF, Samuels ME, Levy E, Kost J, Li D, Moreau A. Association of Circulating YKL-40 Levels and CHI3L1 Variants with the Risk of Spinal Deformity Progression in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Sci Rep* 2019;9(1):5712.

[39] Rathcke CN, Johansen JS, Vestergaard H. YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Inflamm Res* 2006;55(2):53–9.

[40] Leib ES, Winzenrieth R. Bone status in glucocorticoid-treated men and women. *Osteoporos Int* 2016;27(1):39–48.

[41] Avnet S, Cenni E, Perut F, Granchi D, Brandi ML, Giunti A, Baldini N. Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. *Int J Oncol* 2007;30(2):469–76.

[42] Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408(6812):600–5.

[43] Nagata N, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN-γ possibly induced from non-T cell population. *Bone* 2003;33(4):721–32.

[44] Wang F, Luo A, Wu Q, Zhou Z, Peng Q, Xuan W, Tan W. Interleukin 29 inhibits osteoclast differentiation and function in rankl-induced osteoclastogenesis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2018;77(Suppl 2):881.1-881.

[45] Cafferata EA, Terraza-Aguirre C, Barrera R, Faúndez N, González N, Rojas C, Melgar-Rodríguez S, Hernández M, Carvajal P, Cortez C, González FE, Covarrubias C, Vernal R. Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption by modulating the Th17/Treg imbalance during periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2020;47(6):676–88.

[46] Hemingway F, Taylor R, Knowles HJ, Athanasou NA. RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II. *Bone* 2011;48(4):938–44.

[47] Luukkonen J, Hilli M, Nakamura M, Ritamo I, Valmu L, Kauppinen K, Tuukkanen J, Lehenkari P. Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption. *Histochem Cell Biol* 2019;151(6):475–87.

[48] Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, Yang W. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Research International* 2014;2014:284836.

[49] Rachoń D, Myśliwska J, Suchecka-Rachoń K, Wieckiewicz J, Myśliwski A. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Endocrinol* 2002;172(2):387–95.

[50] Krieg M-A, Barkmann R, Gonnelli S, Stewart A, Bauer DC, Del Rio Barquero L, Kaufman JJ, Lorenc R, Miller PD, Olszynski WP, Poiana C, Schott A-M, Lewiecki EM, Hans D. Quantitative ultrasound in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom* 2008;11(1):163–87.

[51] Luo W, Zhang L, Sheng L, Zhang Z, Yang Z. Increased levels of YKL-40 in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 2021;13(1):6.

[52] Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18(4):427–44.

# 7. Wissenschaftliche Arbeit

**Associations of plasma YKL-40 concentrations with heel ultrasound parameters and bone turnover markers in the general adult population**

Jörn Steinke[1], Stefanie Samietz[2], Nele Friedrich[1,4], Stefan Weiß[3,4], Stephan Michalik[3], Reiner Biffar[2], Matthias Nauck[1,4], Uwe Völker[3], Henri Wallaschofski[1], Maik Pietzner[1,4], Anke Hannemann[1,4]

[1] Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald, Deutschland

[2] Poliklinik für zahnärztliche Prothetik, Alterszahnheilkunde und medizinische Werkstoffkunde, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universitätsmedizin Greifswald, Deutschland

[3] Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung für Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin und Universität Greifswald, Deutschland

[4] DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung), Partnerstandort Greifswald, Universitätsmedizin Greifwald, Deutschland

**Vermerk zum *Copyright***

© 2020 Elsevier Inc. Alle Rechte vorbehalten

Verwendet als Teil der Dissertation (nicht kommerziell)

Verweis zum Originalartikel: https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115675

Bone 141 (2020) 115675

Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone

Full Length Article

# Associations of plasma YKL-40 concentrations with heel ultrasound parameters and bone turnover markers in the general adult population

Jörn Steinke[a], Stefanie Samietz[b], Nele Friedrich[a,d], Stefan Weiss[c,d], Stephan Michalik[c], Reiner Biffar[b], Matthias Nauck[a,d], Uwe Völker[c], Henri Wallaschofski[a], Maik Pietzner[a,d], Anke Hannemann[a,d,*]

[a] Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany
[b] Policlinic of Prosthetic Dentistry, Gerodontology and Biomaterials, Center of Oral Health, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany
[c] Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, University Medicine and University of Greifswald, Greifswald, Germany
[d] DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Greifswald, University Medicine, Greifswald, Germany

ARTICLE INFO

*Keywords:*
YKL-40
CHI3L1
Bone stiffness index
Bone turnover
Osteoporosis

ABSTRACT

*Objective:* YKL-40, also known as chitinase-3-like protein 1, is a new proinflammatory biomarker, that might play a role in tissue remodeling and bone resorption. Here we evaluated the associations of the YKL-40 plasma concentration with heel ultrasound parameters and bone turnover markers (BTMs) in adult men and women from the general population. We tested for a causal role of YKL-40 on bone metabolism using published single nucleotide polymorphisms (SNPs) with consequences for YKL-40 expression and function.

*Methods:* Data were obtained from two population-based cohorts: the Study of Health in Pomerania (SHIP) and SHIP-Trend. Quantitative ultrasound (QUS) measurements at the heel were performed and bone turnover was assessed by measurement of intact amino-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX). Associations between the YKL-40 plasma concentration and the QUS-based parameters, bone turnover marker (BTM) concentrations and 44 SNPs, including the lead SNP rs4950928, were evaluated in 382 subjects. Furthermore, we assessed the associations between the same SNPs and the QUS-based parameters ($n$ = 5777) or the BTM concentrations ($n$ = 7190).

*Results:* Sex-specific linear regression models adjusted for a comprehensive panel of interfering covariantes revealed statistically significant inverse associations between YKL-40 and all QUS-based parameters as well as positive associations with CTX in women. The rs4950928 polymorphism was associated with YKL-40 in men and women but none of the tested SNPs was associated with the QUS-based parameters or the BTMs after correction for multiple testing.

*Conclusions:* Plasma YKL-40 concentrations are associated with QUS-based parameters as well as CTX concentrations in women but these associations are probably not causal.

## 1. Introduction

Osteoporosis is a metabolic disorder of the skeletal system. It is characterized by impaired remodeling of bone substance, reduced bone mass and increased susceptibility to fractures. Estrogen deficiency in menopause, several life-style related factors including diet and physical inactivity but also the genetic predisposition represent major risk factors for osteoporosis [1]. Above this, chronic inflammatory diseases, e.g. inflammatory joint disease and rheumatoid arthritis, are well-known promoters of bone loss and predispose to osteoporotic fractures [2–4]. Glucocorticoids, highly effective anti-inflammatory drugs, further contribute to bone loss and cause glucocorticoid-induced osteoporosis, the most common form of secondary osteoporosis [5].

Over the last years, the research field of osteoimmunology, assessing the tight relations between immune and skeletal system, has gained insights into the role of inflammatory cytokines that influence bone resorption and formation processes [3]. Thus, cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, IL-6 and IL-17A were found to mediate inflammatory processes and to activate osteoclastogenesis [2,6]. Further, proinflammatory cytokines have been shown to induce

* Corresponding author at: Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Straβe, D-17475 Greifswald, Germany.
*E-mail address:* anke.hannemann@med.uni-greifswald.de (A. Hannemann).

https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115675
Received 25 August 2020; Received in revised form 28 September 2020; Accepted 1 October 2020
Available online 06 October 2020
8756-3282/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

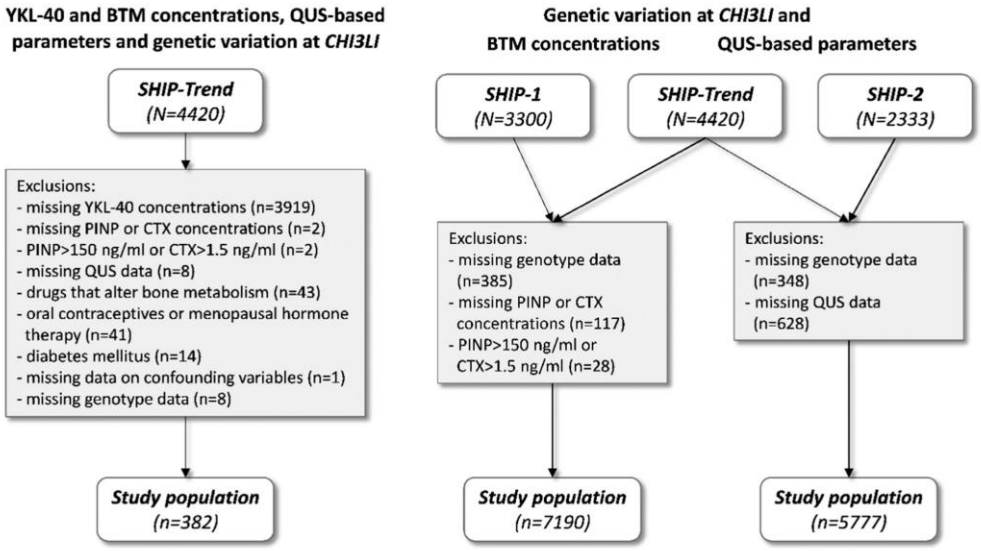



**Fig. 1.** Selection of the study population.

the secretion of chitinases that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds in chitin [7–9]. Chitinases and chitinase-like proteins, which lack chitinase activity, are produced by different human cell types such as fibroblasts, chondrocytes, macrophages, neutrophiles and T cells although humans do not synthesize chitin [10,11]. Their precise function in human metabolism is yet unknown, but it was suggested that the proteins are part of the defense against chitin-containing pathogens [12] and are involved in tissue modulation [13–15]. For instance, a strong association between cell development and the expression of YKL-40, a chitinase-like protein encoded by the chitinase-3-like protein 1 gene *CHI3L1*, has been described for chondrocytes, synovial cells, endothelial cells and fibroblasts [13–15].

Circulating YKL-40 concentrations are subject to genetic variations in the *CHI3L1* gene locus with the most significant associations concerning single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the upstream region of the gene [16,17]. These genetic variations are not only related to the YKL-40 level but also to the development of diseases with a strong inflammatory component like asthma [17] and liver fibrosis [18]. Further, YKL-40 levels are related to inflammatory activity in osteoarthritis [19], may play a role in the development of inflammatory bowel disease [20] and were suggested as biomarker for COPD [21]. In vitro investigations demonstrated an effect of YKL-40 on bone metabolism [22,23]. It was for example shown that during bone formation osteoblasts and osteoclasts are positive for the expression of *CHI3L1* mRNA, while mature osteocytes do not express the *CHI3L1* gene [22,23]. Moreover, silencing *CHI3L1* in osteoclasts led to a significant decrease in bone resorption activity, suggesting a regulatory role of YKL-40 in bone turnover as well [23]. On the other side, it must be noted that investigations on mesenchymal stromal cells, which develop into osteoprogenitor cells, revealed a downregulation of *CHI3L1* in patients with primary osteoporosis [24]. Thus the regulatory role of YKL-40 in bone metabolism needs further clarification, especially as data from clinical studies addressing this issue are sparse.

As chitinases and chitinase-like proteins might play a role in bone turnover processes, we evaluated the associations of the YKL-40 plasma concentration with quantitative ultrasound (QUS) parameters measured at the heel, and two bone turnover markers (BTMs): intact amino-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) in two independent large samples of adult men and women from the general population. Furthermore, we assessed whether SNPs at the *CHI3L1* gene locus are associated with the QUS-based parameters and the BTMs.

## 2. Material and methods

### 2.1. The study of health in Pomerania

The Study of Health in Pomerania (SHIP) is a population-based project in Northeast Germany [25]. It consists of two independent cohorts, SHIP and SHIP-Trend, that include adult men and women living in the cities Greifswald, Stralsund, Anklam and the surrounding communities. For both cohorts, representative samples of the 20–79 year old inhabitants of the study region were drawn from the local population registries. From these samples, 4308 subjects participated in the baseline SHIP examinations, that were conducted between 1997 and 2001, and 4420 subjects participated in the baseline SHIP-Trend examinations, that were conducted between 2008 and 2012. The first two follow-up examinations of the SHIP cohort were conducted between 2002 and 2006 (SHIP-1) with 3300 subjects, and between 2008 and 2012 (SHIP-2) with 2333 subjects being re-examined. Further details on study design, sampling procedures and rationale are given elsewhere [25]. The study follows the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of the University of Greifswald. All participants provided informed written consent.

### 2.2. Study population

The SHIP programme offers a broad range of medical examinations to the study participants. Core examinations, including for example a computer-assisted personal interview, blood pressure measurements and blood sampling are performed in all study waves. Above this, selected medical tests including QUS-measurements are restricted to specific study waves. We therefore generated three study populations, to analyse the maximum number of participants for each of the research hypotheses (Fig. 1).

In total, 501 SHIP-Trend participants from a sub-cohort without self-reported diabetes mellitus had YKL-40 measurements. Among those, all subjects without data on BTM concentrations, QUS measurements, genetic information or missing information on confounding variables, as well as subjects with extremely high BTM

concentrations > 99.75th percentile (PINP > 150 ng/ml, CTX > 1.5 ng/ml) and those with unknown diabetes mellitus were excluded. Moreover, the intake of drugs that alter bone metabolism or use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, oral contraceptives or menopausal hormone replacement therapy led to an exclusion of the respective participants. This resulted in a study population of 382 subjects, in which we assessed the associations of YKL-40 concentrations with PINP or CTX concentrations, with QUS-based parameters and with the genetic variation at *CHI3LI*. Moreover, we assessed the impact of the genetic variation at *CHI3L1* on the BTM concentrations and the QUS-based parameters among those 382 subjects. In order to avoid missing associations due to the relatively small sample size, we repeated the latter analyses adding information from SHIP-1 and SHIP-2. The study population to assess the relation between the genetic variation at *CHI3LI* and the BTM concentrations thus consisted of all SHIP-1 and SHIP-Trend participants ($N = 7720$). After exclusion of subjects without genotyping or missing or extreme BTM concentrations (PINP > 150 ng/ml, CTX > 1.5 ng/ml), a study population of 7190 subjects resulted. The study population to assess the relation between the genetic variation at *CHI3LI* and the QUS-based parameters consisted of all SHIP-2 and SHIP-Trend participants ($N = 6753$). After exclusion of subjects without genotyping or missing values in the QUS-based parameters, a study population of 5777 subjects resulted (Fig. 1).

### 2.3. Measurements

Information on socio-demographic characteristics, medical histories and lifestyle were gained by personal interviews. Waist circumference was measured during the physical examination midway between the lower rib margin and the iliac crest in the horizontal plane using an inelastic tape with the subject standing comfortably with weight distributed evenly on both feet. Intake of medication was recorded and classified using the anatomical therapeutic chemical classification system (ATC). The following substances were defined as influencing bone metabolism: bisphosphonates (ATC M05BA, M05BB), selective estrogen receptor modulators (ATC G03XC), parathyroid hormone (ATC H05AA) and glucocorticoids for systemic use (ATC H02AB, H02BX). Non-steroidal anti-inflammatory drugs were defined as ATC M01 and analgesics as ATC N02. Oral contraceptives were defined as ATC G03A and menopausal hormone therapy as ATC G03C, G03D and G03F. Menopausal status was defined based on age and self-report. Women younger than 40 years of age as well as women between 40 and 60 years of age, who reported menstrual cycling were defined as premenopausal, all other women as postmenopausal. Diabetes mellitus was defined when a respective physician's diagnosis or intake of antidiabetic medication (ATC A10) was reported, when HbA1c was ≥6.5% or serum glucose concentrations ≥11.1 mmol/l.

### 2.4. Laboratory methods

In all SHIP examination waves venous blood samples were taken from the cubital vein of participants in the supine position. Serum and plasma samples were stored at −80 °C in the Integrated Research Biobank (Liconic, Lichtenstein) of the University Medicine Greifswald and used in accordance with its regulations. YKL-40 concentrations were successfully measured, next to 30 further cytokines, in EDTA plasma in SHIP-Trend using a bead-based assay (Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Assay Panel 1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). In short, 50 µl of the coupled magnetic bead mixture were added to each well in a 96-well plate, along with serial dilutions of the reconstituted standard, blanks, controls and the subject plasma samples (1:4 diluted). This mixture was incubated in the dark at room temperature (shaking at 850 rpm) over night and the plates were subsequently washed three times. The detection antibody mixture was added to the wells for an additional 30 min incubation step at room temperature (shaking at 850 rpm), followed by washing three times and adding streptavidin-PE for 10 min at room temperature (shaking at 850 rpm). The samples were washed three times, and the plates were measured on a FLEXMAP3D® (Luminex Corp.) machine using xPONENT® v4.2 software. The quantitative analysis was performed using a 5P-logistic regression model on the standard dilution curve data to calculate absolute quantitative data of the subject samples (xPONENT® v4.2 software). A median coefficient of variation of 7.7% was achieved. As measurements were done in six batches we corrected for differences between the plates using a median normalization. Outliers in the YKL-40 concentrations, defined as values below or above the mean ± 3 standard deviations (SD) were omitted from further analyses. In addition, a slight drift in YKL-40 concentrations on each plate became obvious, therefore we included the position of the sample on the 96-well plate as confounding variable in the statistical analyses. Further a strong dependency on platelet count became apparent, which was therefore also considered as confounding variable in the statistical analyses. Platelets were counted in EDTA whole blood samples using the Sysmex XT2000, XE5000 or SE9000 analyzers (Sysmex, Kobe, Japan). Serum creatinine concentrations were determined with a modified kinetic Jaffé method. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated according to the four-variable Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula [26]. Serum high-sensitivity C-reactive protein concentrations (hs-CRP) were measured on the Dimension Vista (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). Serum PINP, CTX, and 25-hydroxy vitamin D (25OHD) concentrations were determined on the IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyser (Immunodiagnostic Systems Limited, Frankfurt am Main, Germany) in SHIP-1 and SHIP-Trend as previously described [27]. Serum total testosterone and estradiol concentrations were measured in SHIP-Trend by LC-MS/MS with a validated routine method as previously described [28].

### 2.5. QUS measurements

QUS measurements were performed at the heel in SHIP-2 and SHIP-Trend as previously described [29]. Study participants with contraindications including implants, protheses, or amputations in or below the knee or open wounds or infections below the knee were excluded from the measurements. Moreover, participants who were examined in mobile examination centres could not opt for the measurement. In addition, we do not report data for wheelchair-bound participants, for participants whose feet could not be placed correctly and for participants who reported injuries or surgeries during the last 12 months before the SHIP-examinations. In all eligible participants, QUS measurements were performed successively on both feet by trained and certified examiners using the Achilles InSight (GE Medical Systems Ultrasound, GE Healthcare, USA). The Achilles InSight is a water-based bone ultrasonometer, which measures the speed of sound (SOS) and the frequency-dependent attenuation of the sound waves (BUA), which pass through an individual's heel (oscalcis). BUA and SOS are combined to form the stiffness index according to the following formula: stiffness index = (0.67 × BUA) + (0.28 × SOS) − 420. Individual stiffness index values are then compared to values obtained in a healthy young reference population. Indices below the reference mean −2.5 SD indicate a high osteoporotic fracture risk, indices between −1 to −2.5 SD indicate a medium osteoporotic fracture risk and indices above −1 SD indicate a low osteoporotic fracture risk. The data from the foot with the lower stiffness index was used for statistical analyses.

### 2.6. Genotyping

SHIP and SHIP-Trend participants were genotyped using Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) or Illumina (San Diego, CA, USA) genotyping arrays in accordance with the manufacturer's standard protocols. Whole genome imputation of the genotypes was performed on the Michigan Imputation Server using the HRC (r1.1) reference panel [30]. Details on genotyping, quality control and imputation are provided in

Supplemental Table 1. Based on previous data [16], we selected and evaluated the genotypes of 44 HRC imputed variants within 40 kb downstream and 100 kb upstream of *CHI3L1* (chitinase-3-like 1). We used rs4950928 as the lead SNP for the following analyses as previously suggested [16,17]. Rs4950928 is located on chromosome 1 and shown to be associated with YKL-40 levels [17,31].

### 2.7. Statistical analysis

General characteristics of the study population with YKL-40 measurements are expressed as medians with 25th and 75th quartiles (continuous data) or as proportions (nominal data). Group differences between men and women were tested with Chi-Squared or Kruskal-Wallis tests. Relations between YKL-40 and further cytokines measured with the Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Assay Panel 1 were assessed with Spearman correlation coefficients. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant if not stated otherwise. We calculated linear regression models to assess whether the YKL-40 concentration (exposure) is associated with the QUS-based parameters or theBTM concentrations (outcomes). The YKL-40 concentration as well as the BTM concentrations were $\log_2$-transformed before being entered in the respective models. In all except for one of the above mentioned linear regression models effect modification by sex (interaction terms $p < 0.10$) was observed, therefore all analyses were performed sex-specific. We present β-coefficients with standard errors (stderr) and *p*-values from the linear regression models. All models were adjusted for age, waist circumference, current smoking status, 25OHD concentration, intake of analgesics, position on plate and platelet count. Moreover, we assessed the associations between YKL-40 and total testosterone and estradiol concentrations in linear regression models adjusted for age, waist circumference, smoking, position on plate and platelet count. In a first sensitivity analysis we additionally adjusted all of the main models for total testosterone and estradiol concentrations, in a second sensitivity analysis we additionally adjusted all of the above models for hs-CRP concentrations.

Subsequently we assessed whether the genetic variation in the lead SNP but also in all further SNPs was associated with the plasma YKL-40 concentration, the QUS-based parameters and the BTM concentrations. To this end, we illustrated the distribution of the YKL-40 concentrations, of the QUS-based parameters and the BTM concentrations according to the genetic variation in the lead SNP rs4950928 in sex-specific box-plots. Pairwise group comparisons were performed using Bonferroni corrected Kruskal-Wallis tests. Moreover, we assessed in sex-specific, additive genetic models whether the SNPs are related with the YKL-40 concentrations, the QUS-based parameters and the BTMs. The models assessing the associations between the genetic variation and the YKL-40 concentration were adjusted for age, position on plate and platelet count, while the models assessing the associations between the genetic variation with the QUS-based parameters or BTM concentrations were adjusted for age and study wave. We report β-coefficients with stderr and *p*-values from these models. Additionally, to account for multiple testing, we adjusted the p-values by controlling the false discovery rate (FDR) at 5% using the Benjamini-Hochberg procedure [32]. All statistical analyses were performed with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 3. Results

General characteristics of the 382 SHIP-Trend participants with YKL-40 measurement stratified by sex are given in Table 1. Among these subjects, the 181 women had significantly lower waist circumferences ($p < 0.01$), consumed less alcohol ($p < 0.01$), had lower eGFRs ($p = 0.02$), higher hs-CRP concentrations ($p = 0.04$) and higher platelet counts ($p < 0.01$) than the 201 men. Moreover, BUA ($p < 0.01$), stiffness index ($p < 0.01$) and CTX concentrations ($p = 0.01$) were lower in women than in men. The distribution of the YKL-40 concentration is shown in Supplemental Fig. 1.

**Table 1**
Characteristics of the study population.

| Characteristics | Men ($n$ = 201) | Women ($n$ = 181) | p |
|---|---|---|---|
| Age, years | 49.0 (40.0–61.0) | 53.0 (43.0–60.0) | 0.12 |
| Menopause, % | – | 57.5 | – |
| Waist circumference, cm | 93.0 (85.6–103.0) | 82.1 (75.2–90.1) | < 0.01 |
| Current Smoking, % | 24.4 | 20.4 | 0.36 |
| Alcohol consumption, g/day | 8.3 (3.5–16.2) | 2.7 (0.8–6.1) | < 0.01 |
| Intake of analgesics, % | 3.98 | 7.73 | 0.12 |
| eGFR, ml/min/1.73m$^2$ | 91.7 (82.2–104.5) | 87.9 (75.9–102.7) | 0.02 |
| Platelets, Gpt/l | 205 (176–233) | 237 (200–272) | < 0.01 |
| Hs-CRP, mg/l | 0.90 (0.47–2.08) | 1.24 (0.55–3.52) | 0.04 |
| 25OHD, ng/ml | 24.0 (17.4–31.3) | 23.1 (16.6–32.6) | 0.86 |
| Total testosterone, nmol/l | 17.5 (14.3–20.3) | 0.79 (0.61–1.06) | < 0.01 |
| Estradiol, nmol/l[a] | 74.0 (59.0–89.0) | 272.6 (120.4–562.2) | < 0.01 |
| BUA, dB/MHz | 117 (108–126) | 107 (100–115) | < 0.01 |
| SOS, m/s | 1566 (1541 - 1585) | 1562 (1542 - 1583) | 0.35 |
| Stiffness index | 97 (85–109) | 90 (80–99) | < 0.01 |
| QUS-based osteoporotic fracture risk | | | 0.17 |
| low, % | 71.6 | 63.5 | |
| moderate, % | 25.9 | 31.5 | |
| high, % | 2.49 | 4.97 | |
| PINP, ng/ml | 46.7 (37.1–58.0) | 46.4 (34.7–58.2) | 0.51 |
| CTX, ng/ml | 0.29 (0.20–0.39) | 0.25 (0.16–0.36) | 0.01 |
| YKL-40, ng/ml | 9.3 (7.4–11.0) | 8.8 (7.1–10.5) | 0.19 |

Data are median (1st–3rd quartile) or proportions. Group differences were tested with Chi-Squared or Kruskal-Wallis tests. BUA, broadband-ultrasound attenuation; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; eGFR, estimated glomerular filtration rate; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; QUS, quantitative ultrasound; SOS, speed of sound; 25OHD, 25-hydroxy vitamin D.

[a] Estradiol concentrations were available in all men and in 99 women.

Fully-adjusted linear regression models showed no association between the YKL-40 concentration and the QUS-based parameters or the BTMs (Table 2). However, in these models, sex turned out to be an effect modifier. The subsequently calculated sex-specific models revealed inverse associations between the YKL-40 concentration and all QUS-based parameters as well as a positive association between YKL-40 and CTX in women but no association in men. Associations between YKL-40 and total testosterone (men: $\beta = -0.008$, stderr = 0.006, $p = 0.15$; women; $\beta = 0.056$, stderr = 0.067, $p = 0.40$) or estradiol concentrations (men: $\beta = -0.002$, stderr = 0.001, $p = 0.20$; women: $\beta = 0.0002$, stderr = 0.0001, $p = 0.16$) were not statistically significant. An additional adjustment for total testosterone and estradiol concentrations, in the first sensitivity analyses, thus hardly changed the results except that the association with CTX in women now barely missed statistical significance ($p = 0.06$, Supplemental Table 2). Moreover, correlations between YKL-40 concentrations and several other cytokines in both sexes were found (Supplemental Table 3). Yet, an additional adjustment of the models for the hs-CRP concentration in the second sensitivity analyses, had no impact on the above results (Supplemental Table 2).

We then investigated whether the genetic variation within the selected lead SNP rs4950928 in the *CHI3L1* gene impacts on plasma YKL-40 levels. We found that male and female CC carriers ($n = 238$) had significantly higher YKL-40 concentrations than heterozygous GC carriers ($n = 134$). Male CC carriers also had significantly higher YKL-40 concentrations than homozygous GG carriers ($n = 10$), who had on average the lowest YKL-40 concentrations (Fig. 2 and Supplemental Table 4).

An additive genetic model confirmed the association between the genetic variation in rs4950928 and the YKL-40 plasma concentration

**Table 2**
Associations between YKL-40 ($log_2$ transformed) and the QUS-based parameters and BTMs ($log_2$-transformed).

| Outcome | Men and Women | | | | Men | | | Women | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | β | std err | p | p (YKL-40 ∗ sex) | β | std err | p | β | std err | p |
| BUA | −1.737 | 1.719 | 0.31 | < 0.01 | 2.153 | 2.311 | 0.35 | −6.500 | 2.494 | < 0.01 |
| SOS | −2.089 | 4.243 | 0.62 | < 0.01 | 8.428 | 5.802 | 0.15 | −17.027 | 5.976 | < 0.01 |
| Stiffness Index | −1.749 | 2.118 | 0.41 | < 0.01 | 3.801 | 2.905 | 0.19 | −9.122 | 2.958 | < 0.01 |
| PINP ($log_2$) | 0.028 | 0.070 | 0.69 | 0.15 | −0.029 | 0.087 | 0.74 | 0.148 | 0.103 | 0.15 |
| CTX ($log_2$) | 0.203 | 0.105 | 0.05 | 0.07 | 0.088 | 0.128 | 0.49 | 0.377 | 0.159 | 0.02 |

Results from linear regression models adjusted for age, sex (in the model including men and women), waist circumference, smoking, 25-hydroxy vitamin D, intake of analgesics, platelets and position on plate. P-values for the interaction between YKL-40 ∗ sex are also reported. β, β-coefficient; BTM, bone turnover marker; BUA, broadband-ultrasound attenuation; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; QUS, quantitative ultrasound; SOS, speed of sound; std. err, standard error.

(Table 3). We then assessed the genetic variation in the *CHI3L1* gene locus with respect to the QUS-based parameters and the BTMs in the 382 subjects, but found no statistically significant association after controlling the FDR (data not shown). The latter analyses was repeated in two larger samples including SHIP-1 and SHIP-2 data, however, with the same results. There were neither group differences in BUA, SOS or stiffness index between CC, GC or GG carriers, nor associations in the adjusted models between the lead SNP and any of the QUS-based parameters (Fig. 2, Table 3). Regarding the BTMs, non-parametric testing indicated statistically significant PINP concentrations in GG versus CC or GC carriers in women (Fig. 2), but these associations were not confirmed in the adjusted models (Table 3). For CTX we observed neither group differences between CC, GC or GG carrier nor associations in the adjusted models after controlling the FDR.

The β-coefficients represent the effect size for changes from non-effect (CC) to effect allele (GG). Results from sex-specific linear regression models adjusted for age, position and platelets (outcome YKL-40) or age and study (outcome QUS-based parameters and BTMs). β, β-coefficient; BTM, bone turnover marker; BUA, broadband-ultrasound attenuation; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; FDR, false discovery rate; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; QUS, quantitative ultrasound; SOS, speed of sound; std. err, standard error.

Finally, we investigated the associations between a panel of another 43 candidate SNPs within the *CHI3L1* gene locus and the YKL-40 levels (Supplemental Table 5), the QUS-based parameters (Supplemental Table 6) and the BTMs (Supplemental Table 7). In addition to the lead SNP, rs946263 was associated with the YKL-40 level in men and woman (FDR < 0.05). Another two SNPs (rs946261 and rs880633, both FDR < 0.05) were related to YKL-40 concentrations in women but not in men. None of these demonstrated an association with the QUS-based parameters or the BTM concentrations that passed the FDR threshold of < 0.05.

## 4. Discussion

Our population-based study revealed inverse associations between the plasma concentration of the chitinase-like protein YKL-40 and the QUS-based parameters as well as a positive association with the bone resorption marker CTX in women. The genetic analyses further revealed

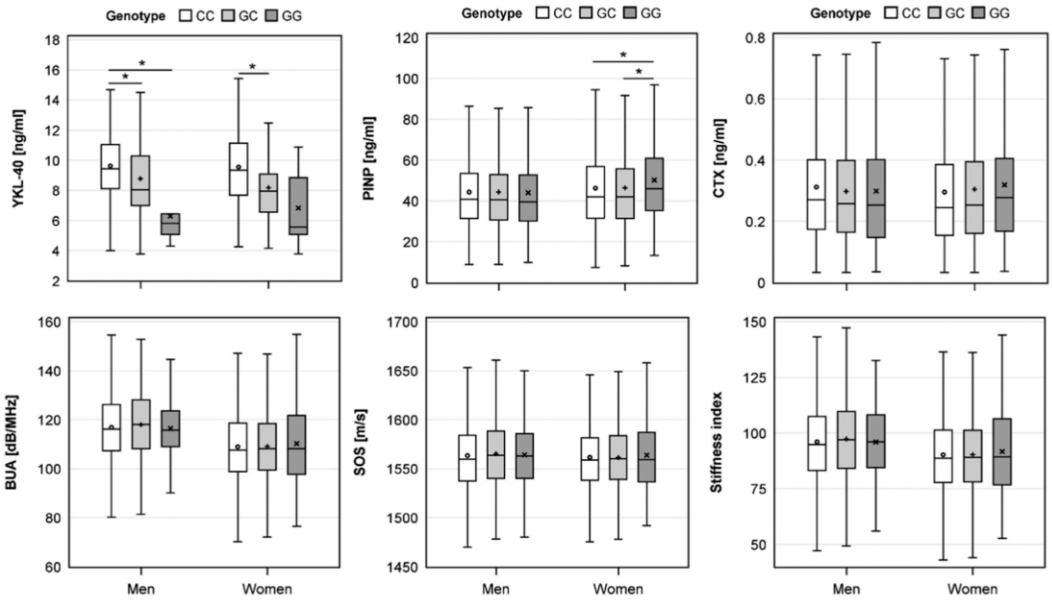



**Fig. 2.** Sex-specific box-plots for the plasma YKL-40 concentration ($n$ = 382 SHIP-Trend participants), the QUS-based parameters ($n$ = 5777 SHIP-2 and SHIP-Trend participants), and the BTMs ($n$ = 7190 SHIP-1 and SHIP-Trend participants) according to the genetic variation in the lead SNP. BUA, broadband-ultrasound attenuation; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; SOS, speed of sound. Pairwise group differences were tested with Kruskal-Wallis tests. * indicates statistically significant results ($p$ < 0.0167) after Bonferroni correction.

**Table 3**
Associations of the lead SNP rs4950928 with the YKL-40 plasma concentration, the QUS-based parameters and the BTMs ($log_2$-transformed).

| Outcome | Men | | | | | Women | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | β | std err | p | FDR | n | β | std err | p | FDR |
| YKL-40 | 201 | −0.219 | 0.049 | < 0.0001 | < 0.001 | 181 | −0.256 | 0.048 | < 0.0001 | < 0.0001 |
| BUA | 2788 | 0.463 | 0.453 | 0.31 | 0.68 | 2989 | 0.523 | 0.430 | 0.23 | 0.68 |
| SOS | | 0.860 | 1.234 | 0.49 | 0.80 | | 0.771 | 0.970 | 0.43 | 0.77 |
| Stiffness Index | | 0.551 | 0.596 | 0.36 | 0.71 | | 0.566 | 0.503 | 0.26 | 0.68 |
| PINP($log_2$) | 3493 | −0.017 | 0.016 | 0.28 | 0.68 | 3697 | 0.018 | 0.018 | 0.30 | 0.71 |
| CTX($log_2$) | | −0.076 | 0.026 | < 0.01 | 0.33 | | 0.058 | 0.027 | 0.03 | 0.47 |

that four out of 44 investigated SNPs within the *CHI3L1* gene locus were associated with YKL-40 plasma concentrations, but none of the investigated SNPs was related to the QUS-based parameters or the BTMs after correction for multiple testing.

Previous reports suggested a relation between YKL-40 and bone metabolism [23,33,34]. A clinical study by Mylin et al. for example, demonstrated disrupted bone remodeling in patients with multiple myeloma and elevated YKL-40 levels [34]. Another study found positive associations between serum YKL-40 and CTX as well as PINP concentrations in obstructive sleep apnea [33]. Above this, a regulatory role of YKL-40 in bone turnover has been demonstrated *in vitro*[23]. Our data, at first sight, seemed to support a link between YKL-40 and bone metabolism. At second sight, after implementing genetic analyses, however, this link seems not to be causal.

Circulating YKL-40 concentrations are dependent on multiple individual factors, including age [35], genetic disposition [16,17,31,36] and epigenetic variation [31]. Regarding the genetic disposition, multiple SNPs at the *CHI3L1* gene were found to be significantly associated with YKL-40 levels [16,17,31,36]. In line with these studies, we confirmed four SNPs within the *CHI3L1* locus that were associated with plasma YKL-40 levels. The predefined lead SNP, rs4950928, demonstrated the strongest effect on YKL-40 concentrations with its minor allele related to lower YKL-40 levels. This lead SNP is supposed to account for 9.4% of the variance in YKL-40 levels [17]. In our study, however, none of the tested SNPs within the *CHI3L1* locus showed significant associations with the QUS-based parameters or the bone turnover markers, which argues against a direct effect of YKL-40 on bone metabolism. Moreover, querying summary statistics from large-scale genome-wide association studies on various bone-related phenotypes revealed few nominal significant ($p < 0.05$) associations for the lead SNP, e.g. with heel bone mineral density or fractures from simple fall, but none of the associations was close to genome-wide significance (http://www.phenoscanner.medschl.cam.ac.uk/ accessed Jul 10, 2020).

The most plausible explanation for the null-effect in our genetic analyses may be unmeasured confounding, i.e. the presence of a common, independent mechanism affecting both YKL-40 plasma levels and bone health. Proinflammatory cytokines promote the secretion of YKL-40 by fibroblasts, macrophages, neutrophiles and T cells [10,11]. Moreover, a regulation of YKL-40 along with other proinflammatory markers was suggested, as YKL-40 levels in healthy men increase within 24 h after receiving IL-6 but not TNF-α infusions [9]. In context of acute rheumatoid arthritis, elevated serum and synovial YKL-40 levels were observed, which were associated with serum TNF-α and IL-1β levels [37]. Proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-1β and IL-6, in turn, induce other acute phase reactants and proteases that degrade various tissues including bone and, in case of IL-6, mediate the release of glucocorticoids, which cause rapid bone loss as well [2,38]. Leucocytes and cytokines further mediate enhanced osteoclast differentiation and inhibit osteoblast function, thus causing inflammatory bone loss [2,39–41]. Taken together, YKL-40 is secreted during inflammatory processes by different cell types, including for example macrophages, neutrophils and T-cells [10,11] in conjunction with cytokines that are known to negatively impact on bone metabolism and may not exert an own effect on bone. Consequently, YKL-40 may merely indicate inflammatory processes that contributes via different mechanisms to bone destruction. On the other side, there is evidence that YKL-40 directly promotes inflammatory processes, as mice that lack YKL-40 production have diminished tissue inflammation during infection and asthmatic reaction [42,43]. Thus, YKL-40 may initiate or stimulate inflammatory processes and via these mechanisms indirectly contribute to bone destruction. The observation that YKL-40 concentrations correlate with several other pro- as well as anti-inflammatory cytokines in our study supports this hypothesis of a link between YKL-40 and inflammatory responses.

Above this, the observed sex-specific differences in our study deserve discussion. Our data indicate that YKL-40 concentrations are associated with decreased QUS-based bone parameters and increased bone resorption markers in women but not in men. Sex-specific differences in bone metabolism and inflammatory disease are the most obvious reasons, well known and promoted by genetic and hormonal causes [44–47]. Yet, during a first inspection of this hypothesis we found no relation between YKL-40 and total testosterone or estradiol concentrations. This argues against a major impact of these hormones on the observed associations and led us to discard our hypothesis. However, a closer examination of the observed sex differences in a larger sample and also of the impact of estrogen deficiency associated with menopause might be indicated as the hormonal regulation of inflammatory processes associated with bone quantities may be more complex than assessed here.

This is the first study to investigate the associations between the chitinase-like protein YKL-40 and the genetic variation at the *CHI3L1* locus with heel ultrasound parameters and bone turnover markers in a population-based setting. Study participants included a balanced ratio of adult men and women from the general population, who underwent thorough medical examinations. All measurements were performed according to standardized protocols by trained and certified examiners. We used QUS measurements at the calcaneus, a tool that provides a good osteoporotic fracture risk estimation [48]. In addition to the QUS-measurement, we determined serum concentrations of two reference markers of bone turnover, CTX and PINP, to obtain a more complete picture on the individual's bone metabolism. Plasma YKL-40 concentrations were consistent to previous work using the same assay [49] and comparable to values given by the assay manufacturer, underlining the quality of our laboratory analyses, that correspond to the current state of research. Finally, in our statistical analyses we used a comprehensive panel of interfering covariates to adjust our models. Next to these strengths, it is important to outline the limitations of our research. Most importantly, measurements of plasma YKL-40 concentrations were performed in a subsample of the SHIP-Trend study population. This subsample was restricted to subjects free of diabetes mellitus. It would be desirable to rerun the analyses in a larger sample to increase the statistical power, to check whether the associations hold in a less healthy population. It would also be desirable to further elucidate the observed sex-differences and to assess the impact of menopausal estrogen deficiency. Due to a limited number of pre- and postmenopausal

women, a not optimal definition of menopausal status and missing estradiol concentrations in nearly half of the women in the study population, our study is not suitable to appropriately answer this question. Moreover, while next to YKL-40 several cytokines were measured in SHIP-Trend, there are no measurements of IL-1, IL-6 or IL-17. These cytokines impact on bone metabolism, might be related to YKL-40 and may therefore confound the examined associations. Finally the study population included only Caucasian participants from the north-east of Germany and the results may thus not apply to other ethnicities.

In conclusion we found that the plasma YKL-40 concentration is associated with lower QUS-based parameters and higher bone resorption marker concentrations in women. However, a closer examination of the associations using genetic instruments has proved crucial, as there was no evidence that variation within the *CHI3L1* gene affects QUS-based parameters or remodeling processes. The observed associations are therefore probably not causal. Instead YKL-40 might be a product of a more systemic response to inflammation which causes enhanced bone turnover.

## Funding

SHIP is part of the Community Medicine Research network of the University of Greifswald, Germany, which is funded by the Federal Ministry of Education and Research (Germany): grants 01ZZ9603, 01ZZ0103 and 01ZZ0403, the Ministry of Cultural Affairs, as well as the Social Ministry of the Federal State of Mecklenburg–West Pomerania (Germany). Furthermore, we received an independent research grant for determination of bone turnover marker concentrations from Immunodiagnostic Systems Ltd. (Germany). Dr. Anke Hannemann was supported by a Gollwitz-Meier scholarship (University Medicine Greifswald, Germany).

## CRediT authorship contribution statement

**Jörn Steinke:** Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Stefanie Samietz:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Nele Friedrich:** Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **Stefan Weiss:** Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Stephan Michalik:** Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Reiner Biffar:** Writing - review & editing, Supervision. **Matthias Nauck:** Resources, Writing - review & editing, Supervision. **Uwe Völker:** Resources, Writing - review & editing, Supervision. **Henri Wallaschofski:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision. **Maik Pietzner:** Conceptualization, Methodology, Software, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Anke Hannemann:** Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision.

## Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interests.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115675.

## References

[1] J.A. Kanis, C. Cooper, R. Rizzoli, et al., European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women, Osteoporos. Int. 30 (1) (2019) 3–44.
[2] K. Redlich, J.S. Smolen, Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention, Nat. Rev. Drug Discov. 11 (3) (2012) 234–250.
[3] P. Pietschmann, D. Mechtcheriakova, A. Meshcheryakova, et al., Immunology of osteoporosis: a mini-review, Gerontology 62 (2) (2016) 128–137.
[4] A.K.S. Gough, J. Lilley, S. Eyre, et al., Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis, Lancet 344 (8914) (1994) 23–27.
[5] J. Compston, Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update, Endocrine 61 (1) (2018) 7–16.
[6] J.-Y. Li, P. D'Amelio, J. Robinson, et al., IL-17A is increased in humans with primary hyperparathyroidism and mediates PTH-induced bone loss in mice, Cell Metab. 22 (5) (2015) 799–810.
[7] L. Malaguarnera, M. Musumeci, M. Di Rosa, et al., Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages, J. Clin. Lab. Anal. 19 (3) (2005) 128–132.
[8] R. Lieder, O.E. Sigurjonsson, The effect of recombinant human Interleukin-6 on Osteogenic differentiation and YKL-40 expression in human, bone marrow-derived Mesenchymal stem cells, Biores Open Access 3 (1) (2014) 29–34.
[9] A.R. Nielsen, P. Plomgaard, K.S. Krabbe, et al., IL-6, but not TNF-α, increases plasma YKL-40 in human subjects, Cytokine 55 (1) (2011) 152–155.
[10] J.S. Johansen, Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer, Dan. Med. Bull. 53 (2) (2006) 172–209.
[11] M. Capone, L. Maggi, V. Santarlasci, et al., Chitinase 3-like-1 is produced by human Th17 cells and correlates with the level of inflammation in juvenile idiopathic arthritis patients, Clin Mol Allergy 14 (2016) 16.
[12] A. Kumar, K.Y.J. Zhang, Human chitinases: structure, function, and inhibitor discovery, Adv. Exp. Med. Biol. 1142 (2019) 221–251.
[13] A.D. Recklies, C. White, H. Ling, The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways, Biochem. J. 365 (Pt 1) (2002) 119–126.
[14] M. Faibish, R. Francescone, B. Bentley, et al., A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers, Mol. Cancer Ther. 10 (5) (2011) 742–751.
[15] J.S. Johansen, S. Møller, P.A. Price, et al., Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? Scand. J. Gastroenterol. 32 (6) (1997) 582–590.
[16] P.M. Ridker, D.I. Chasman, L. Rose, et al., Plasma levels of the proinflammatory chitin-binding glycoprotein YKL-40, variation in the chitinase 3-like 1 gene (CHI3L1), and incident cardiovascular events, J. Am. Heart Assoc. 3 (3) (2014) e000897.
[17] C. Ober, Z. Tan, Y. Sun, et al., Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function, N. Engl. J. Med. 358 (16) (2008) 1682–1691.
[18] M.-L. Berres, S. Papen, K. Pauels, et al., A functional variation in CHI3L1 is associated with severity of liver fibrosis and YKL-40 serum levels in chronic hepatitis C infection, J. Hepatol. 50 (2) (2009) 370–376.
[19] R. Karalilova, M. Kazakova, A. Batalov, et al., Correlation between protein YKL-40 and ultrasonographic findings in active knee osteoarthritis, Med Ultrason 1 (1) (2018) 57–63.
[20] C. Deutschmann, D. Roggenbuck, P. Schierack, The loss of tolerance to CHI3L1 - a putative role in inflammatory bowel disease? Clin. Immunol. 199 (2019) 12–17.
[21] X. Tong, D. Wang, S. Liu, et al., The YKL-40 protein is a potential biomarker for COPD: a meta-analysis and systematic review, Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 13 (2018) 409–418.
[22] J.R. Connor, R.A. Dodds, J.G. Emery, et al., Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization, Osteoarthr. Cartil. 8 (2) (2000) 87–95.
[23] M. Di Rosa, D. Tibullo, M. Vecchio, et al., Determination of chitinases family during osteoclastogenesis, Bone 61 (2014) 55–63.
[24] C.J. Lai, Pharmacophore-based screening of differentially-expressed PGF, DDIT4, COMP and CHI3L1 from hMSC cell lines reveals five novel therapeutic compounds for primary osteoporosis, J Genet Eng Biotechnol 14 (1) (2016) 203–210.
[25] H. Völzke, D. Alte, C.O. Schmidt, et al., Cohort profile: the study of health in Pomerania, Int. J. Epidemiol. 40 (2) (2011) 294–307.
[26] A.S. Levey, T. Greene, J.W. Kusek, et al., A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine [abstract], J. Am. Soc. Nephrol (11) (2000) 155A.
[27] J. Michelsen, H. Wallaschofski, N. Friedrich, et al., Reference intervals for serum concentrations of three bone turnover markers for men and women, Bone 57 (2) (2013) 399–404.
[28] H. Kische, S. Gross, H. Wallaschofski, et al., Clinical correlates of sex hormones in women: the study of health in Pomerania, Metab. Clin. Exp. 65 (9) (2016) 1286–1296.
[29] R.M. Berg, H. Wallaschofski, M. Nauck, et al., Positive association between adipose tissue and bone stiffness, Calcif. Tissue Int. 97 (1) (2015) 40–49.
[30] S. Das, L. Forer, S. Schönherr, et al., Next-generation genotype imputation service and methods, Nat. Genet. 48 (10) (2016) 1284–1287.
[31] S. Guerra, E. Melén, J. Sunyer, et al., Genetic and epigenetic regulation of YKL-40 in childhood, J. Allergy Clin. Immunol. 141 (3) (2018) 1105–1114.
[32] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, Journal of the Royal Statistical Society. Series B 57 (1) (1995) 289–300.
[33] B. Bromińska, E. Cyrańska-Chyrek, B. Kuźnar-Kamińska, et al., Association between bone remodeling and inflammatory markers in obstructive sleep apnea in relation to disease severity, Polish archives of internal medicine 128 (1) (2018) 9–14.
[34] A.K. Mylin, N. Abildgaard, J.S. Johansen, et al., Serum YKL-40: a new independent prognostic marker for skeletal complications in patients with multiple myeloma, Leuk Lymphoma 56 (9) (2015) 2650–2659.

[35] S.E. Bojesen, J.S. Johansen, B.G. Nordestgaard, Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population, Clin. Chim. Acta 412 (9–10) (2011) 709–712.
[36] D. Nada, C. Julien, P.H. Rompré, et al., Association of circulating YKL-40 levels and CHI3L1 variants with the risk of spinal deformity progression in adolescent idiopathic scoliosis, Sci. Rep. 9 (1) (2019) 5712.
[37] M.H. Kazakova, A.Z. Batalov, N.G. Mateva, et al., YKL-40 and cytokines - a new diagnostic constellation in rheumatoid arthritis? Folia Med (Plovdiv) 59 (1) (2017) 37–42.
[38] E.S. Leib, R. Winzenrieth, Bone status in glucocorticoid-treated men and women, Osteoporos. Int. 27 (1) (2016) 39–48.
[39] S. Abbas, Y.-H. Zhang, J.C. Clohisy, et al., Tumor necrosis factor-alpha inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor, Cytokine 22 (1–2) (2003) 33–41.
[40] F.J. Hughes, G.L. Howells, Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro, Bone Miner 21 (1) (1993) 21–28.
[41] S. Colucci, G. Brunetti, F.P. Cantatore, et al., Lymphocytes and synovial fluid fibroblasts support osteoclastogenesis through RANKL, TNFalpha, and IL-7 in an in vitro model derived from human psoriatic arthritis, J. Pathol. 212 (1) (2007) 47–55.
[42] C.G. Lee, D. Hartl, G.R. Lee, et al., Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis, J. Exp. Med. 206 (5) (2009) 1149–1166.
[43] H.T. Tran, I.-A. Lee, D. Low, et al., Chitinase 3-like 1 synergistically activates IL6-mediated STAT3 phosphorylation in intestinal epithelial cells in murine models of infectious colitis, Inflamm. Bowel Dis. 20 (5) (2014) 835–846.
[44] B. Frenkel, A. Hong, S.K. Baniwal, et al., Regulation of adult bone turnover by sex steroids, J. Cell. Physiol. 224 (2) (2010) 305–310.
[45] L.T. Ho-Pham, N.D. Nguyen, T.V. Nguyen, Quantification of the relative contribution of estrogen to bone mineral density in men and women, BMC Musculoskelet. Disord. 14 (2013) 366.
[46] N. Iikuni, E. Sato, M. Hoshi, et al., The influence of sex on patients with rheumatoid arthritis in a large observational cohort, J. Rheumatol. 36 (3) (2009) 508–511.
[47] B. Tengstrand, M. Ahlmén, I. Hafström, The influence of sex on rheumatoid arthritis: a prospective study of onset and outcome after 2 years, J. Rheumatol. 31 (2) (2004) 214–222.
[48] M.-A. Krieg, R. Barkmann, S. Gonnelli, et al., Quantitative ultrasound in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD official positions, J. Clin. Densitom. 11 (1) (2008) 163–187.
[49] C.J. Augello, J.M. Noll, T.J. Distel, et al., Identification of novel blood biomarker panels to detect ischemic stroke in patients and their responsiveness to therapeutic intervention, Brain Res. 2018 (1698) 161–169.

## Supplemental Material

## Supplemental Tables

**Supplemental Table 1.**Description of genotyping and imputation

| Study | Genotyping chip and version | Number of study participants | Calling algorithm | SNP exclusions (pre imputation QC) | Sample exclusion (pre imputation QC) | Number of samples (post QC) | SNP count (post QC) | Prephasing/ Imputation | SNP count(post imputation) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SHIP | Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 | 4,308 | Birdseed2 | pHWE< $10^{-4}$, call rate < 95% or monomorphic SNVs | call rate < 92%, PCA outliers, duplicate samples (by IBS) or reported/genotyped gender mismatch | 4,070 | 823,635 | Imputation performed usingEagle v2.3 + and Minimac3against theHRC (v r1.1 2016) reference panel on the Michigan Imputation server. | 40,356,094 |
| SHIP-Trend | Illumina Infinium HumanOmni2.5 BeadChip | 4,420 | GenomeStudio Genotyping Module v1.0 (GenCall) | pHWE< $10^{-4}$, call rate < 95% or monomorphic SNVs | call rate < 94%, PCA outliers, duplicate samples (by IBD) or reported/genotyped gender mismatch | 986 | 1,803,558 | | 40,360,311 |
| | Illumina Infinium Global Screening Array | | GenomeStudio 2.0 Genotyping Module (GenCall) | pHWE< $10^{-4}$, call rate < 95%, MAC < 10, MAF < 0.01 | excluded arrays with call rate < 94%, excluded PCA outliers, duplicate samples (by IBD) or reported/genotyped gender mismatch and heterozygosity +/-4 sd from the mean | 3,133 | 489,014 | | 40,359,612 |

HRC, Haplotype Reference Consortium; HWE, Hardy-Weinberg-Equilibrium; IBD, identity by descent; IBS, identity by state; MAC, minor allele count; MAF, minor allele frequency; PCA, principle component analysis; QC, quality control; SHIP, Study of Health in Pomerania; SNP, single nucleotide polymorphism; SNV, single nucleotide variation

**Supplemental Table 2.** Spearman correlation coefficients for YKL-40 with other cytokines measured with the Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Assay Panel 1 kit in 382 subjects.

| Cytokines | Men | | | Women | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | Spearman Correlation Coefficient | p | n | Spearman Correlation Coefficient | p |
| **YKL-40** | 201 | - | - | 181 | - | - |
| IFN-alpha2 | 201 | -0.322 | <.0001 | 181 | -0.336 | <.0001 |
| IFN-beta | 181 | 0.035 | 0.638 | 148 | -0.021 | 0.796 |
| IFN-gamma | 201 | -0.382 | <.0001 | 181 | -0.313 | <.0001 |
| IL-10 | 201 | 0.296 | <.0001 | 181 | 0.319 | <.0001 |
| IL-11 | 176 | -0.314 | <.0001 | 149 | -0.250 | 0.002 |
| IL-12 (p40) | 201 | -0.445 | <.0001 | 181 | -0.451 | <.0001 |
| IL-19 | 201 | -0.262 | <.0001 | 181 | -0.203 | 0.006 |
| IL-22 | 201 | -0.107 | 0.132 | 181 | -0.041 | 0.579 |
| IL-26 | 201 | 0.190 | 0.007 | 181 | 0.157 | 0.035 |
| IL-29/IFN-lambda1 | 201 | -0.377 | <.0001 | 180 | -0.333 | <.0001 |
| IL-32 | 191 | -0.353 | <.0001 | 168 | -0.299 | <.0001 |
| IL-34 | 195 | -0.138 | 0.055 | 169 | -0.254 | 0.001 |
| IL-35 | 201 | -0.375 | <.0001 | 181 | -0.338 | <.0001 |
| IL-8 | 200 | -0.226 | 0.001 | 181 | -0.170 | 0.022 |
| MMP-1 | 176 | -0.227 | 0.002 | 155 | -0.144 | 0.074 |
| MMP-2 | 200 | 0.223 | 0.002 | 181 | 0.018 | 0.809 |
| MMP-3 | 201 | 0.248 | <.0001 | 181 | 0.390 | <.0001 |
| Osteocalcin | 200 | 0.216 | 0.002 | 181 | 0.363 | <.0001 |
| Osteopontin | 200 | 0.474 | <.0001 | 180 | 0.594 | <.0001 |
| Pentraxin-3 | 201 | 0.337 | <.0001 | 181 | 0.313 | <.0001 |
| TWEAK/TNFSF12 | 201 | -0.016 | 0.824 | 181 | -0.014 | 0.852 |
| APRIL/TNFSF13 | 201 | 0.367 | <.0001 | 181 | 0.501 | <.0001 |
| BAFF/TNFSF13B | 200 | 0.111 | 0.117 | 181 | 0.310 | <.0001 |
| LIGHT/TNFSF14 | 182 | 0.208 | 0.005 | 161 | 0.219 | 0.005 |
| TSLP | 201 | -0.316 | <.0001 | 181 | -0.262 | <.0001 |
| gp130/sIL-6Rbeta | 201 | 0.593 | <.0001 | 181 | 0.677 | <.0001 |
| sCD163 | 201 | 0.540 | <.0001 | 181 | 0.592 | <.0001 |
| sCD30/TNFRSF8 | 201 | 0.290 | <.0001 | 181 | 0.465 | <.0001 |
| sTNF-R1 | 200 | 0.468 | <.0001 | 181 | 0.620 | <.0001 |
| sTNF-R2 | 201 | 0.538 | <.0001 | 181 | 0.651 | <.0001 |

gp130, glycoprotein 130; IFN, interferon; IL, interleukin; MMP, Matrix-Metalloprotease; sCD, soluble cluster of differentiation; sTNF-R, soluble necrosis factor receptor; TNFSF, tumor necrosis factor ligand superfamily member; TSLP, thymic stromal lymphopoietin

**Supplemental Table 3.** Sensitivity analyses, assessing the associations between YKL-40 ($log_2$ transformed) and the QUS-based parameters and BTMs ($log_2$-transformed) with additional adjustment for hs-CRP or testosterone and estradiol concentrations.

| Sensitivity analyses | Outcome | Men | | | Women | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ß | std err | p | ß | std err | p |
| Additional adjustment for hs-CRP | BUA | 2.138 | 2.303 | 0.35 | -6.522 | 2.496 | <0.01 |
| | SOS | 8.415 | 5.800 | 0.15 | -17.320 | 5.953 | <0.01 |
| | Stiffness Index | 3.788 | 2.900 | 0.19 | -9.219 | 2.954 | <0.01 |
| | PINP ($log_2$) | -0.029 | 0.087 | 0.74 | 0.149 | 0.103 | 0.15 |
| | CTX ($log_2$) | 0.088 | 0.128 | 0.49 | 0.372 | 0.158 | 0.02 |
| Additional adjustment for total testosterone and estradiol* | BUA | 3.040 | 2.447 | 0.21 | -11.378 | 3.623 | <0.01 |
| | SOS | 6.514 | 6.280 | 0.30 | -26.333 | 8.258 | <0.01 |
| | Stiffness Index | 3.860 | 3.124 | 0.22 | -14.997 | 4.083 | <0.01 |
| | PINP ($log_2$) | 0.040 | 0.088 | 0.65 | 0.053 | 0.147 | 0.72 |
| | CTX ($log_2$) | 0.117 | 0.136 | 0.39 | 0.448 | 0.243 | 0.06 |

Results from linear regression models adjusted for age, waist circumference, smoking, 25-hydroxy vitamin D, intake of analgesics, platelets, position on plate and hs-CRP or testosterone and estradiol concentrations. ß, ß-coefficient; BTM, bone turnover marker; BUA, broadband-ultrasound attenuation; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; QUS, quantitative ultrasound; SOS, speed of sound; std err, standard error. *Estradiol concentrations were available in all 201 men and in 99 of 181 women

**Supplemental Table 4.** Median with 1st and 3rd quartile for the plasmaYKL-40 concentration (n=382 SHIP-Trend participants), the QUS-based parameters (n=5777 SHIP-2 and SHIP-Trend participants), and the BTMs (n= 7190 SHIP-1 and SHIP-Trend participants) according to the genetic variation in the lead SNP.

| rs4950928 | Parameter | Men | | Women | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | n | Median (Q1-Q3) | n | Median (Q1-Q3) |
| CC | YKL-40, ng/ml | 128 | 9.44 (8.11 - 11.06) | 110 | 9.33 (7.68 - 11.14) |
| GC | | 68 | 8.03 (6.99 - 10.30) | 66 | 7.94 (6.56 - 9.09) |
| GG | | 5 | 5.82 (5.07 - 6.44) | 5 | 5.57 (5.07 - 8.85) |
| CC | BUA, dB/MHz | 1742 | 116 (107 - 126) | 1800 | 108 (99 - 119) |
| GC | | 917 | 118 (108 - 128) | 1045 | 108 (99 - 118) |
| GG | | 129 | 116 (109 - 124) | 144 | 108 (98 - 122) |
| CC | SOS, m/s | 1742 | 1,560 (1,538 - 1,584) | 1800 | 1,559 (1,538 - 1,581) |
| GC | | 917 | 1,563 (1,540 - 1,589) | 1045 | 1,560 (1,539 - 1,583) |
| GG | | 129 | 1,563 (1,540 - 1,586) | 144 | 1,559 (1,536 - 1,587) |
| CC | Stiffness Index | 1742 | 94.8 (83.2 - 107.4) | 1800 | 88.7 (77.8 - 101.4) |
| GC | | 917 | 97.0 (84.1 - 109.8) | 1045 | 89.1 (78.1 - 101.3) |
| GG | | 129 | 96.1 (84.6 - 108.1) | 144 | 89.3 (76.8 - 106.4) |
| CC | PINP, ng/ml | 2183 | 40.8 (31.4 - 53.4) | 2231 | 41.9 (31.5 - 56.8) |
| GC | | 1151 | 40.5 (30.6 - 52.8) | 1298 | 42.0 (31.4 - 55.7) |
| GG | | 159 | 39.5 (30.2 - 52.7) | 168 | 45.9 (35.2 - 61.0) |
| CC | CTX, ng/ml | 2183 | 0.27 (0.17 - 0.40) | 2231 | 0.25 (0.15 - 0.39) |
| GC | | 1151 | 0.26 (0.16 - 0.40) | 1298 | 0.25 (0.16 - 0.40) |
| GG | | 159 | 0.25 (0.15 - 0.40) | 168 | 0.28 (0.17 - 0.41) |

BUA, broadband-ultrasound attenuation; SOS, speed of sound; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen

**Supplemental Table 5.** Association between the SNPs and the YKL-40 plasma concentration in 382 subjects.

| RSID | Non-effect allele | Effect allele | Men | | | | Women | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ß | std err | p | FDR | ß | std err | p | FDR |
| ***rs4950928*** | C | G | -0.219 | 0.049 | <0.001 | <0.001 | -0.256 | 0.048 | <0.001 | <0.001 |
| *rs946263* | *A* | *G* | -0.181 | 0.052 | <0.01 | <0.01 | -0.239 | 0.051 | <0.001 | <0.001 |
| *rs946261* | T | C | -0.103 | 0.042 | 0.01 | 0.12 | -0.158 | 0.041 | <0.001 | <0.01 |
| rs6686206 | A | G | 0.122 | 0.054 | 0.02 | 0.20 | -0.005 | 0.057 | 0.94 | 0.96 |
| *rs880633* | C | T | -0.075 | 0.037 | 0.04 | 0.23 | -0.119 | 0.040 | <0.01 | 0.04 |
| rs3766560 | T | C | -0.122 | 0.061 | 0.04 | 0.23 | -0.036 | 0.060 | 0.55 | 0.84 |
| rs872129 | G | A | -0.111 | 0.059 | 0.06 | 0.29 | -0.111 | 0.074 | 0.13 | 0.37 |
| rs2642531 | C | G | -0.123 | 0.066 | 0.06 | 0.29 | -0.003 | 0.067 | 0.96 | 0.96 |
| rs3766539 | C | T | -0.126 | 0.074 | 0.09 | 0.33 | -0.107 | 0.076 | 0.16 | 0.39 |
| rs3753473 | A | G | 0.108 | 0.064 | 0.09 | 0.33 | 0.172 | 0.082 | 0.04 | 0.23 |
| rs7542294 | A | G | -0.097 | 0.059 | 0.10 | 0.34 | -0.024 | 0.068 | 0.72 | 0.92 |
| rs3753472 | C | T | 0.065 | 0.041 | 0.11 | 0.36 | -0.003 | 0.041 | 0.94 | 0.96 |
| rs10920576 | T | C | -0.102 | 0.066 | 0.12 | 0.36 | -0.010 | 0.063 | 0.87 | 0.96 |
| rs10800901 | G | A | -0.061 | 0.042 | 0.14 | 0.38 | 0.003 | 0.042 | 0.94 | 0.96 |
| rs12026765 | T | C | -0.091 | 0.067 | 0.18 | 0.41 | -0.005 | 0.066 | 0.94 | 0.96 |
| rs10399805 | A | G | -0.090 | 0.067 | 0.18 | 0.41 | -0.085 | 0.070 | 0.23 | 0.48 |
| rs12141375 | A | C | -0.062 | 0.048 | 0.20 | 0.45 | 0.005 | 0.050 | 0.92 | 0.96 |
| rs2886117 | A | G | -0.083 | 0.070 | 0.24 | 0.48 | -0.058 | 0.068 | 0.39 | 0.70 |
| rs2486072 | G | T | -0.045 | 0.038 | 0.24 | 0.48 | -0.052 | 0.042 | 0.22 | 0.48 |
| rs2486949 | C | T | -0.044 | 0.037 | 0.24 | 0.48 | -0.071 | 0.040 | 0.08 | 0.31 |
| rs762625 | C | T | -0.053 | 0.046 | 0.25 | 0.49 | -0.078 | 0.051 | 0.13 | 0.36 |
| rs2486962 | A | G | -0.038 | 0.037 | 0.29 | 0.56 | -0.104 | 0.041 | 0.01 | 0.10 |
| rs10920574 | T | G | -0.090 | 0.102 | 0.38 | 0.70 | -0.045 | 0.106 | 0.67 | 0.91 |
| rs6672661 | A | G | 0.034 | 0.041 | 0.41 | 0.72 | 0.025 | 0.042 | 0.55 | 0.84 |
| rs2494295 | G | A | 0.032 | 0.040 | 0.43 | 0.73 | -0.002 | 0.040 | 0.95 | 0.96 |
| rs6427997 | A | C | 0.030 | 0.042 | 0.48 | 0.79 | 0.064 | 0.042 | 0.13 | 0.36 |
| rs3766562 | T | C | -0.074 | 0.110 | 0.50 | 0.81 | -0.131 | 0.093 | 0.16 | 0.39 |
| rs3820145 | C | T | -0.031 | 0.048 | 0.52 | 0.83 | -0.101 | 0.050 | 0.04 | 0.23 |
| rs11587584 | A | G | 0.048 | 0.080 | 0.55 | 0.84 | 0.014 | 0.078 | 0.86 | 0.96 |
| rs3766553 | G | A | 0.021 | 0.038 | 0.58 | 0.87 | -0.004 | 0.041 | 0.92 | 0.96 |
| rs2494287 | C | T | 0.031 | 0.066 | 0.63 | 0.91 | 0.121 | 0.068 | 0.07 | 0.31 |
| rs2486948 | A | G | 0.026 | 0.055 | 0.64 | 0.91 | 0.155 | 0.054 | <0.01 | 0.05 |
| rs2297950 | T | C | -0.018 | 0.040 | 0.66 | 0.91 | -0.088 | 0.040 | 0.03 | 0.21 |
| rs17532442 | T | C | -0.030 | 0.068 | 0.66 | 0.91 | -0.094 | 0.067 | 0.16 | 0.39 |
| rs883389 | T | C | -0.018 | 0.043 | 0.68 | 0.91 | -0.069 | 0.039 | 0.08 | 0.31 |
| rs4950937 | A | G | -0.016 | 0.041 | 0.69 | 0.91 | -0.080 | 0.039 | 0.04 | 0.23 |
| rs1340237 | T | C | -0.017 | 0.042 | 0.70 | 0.91 | -0.064 | 0.042 | 0.12 | 0.36 |
| rs2494302 | G | A | 0.037 | 0.101 | 0.71 | 0.92 | -0.258 | 0.097 | <0.01 | 0.09 |
| rs1340239 | G | A | 0.027 | 0.093 | 0.77 | 0.96 | 0.140 | 0.084 | 0.10 | 0.33 |
| rs2250509 | G | A | 0.014 | 0.062 | 0.83 | 0.96 | 0.017 | 0.060 | 0.78 | 0.96 |
| rs871850 | T | C | -0.009 | 0.040 | 0.83 | 0.96 | 0.031 | 0.040 | 0.45 | 0.75 |
| rs12123883 | C | T | -0.010 | 0.071 | 0.88 | 0.96 | -0.006 | 0.097 | 0.95 | 0.96 |
| rs1065761 | A | G | 0.003 | 0.053 | 0.95 | 0.96 | -0.047 | 0.051 | 0.36 | 0.67 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rs4971226 | G | T | -0.002 | 0.040 | 0.95 | 0.96 | -0.009 | 0.041 | 0.82 | 0.96 |

The lead SNP is printed in bold italics, further significant results (FDR <0.05) are printed in italics.The ß-coefficients represent the effect size for changes from non-effect (CC) to effect allele (GG). Results from sex-specific linear regression models adjusted for age, platelet count and position on plate.

ß, ß-coefficient; FDR, false discovery rate; std err, standard error

**Supplemental Table 6.** Association between the different SNPs and the QUS-based parameters in 5777 SHIP-2 and SHIP-Trend participants.

| RSID | Non-effect allle | Effect allele | Out-come | Men ß | Men stderr | Men p | Men FDR | Women ß | Women stderr | Women p | Women FDR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rs2486072 | G | T | BUA | 1.361 | 0.407 | <0.001 | 0.16 | 0.632 | 0.398 | 0.11 | 0.58 |
| rs871850 | T | C | BUA | -1.072 | 0.368 | <0.01 | 0.32 | 0.153 | 0.355 | 0.67 | 0.88 |
| rs2486948 | A | G | BUA | -1.426 | 0.516 | 0.01 | 0.33 | 0.612 | 0.503 | 0.22 | 0.68 |
| rs12141375 | A | C | BUA | 1.148 | 0.472 | 0.02 | 0.42 | -0.355 | 0.462 | 0.44 | 0.77 |
| rs2250509 | G | A | BUA | -1.110 | 0.573 | 0.05 | 0.51 | 0.002 | 0.559 | 1.00 | 1.00 |
| rs2494287 | C | T | BUA | -1.275 | 0.600 | 0.03 | 0.51 | 0.541 | 0.568 | 0.34 | 0.71 |
| rs2494302 | G | A | BUA | 1.805 | 0.915 | 0.05 | 0.51 | -1.087 | 0.955 | 0.26 | 0.68 |
| rs3766539 | C | T | BUA | 1.413 | 0.701 | 0.04 | 0.51 | -0.033 | 0.722 | 0.96 | 0.99 |
| rs3766562 | T | C | BUA | 2.047 | 1.014 | 0.04 | 0.51 | -0.224 | 0.982 | 0.82 | 0.97 |
| rs4971226 | G | T | BUA | -0.839 | 0.377 | 0.03 | 0.51 | 0.010 | 0.359 | 0.98 | 0.99 |
| rs762625 | C | T | BUA | -1.100 | 0.482 | 0.02 | 0.51 | 0.042 | 0.464 | 0.93 | 0.99 |
| rs1065761_2 | C | G | BUA | -0.944 | 0.524 | 0.07 | 0.55 | 0.316 | 0.497 | 0.53 | 0.82 |
| rs1340239 | G | A | BUA | -1.296 | 0.842 | 0.12 | 0.58 | 0.868 | 0.821 | 0.29 | 0.68 |
| rs17532442 | T | C | BUA | -1.056 | 0.658 | 0.11 | 0.58 | 0.480 | 0.625 | 0.44 | 0.77 |
| rs946263 | A | G | BUA | 0.813 | 0.472 | 0.08 | 0.58 | 0.753 | 0.451 | 0.09 | 0.58 |
| rs872129 | G | A | BUA | 0.915 | 0.620 | 0.14 | 0.61 | -0.331 | 0.628 | 0.60 | 0.86 |
| rs2486962 | A | G | BUA | 0.525 | 0.366 | 0.15 | 0.63 | 0.672 | 0.354 | 0.06 | 0.51 |
| rs7542294 | A | G | BUA | 0.761 | 0.539 | 0.16 | 0.63 | 0.284 | 0.539 | 0.60 | 0.86 |
| rs6672661 | A | G | BUA | 0.550 | 0.401 | 0.17 | 0.65 | 0.355 | 0.384 | 0.36 | 0.71 |
| rs11587584 | A | G | BUA | 0.786 | 0.714 | 0.27 | 0.68 | -0.055 | 0.706 | 0.94 | 0.99 |
| rs12123883 | C | T | BUA | 0.790 | 0.761 | 0.30 | 0.68 | -0.592 | 0.711 | 0.41 | 0.76 |
| rs2486949 | C | T | BUA | 0.380 | 0.363 | 0.29 | 0.68 | 0.242 | 0.354 | 0.49 | 0.80 |
| rs3820145 | C | T | BUA | 0.572 | 0.464 | 0.22 | 0.68 | 0.877 | 0.463 | 0.06 | 0.51 |
| ***rs4950928*** | ***C*** | ***G*** | ***BUA*** | ***0.463*** | ***0.453*** | ***0.31*** | ***0.68*** | ***0.523*** | ***0.431*** | ***0.23*** | ***0.68*** |
| rs6427997 | A | C | BUA | 0.460 | 0.401 | 0.25 | 0.68 | 0.368 | 0.384 | 0.34 | 0.71 |
| rs883389 | T | C | BUA | -0.435 | 0.402 | 0.28 | 0.68 | 0.365 | 0.394 | 0.35 | 0.71 |
| rs946261 | T | C | BUA | 0.512 | 0.391 | 0.19 | 0.68 | 0.347 | 0.367 | 0.35 | 0.71 |
| rs4950937 | A | G | BUA | -0.354 | 0.391 | 0.37 | 0.72 | 0.597 | 0.388 | 0.12 | 0.58 |
| rs2642531 | C | G | BUA | 0.447 | 0.591 | 0.45 | 0.77 | 0.709 | 0.583 | 0.22 | 0.68 |
| rs6686206 | A | G | BUA | -0.408 | 0.537 | 0.45 | 0.77 | -0.680 | 0.534 | 0.20 | 0.68 |
| rs3753473 | A | G | BUA | 0.548 | 0.759 | 0.47 | 0.79 | 0.420 | 0.732 | 0.57 | 0.84 |
| rs1340237 | T | C | BUA | 0.294 | 0.417 | 0.48 | 0.80 | 0.844 | 0.406 | 0.04 | 0.51 |
| rs12026765 | T | C | BUA | 0.405 | 0.619 | 0.51 | 0.80 | 0.646 | 0.607 | 0.29 | 0.68 |
| rs3766560 | T | C | BUA | 0.382 | 0.572 | 0.50 | 0.80 | 0.933 | 0.570 | 0.10 | 0.58 |
| rs10920576 | T | C | BUA | 0.272 | 0.592 | 0.65 | 0.88 | 0.955 | 0.581 | 0.10 | 0.58 |
| rs2886117 | A | G | BUA | 0.237 | 0.596 | 0.69 | 0.90 | 0.034 | 0.581 | 0.95 | 0.99 |
| rs2297950 | T | C | BUA | -0.126 | 0.385 | 0.74 | 0.93 | 0.812 | 0.375 | 0.03 | 0.51 |
| rs2494295 | G | A | BUA | 0.132 | 0.378 | 0.73 | 0.93 | 0.589 | 0.363 | 0.11 | 0.58 |
| rs3753472 | C | T | BUA | -0.129 | 0.391 | 0.74 | 0.93 | -0.428 | 0.377 | 0.26 | 0.68 |
| rs1065761 | A | G | BUA | 15.392 | 100.143 | 0.88 | 0.97 | 73.459 | 49.723 | 0.14 | 0.61 |
| rs10399805 | A | G | BUA | 0.057 | 0.588 | 0.92 | 0.99 | -0.116 | 0.584 | 0.84 | 0.97 |
| rs3766553 | G | A | BUA | 0.032 | 0.375 | 0.93 | 0.99 | -0.006 | 0.358 | 0.99 | 0.99 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rs10920574 | T | G | BUA | -0.016 | 0.982 | 0.99 | 0.99 | 2.501 | 0.911 | 0.01 | 0.33 |
| rs10800901 | G | A | BUA | -0.002 | 0.409 | 1.00 | 1.00 | 0.472 | 0.387 | 0.22 | 0.68 |
| rs2486072 | G | T | SOS | 2.943 | 1.110 | 0.01 | 0.35 | 1.563 | 0.896 | 0.08 | 0.58 |
| rs1065761_2 | C | G | SOS | -2.777 | 1.427 | 0.05 | 0.51 | 0.222 | 1.118 | 0.84 | 0.97 |
| rs12141375 | A | C | SOS | 2.612 | 1.285 | 0.04 | 0.51 | 0.775 | 1.039 | 0.46 | 0.78 |
| rs17532442 | T | C | SOS | -3.863 | 1.790 | 0.03 | 0.51 | -0.240 | 1.405 | 0.86 | 0.97 |
| rs871850 | T | C | SOS | -1.947 | 1.003 | 0.05 | 0.51 | -0.566 | 0.799 | 0.48 | 0.80 |
| rs1065761 | A | G | SOS | 445.0 | 272.6 | 0.10 | 0.58 | 68.94 | 111.8 | 0.54 | 0.82 |
| rs4950937 | A | G | SOS | -1.735 | 1.065 | 0.10 | 0.58 | -0.043 | 0.873 | 0.96 | 0.99 |
| rs4971226 | G | T | SOS | -1.573 | 1.026 | 0.13 | 0.58 | -0.678 | 0.808 | 0.40 | 0.76 |
| rs883389 | T | C | SOS | -1.889 | 1.095 | 0.08 | 0.58 | -0.268 | 0.885 | 0.76 | 0.94 |
| rs3766539 | C | T | SOS | 2.701 | 1.910 | 0.16 | 0.63 | 2.054 | 1.624 | 0.21 | 0.68 |
| rs2486948 | A | G | SOS | -1.495 | 1.407 | 0.29 | 0.68 | -0.161 | 1.132 | 0.89 | 0.97 |
| rs2494295 | G | A | SOS | 1.079 | 1.030 | 0.29 | 0.68 | 1.079 | 0.817 | 0.19 | 0.68 |
| rs2494302 | G | A | SOS | 2.842 | 2.492 | 0.25 | 0.68 | -0.489 | 2.147 | 0.82 | 0.97 |
| rs3753473 | A | G | SOS | 2.289 | 2.066 | 0.27 | 0.68 | -0.263 | 1.646 | 0.87 | 0.97 |
| rs6427997 | A | C | SOS | 1.127 | 1.093 | 0.30 | 0.68 | 0.912 | 0.862 | 0.29 | 0.68 |
| rs6672661 | A | G | SOS | 1.367 | 1.093 | 0.21 | 0.68 | 0.958 | 0.862 | 0.27 | 0.68 |
| rs2642531 | C | G | SOS | 1.610 | 1.609 | 0.32 | 0.70 | 1.433 | 1.310 | 0.27 | 0.68 |
| rs946263 | A | G | SOS | 1.251 | 1.285 | 0.33 | 0.71 | 1.132 | 1.014 | 0.26 | 0.68 |
| rs2297950 | T | C | SOS | -0.938 | 1.049 | 0.37 | 0.73 | 0.656 | 0.844 | 0.44 | 0.77 |
| rs10920574 | T | G | SOS | 2.240 | 2.675 | 0.40 | 0.76 | 3.737 | 2.049 | 0.07 | 0.54 |
| rs3820145 | C | T | SOS | 0.981 | 1.263 | 0.44 | 0.77 | 0.771 | 1.041 | 0.46 | 0.78 |
| rs762625 | C | T | SOS | -1.018 | 1.313 | 0.44 | 0.77 | -0.360 | 1.043 | 0.73 | 0.93 |
| rs2494287 | C | T | SOS | -1.154 | 1.635 | 0.48 | 0.80 | -0.078 | 1.277 | 0.95 | 0.99 |
| rs12123883 | C | T | SOS | 1.441 | 2.072 | 0.49 | 0.80 | -0.250 | 1.599 | 0.88 | 0.97 |
| ***rs4950928*** | ***C*** | ***G*** | ***SOS*** | ***0.860*** | ***1.234*** | ***0.49*** | ***0.80*** | ***0.771*** | ***0.970*** | ***0.43*** | ***0.77*** |
| rs3766562 | T | C | SOS | 1.625 | 2.763 | 0.56 | 0.83 | 0.698 | 2.208 | 0.75 | 0.93 |
| rs2886117 | A | G | SOS | 0.920 | 1.623 | 0.57 | 0.85 | -0.432 | 1.306 | 0.74 | 0.93 |
| rs7542294 | A | G | SOS | 0.811 | 1.467 | 0.58 | 0.85 | 1.311 | 1.211 | 0.28 | 0.68 |
| rs10800901 | G | A | SOS | 0.555 | 1.114 | 0.62 | 0.88 | 1.129 | 0.871 | 0.20 | 0.68 |
| rs872129 | G | A | SOS | 0.844 | 1.689 | 0.62 | 0.88 | 0.835 | 1.411 | 0.55 | 0.83 |
| rs11587584 | A | G | SOS | 0.854 | 1.946 | 0.66 | 0.88 | 1.546 | 1.587 | 0.33 | 0.71 |
| rs2250509 | G | A | SOS | -0.702 | 1.560 | 0.65 | 0.88 | -1.004 | 1.256 | 0.42 | 0.77 |
| rs2486962 | A | G | SOS | 0.451 | 0.996 | 0.65 | 0.88 | 1.254 | 0.795 | 0.11 | 0.58 |
| rs3766553 | G | A | SOS | 0.443 | 1.021 | 0.66 | 0.88 | -0.092 | 0.806 | 0.91 | 0.98 |
| rs946261 | T | C | SOS | 0.483 | 1.065 | 0.65 | 0.88 | 0.551 | 0.826 | 0.50 | 0.80 |
| rs3753472 | C | T | SOS | 0.420 | 1.065 | 0.69 | 0.90 | -0.878 | 0.847 | 0.30 | 0.68 |
| rs880633 | C | T | SOS | -0.371 | 1.017 | 0.72 | 0.92 | -0.094 | 0.788 | 0.91 | 0.98 |
| rs1340237 | T | C | SOS | -0.358 | 1.136 | 0.75 | 0.93 | 1.231 | 0.914 | 0.18 | 0.67 |
| rs6686206 | A | G | SOS | 0.386 | 1.463 | 0.79 | 0.95 | -1.257 | 1.201 | 0.30 | 0.68 |
| rs10399805 | A | G | SOS | 0.263 | 1.603 | 0.87 | 0.97 | -0.231 | 1.314 | 0.86 | 0.97 |
| rs10920576 | T | C | SOS | 0.259 | 1.612 | 0.87 | 0.97 | 1.519 | 1.306 | 0.24 | 0.68 |
| rs1340239 | G | A | SOS | 0.442 | 2.295 | 0.85 | 0.97 | 0.581 | 1.846 | 0.75 | 0.93 |
| rs2486949 | C | T | SOS | 0.149 | 0.988 | 0.88 | 0.97 | 0.390 | 0.796 | 0.62 | 0.88 |
| rs3766560 | T | C | SOS | 0.288 | 1.558 | 0.85 | 0.97 | 1.505 | 1.282 | 0.24 | 0.68 |
| rs12026765 | T | C | SOS | 0.195 | 1.686 | 0.91 | 0.98 | 1.091 | 1.364 | 0.42 | 0.77 |
| rs2486072 | G | T | SI | 1.736 | 0.536 | <0.01 | 0.16 | 0.862 | 0.464 | 0.06 | 0.53 |
| rs871850 | T | C | SI | -1.263 | 0.485 | <0.01 | 0.35 | -0.056 | 0.414 | 0.89 | 0.97 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rs12141375 | A | C | SI | 1.500 | 0.621 | 0.02 | 0.42 | -0.021 | 0.539 | 0.97 | 0.99 |
| rs1065761_2 | C | G | SI | -1.410 | 0.690 | 0.04 | 0.51 | 0.273 | 0.580 | 0.64 | 0.88 |
| rs17532442 | T | C | SI | -1.789 | 0.865 | 0.04 | 0.51 | 0.254 | 0.728 | 0.73 | 0.93 |
| rs2486948 | A | G | SI | -1.374 | 0.679 | 0.04 | 0.51 | 0.365 | 0.587 | 0.53 | 0.82 |
| rs4971226 | G | T | SI | -1.002 | 0.496 | 0.04 | 0.51 | -0.183 | 0.419 | 0.66 | 0.88 |
| rs3766539 | C | T | SI | 1.703 | 0.923 | 0.06 | 0.53 | 0.553 | 0.842 | 0.51 | 0.80 |
| rs2494302 | G | A | SI | 2.005 | 1.204 | 0.10 | 0.58 | -0.865 | 1.113 | 0.44 | 0.77 |
| rs762625 | C | T | SI | -1.022 | 0.634 | 0.11 | 0.58 | -0.073 | 0.541 | 0.89 | 0.97 |
| rs883389 | T | C | SI | -0.821 | 0.529 | 0.12 | 0.58 | 0.169 | 0.459 | 0.71 | 0.92 |
| rs2494287 | C | T | SI | -1.177 | 0.790 | 0.14 | 0.61 | 0.341 | 0.662 | 0.61 | 0.87 |
| rs4950937 | A | G | SI | -0.723 | 0.515 | 0.16 | 0.63 | 0.388 | 0.453 | 0.39 | 0.76 |
| rs6672661 | A | G | SI | 0.752 | 0.528 | 0.15 | 0.63 | 0.506 | 0.447 | 0.26 | 0.68 |
| rs946263 | A | G | SI | 0.894 | 0.621 | 0.15 | 0.63 | 0.822 | 0.525 | 0.12 | 0.58 |
| rs3766562 | T | C | SI | 1.827 | 1.335 | 0.17 | 0.65 | 0.045 | 1.144 | 0.97 | 0.99 |
| rs1065761 | A | G | SI | 134.9 | 131.8 | 0.31 | 0.68 | 68.51 | 57.94 | 0.24 | 0.68 |
| rs2250509 | G | A | SI | -0.940 | 0.754 | 0.21 | 0.68 | -0.280 | 0.651 | 0.67 | 0.88 |
| rs3820145 | C | T | SI | 0.658 | 0.610 | 0.28 | 0.68 | 0.804 | 0.539 | 0.14 | 0.61 |
| rs6427997 | A | C | SI | 0.623 | 0.528 | 0.24 | 0.68 | 0.502 | 0.447 | 0.26 | 0.68 |
| rs7542294 | A | G | SI | 0.737 | 0.709 | 0.30 | 0.68 | 0.557 | 0.628 | 0.37 | 0.73 |
| rs872129 | G | A | SI | 0.850 | 0.816 | 0.30 | 0.68 | 0.012 | 0.731 | 0.99 | 0.99 |
| rs3753473 | A | G | SI | 1.008 | 0.998 | 0.31 | 0.69 | 0.208 | 0.853 | 0.81 | 0.96 |
| rs2486962 | A | G | SI | 0.478 | 0.481 | 0.32 | 0.70 | 0.801 | 0.412 | 0.05 | 0.51 |
| rs12123883 | C | T | SI | 0.933 | 1.001 | 0.35 | 0.71 | -0.467 | 0.829 | 0.57 | 0.85 |
| rs2642531 | C | G | SI | 0.750 | 0.778 | 0.33 | 0.71 | 0.876 | 0.679 | 0.20 | 0.68 |
| ***rs4950928*** | ***C*** | ***G*** | SI | ***0.551*** | ***0.596*** | ***0.36*** | ***0.71*** | ***0.566*** | ***0.503*** | ***0.26*** | ***0.68*** |
| rs946261 | T | C | SI | 0.478 | 0.515 | 0.35 | 0.71 | 0.386 | 0.428 | 0.37 | 0.72 |
| rs11587584 | A | G | SI | 0.766 | 0.940 | 0.42 | 0.77 | 0.396 | 0.822 | 0.63 | 0.88 |
| rs2494295 | G | A | SI | 0.391 | 0.498 | 0.43 | 0.77 | 0.696 | 0.423 | 0.10 | 0.58 |
| rs2297950 | T | C | SI | -0.347 | 0.507 | 0.49 | 0.80 | 0.728 | 0.437 | 0.10 | 0.58 |
| rs1340239 | G | A | SI | -0.745 | 1.109 | 0.50 | 0.80 | 0.744 | 0.957 | 0.44 | 0.77 |
| rs2486949 | C | T | SI | 0.296 | 0.477 | 0.53 | 0.82 | 0.271 | 0.412 | 0.51 | 0.80 |
| rs2886117 | A | G | SI | 0.416 | 0.784 | 0.60 | 0.86 | -0.099 | 0.677 | 0.88 | 0.97 |
| rs10920574 | T | G | SI | 0.617 | 1.293 | 0.63 | 0.88 | 2.722 | 1.061 | 0.01 | 0.35 |
| rs3766560 | T | C | SI | 0.337 | 0.753 | 0.65 | 0.88 | -1.047 | 0.664 | 0.12 | 0.58 |
| rs12026765 | T | C | SI | 0.326 | 0.815 | 0.69 | 0.90 | 0.738 | 0.707 | 0.30 | 0.68 |
| rs10920576 | T | C | SI | 0.255 | 0.779 | 0.74 | 0.93 | 1.065 | 0.677 | 0.12 | 0.58 |
| rs10800901 | G | A | SI | 0.154 | 0.539 | 0.77 | 0.94 | 0.632 | 0.451 | 0.16 | 0.63 |
| rs3766553 | G | A | SI | 0.145 | 0.493 | 0.77 | 0.94 | -0.030 | 0.418 | 0.94 | 0.99 |
| rs880633 | C | T | SI | -0.126 | 0.492 | 0.80 | 0.96 | 0.118 | 0.409 | 0.77 | 0.94 |
| rs6686206 | A | G | SI | -0.165 | 0.707 | 0.82 | 0.97 | -0.807 | 0.622 | 0.19 | 0.68 |
| rs10399805 | A | G | SI | 0.111 | 0.774 | 0.89 | 0.97 | -0.142 | 0.681 | 0.83 | 0.97 |
| rs1340237 | T | C | SI | 0.097 | 0.549 | 0.86 | 0.97 | 0.910 | 0.474 | 0.05 | 0.51 |
| rs3753472 | C | T | SI | 0.031 | 0.514 | 0.95 | 0.99 | -0.533 | 0.439 | 0.23 | 0.68 |

The lead SNP is printed in bold italics. The ß-coefficients represent the effect size for changes from non-effect (CC) to effect allele (GG). Results from sex-specific linear regression models adjusted for age and study.

ß, ß-coefficient; BUA, broadband-ultrasound attenuation; FDR, false discovery rate; QUS, quantitative ultrasound; SI, stiffness index; SOS, speed of sound; std err, standard error

**Supplemental Table 7.** Association between the different SNPs and the BTMs in 7190 SHIP-1 and SHIP-Trend participants.

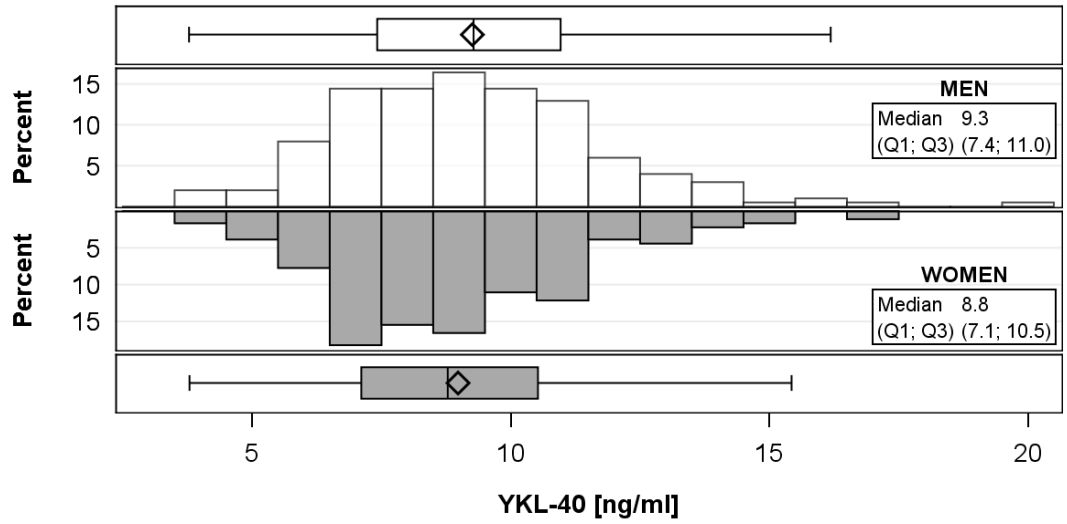
| RSID | Non-effect allele | Effect allele | Outcome | Men | | | | Women | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ß | std err | p | FDR | ß | std err | p | FDR |
| rs10800901 | G | A | CTX ($log_2$) | -0.083 | 0.023 | <0.001 | 0.08 | 0.010 | 0.024 | 0.70 | 0.88 |
| ***rs4950928*** | ***C*** | ***G*** | ***CTX ($log_2$)*** | ***-0.076*** | ***0.026*** | ***<0.01*** | ***0.33*** | ***0.058*** | ***0.027*** | ***0.03*** | ***0.47*** |
| rs946263 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.075 | 0.027 | <0.01 | 0.34 | 0.038 | 0.029 | 0.18 | 0.59 |
| rs3753472 | C | T | CTX ($log_2$) | 0.057 | 0.023 | 0.01 | 0.40 | -0.033 | 0.024 | 0.17 | 0.59 |
| rs880633 | C | T | CTX ($log_2$) | -0.044 | 0.021 | 0.04 | 0.47 | 0.045 | 0.022 | 0.04 | 0.47 |
| rs17532442 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.068 | 0.038 | 0.07 | 0.52 | -0.002 | 0.040 | 0.96 | 0.99 |
| rs3766560 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.059 | 0.033 | 0.07 | 0.52 | -0.057 | 0.036 | 0.11 | 0.59 |
| rs2642531 | C | G | CTX ($log_2$) | -0.060 | 0.034 | 0.08 | 0.53 | -0.046 | 0.037 | 0.21 | 0.59 |
| rs946261 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.039 | 0.022 | 0.08 | 0.53 | 0.050 | 0.023 | 0.03 | 0.47 |
| rs10920576 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.057 | 0.034 | 0.10 | 0.55 | -0.052 | 0.037 | 0.16 | 0.59 |
| rs10920574 | T | G | CTX ($log_2$) | -0.086 | 0.057 | 0.13 | 0.59 | -0.031 | 0.058 | 0.60 | 0.86 |
| rs12026765 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.052 | 0.036 | 0.15 | 0.59 | -0.055 | 0.038 | 0.15 | 0.59 |
| rs6686206 | A | G | CTX ($log_2$) | 0.050 | 0.031 | 0.11 | 0.59 | 0.040 | 0.034 | 0.23 | 0.60 |
| rs10399805 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.043 | 0.034 | 0.20 | 0.59 | -0.001 | 0.036 | 0.99 | 1.00 |
| rs1065761 | A | G | CTX ($log_2$) | -7.692 | 6.034 | 0.20 | 0.59 | 2.709 | 3.439 | 0.43 | 0.77 |
| rs2486949 | C | T | CTX ($log_2$) | -0.026 | 0.021 | 0.22 | 0.59 | 0.017 | 0.022 | 0.44 | 0.77 |
| rs2486962 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.026 | 0.021 | 0.21 | 0.59 | 0.032 | 0.022 | 0.15 | 0.59 |
| rs2886117 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.044 | 0.034 | 0.20 | 0.59 | -0.008 | 0.036 | 0.84 | 0.95 |
| rs3766553 | G | A | CTX ($log_2$) | 0.029 | 0.022 | 0.19 | 0.59 | -0.048 | 0.022 | 0.03 | 0.47 |
| rs7542294 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.037 | 0.031 | 0.23 | 0.60 | -0.015 | 0.034 | 0.66 | 0.88 |
| rs1340237 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.027 | 0.024 | 0.26 | 0.66 | 0.005 | 0.026 | 0.86 | 0.96 |
| rs6672661 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.024 | 0.023 | 0.30 | 0.71 | -0.020 | 0.024 | 0.40 | 0.76 |
| rs872129 | G | A | CTX ($log_2$) | 0.036 | 0.036 | 0.32 | 0.73 | -0.061 | 0.039 | 0.12 | 0.59 |
| rs2297950 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.020 | 0.022 | 0.36 | 0.74 | 0.040 | 0.024 | 0.09 | 0.55 |
| rs4950937 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.021 | 0.023 | 0.35 | 0.74 | 0.034 | 0.024 | 0.16 | 0.59 |
| rs1065761_2 | C | G | CTX ($log_2$) | -0.027 | 0.030 | 0.37 | 0.76 | -0.021 | 0.032 | 0.51 | 0.82 |
| rs11587584 | A | G | CTX ($log_2$) | -0.035 | 0.041 | 0.40 | 0.76 | -0.056 | 0.043 | 0.20 | 0.59 |
| rs871850 | T | C | CTX ($log_2$) | 0.018 | 0.021 | 0.40 | 0.76 | 0.032 | 0.022 | 0.15 | 0.59 |
| rs883389 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.020 | 0.023 | 0.39 | 0.76 | 0.034 | 0.025 | 0.17 | 0.59 |
| rs4971226 | G | T | CTX ($log_2$) | 0.018 | 0.021 | 0.41 | 0.76 | 0.026 | 0.022 | 0.25 | 0.64 |
| rs2486072 | G | T | CTX ($log_2$) | -0.017 | 0.023 | 0.46 | 0.78 | 0.039 | 0.025 | 0.12 | 0.59 |
| rs2494295 | G | A | CTX ($log_2$) | -0.014 | 0.022 | 0.53 | 0.83 | -0.011 | 0.023 | 0.63 | 0.87 |
| rs2250509 | G | A | CTX ($log_2$) | 0.019 | 0.033 | 0.57 | 0.86 | 0.060 | 0.035 | 0.09 | 0.55 |
| rs3820145 | C | T | CTX ($log_2$) | -0.014 | 0.027 | 0.59 | 0.86 | 0.073 | 0.029 | 0.01 | 0.40 |
| rs762625 | C | T | CTX ($log_2$) | 0.014 | 0.028 | 0.62 | 0.87 | 0.029 | 0.029 | 0.33 | 0.73 |
| rs2486948 | A | G | CTX ($log_2$) | 0.014 | 0.030 | 0.65 | 0.88 | 0.019 | 0.031 | 0.55 | 0.85 |
| rs2494287 | C | T | CTX ($log_2$) | 0.013 | 0.034 | 0.71 | 0.88 | 0.011 | 0.035 | 0.75 | 0.89 |
| rs6427997 | A | C | CTX ($log_2$) | -0.009 | 0.023 | 0.69 | 0.88 | -0.018 | 0.024 | 0.44 | 0.77 |
| rs1340239 | G | A | CTX ($log_2$) | 0.010 | 0.048 | 0.84 | 0.95 | 0.063 | 0.051 | 0.21 | 0.59 |
| rs2494302 | G | A | CTX ($log_2$) | -0.012 | 0.053 | 0.83 | 0.95 | -0.021 | 0.060 | 0.72 | 0.89 |
| rs12123883 | C | T | CTX ($log_2$) | 0.006 | 0.044 | 0.89 | 0.97 | 0.066 | 0.045 | 0.15 | 0.59 |
| rs12141375 | A | C | CTX ($log_2$) | -0.002 | 0.027 | 0.93 | 0.97 | -0.013 | 0.029 | 0.66 | 0.88 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rs3766539 | C | T | CTX ($log_2$) | -0.003 | 0.040 | 0.94 | 0.97 | 0.033 | 0.046 | 0.48 | 0.78 |
| rs3766562 | T | C | CTX ($log_2$) | -0.000 | 0.058 | 1.00 | 1.00 | -0.089 | 0.062 | 0.15 | 0.59 |
| rs1065761 | A | G | PINP ($log_2$) | -7.833 | 3.631 | 0.03 | 0.47 | -1.134 | 2.228 | 0.61 | 0.87 |
| rs2494287 | C | T | PINP ($log_2$) | 0.042 | 0.021 | 0.04 | 0.47 | -0.000 | 0.023 | 0.98 | 1.00 |
| rs2486948 | A | G | PINP ($log_2$) | 0.032 | 0.018 | 0.07 | 0.52 | 0.006 | 0.020 | 0.75 | 0.89 |
| rs3753472 | C | T | PINP ($log_2$) | 0.026 | 0.014 | 0.06 | 0.52 | -0.020 | 0.015 | 0.18 | 0.59 |
| rs10800901 | G | A | PINP ($log_2$) | -0.024 | 0.014 | 0.09 | 0.55 | -0.002 | 0.016 | 0.88 | 0.97 |
| rs3766553 | G | A | PINP ($log_2$) | 0.020 | 0.013 | 0.13 | 0.59 | -0.027 | 0.015 | 0.06 | 0.52 |
| rs4950937 | A | G | PINP ($log_2$) | 0.020 | 0.014 | 0.15 | 0.59 | 0.031 | 0.016 | 0.05 | 0.52 |
| rs6427997 | A | C | PINP ($log_2$) | 0.020 | 0.014 | 0.15 | 0.59 | -0.008 | 0.015 | 0.60 | 0.86 |
| rs12141375 | A | C | PINP ($log_2$) | -0.020 | 0.016 | 0.22 | 0.59 | -0.008 | 0.019 | 0.66 | 0.88 |
| rs6672661 | A | G | PINP ($log_2$) | 0.019 | 0.014 | 0.17 | 0.59 | -0.014 | 0.016 | 0.36 | 0.74 |
| rs883389 | T | C | PINP ($log_2$) | 0.017 | 0.014 | 0.22 | 0.59 | 0.031 | 0.016 | 0.05 | 0.52 |
| rs1340239 | G | A | PINP ($log_2$) | 0.035 | 0.029 | 0.23 | 0.60 | 0.021 | 0.033 | 0.54 | 0.84 |
| ***rs4950928*** | ***C*** | ***G*** | ***PINP ($log_2$)*** | ***-0.017*** | ***0.016*** | ***0.28*** | ***0.68*** | ***0.018*** | ***0.018*** | ***0.30*** | ***0.71*** |
| rs2297950 | T | C | PINP ($log_2$) | 0.013 | 0.013 | 0.32 | 0.73 | 0.025 | 0.015 | 0.10 | 0.56 |
| rs3820145 | C | T | PINP ($log_2$) | 0.016 | 0.016 | 0.33 | 0.73 | 0.043 | 0.019 | 0.02 | 0.47 |
| rs1340237 | T | C | PINP ($log_2$) | 0.014 | 0.015 | 0.33 | 0.73 | 0.012 | 0.017 | 0.49 | 0.80 |
| rs17532442 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.022 | 0.023 | 0.33 | 0.73 | 0.010 | 0.026 | 0.70 | 0.88 |
| rs946263 | A | G | PINP ($log_2$) | -0.015 | 0.016 | 0.36 | 0.74 | 0.014 | 0.019 | 0.46 | 0.78 |
| rs10399805 | A | G | PINP ($log_2$) | -0.015 | 0.020 | 0.46 | 0.78 | -0.018 | 0.024 | 0.45 | 0.78 |
| rs2642531 | C | G | PINP ($log_2$) | -0.011 | 0.020 | 0.58 | 0.86 | -0.018 | 0.024 | 0.44 | 0.77 |
| rs2886117 | A | G | PINP ($log_2$) | -0.011 | 0.021 | 0.59 | 0.86 | -0.022 | 0.024 | 0.35 | 0.74 |
| rs3766562 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.020 | 0.035 | 0.58 | 0.86 | -0.034 | 0.040 | 0.40 | 0.76 |
| rs7542294 | A | G | PINP ($log_2$) | -0.010 | 0.019 | 0.58 | 0.86 | -0.014 | 0.022 | 0.52 | 0.83 |
| rs946261 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.007 | 0.014 | 0.62 | 0.87 | 0.028 | 0.015 | 0.06 | 0.52 |
| rs11587584 | A | G | PINP ($log_2$) | -0.011 | 0.025 | 0.66 | 0.88 | -0.070 | 0.028 | 0.01 | 0.40 |
| rs1065761_2 | C | G | PINP ($log_2$) | 0.007 | 0.018 | 0.70 | 0.88 | -0.009 | 0.021 | 0.66 | 0.88 |
| rs12026765 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.008 | 0.021 | 0.71 | 0.88 | -0.009 | 0.025 | 0.73 | 0.89 |
| rs3753473 | A | G | PINP ($log_2$) | 0.010 | 0.027 | 0.71 | 0.88 | 0.006 | 0.030 | 0.84 | 0.95 |
| rs2250509 | G | A | PINP ($log_2$) | -0.007 | 0.020 | 0.73 | 0.89 | 0.050 | 0.023 | 0.03 | 0.47 |
| rs2486962 | A | G | PINP ($log_2$) | 0.004 | 0.013 | 0.73 | 0.89 | 0.019 | 0.015 | 0.18 | 0.59 |
| rs762625 | C | T | PINP ($log_2$) | -0.005 | 0.017 | 0.75 | 0.89 | 0.029 | 0.019 | 0.13 | 0.59 |
| rs2486949 | C | T | PINP ($log_2$) | 0.003 | 0.013 | 0.81 | 0.95 | 0.015 | 0.014 | 0.30 | 0.71 |
| rs10920576 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.005 | 0.021 | 0.83 | 0.95 | -0.018 | 0.024 | 0.44 | 0.77 |
| rs2494295 | G | A | PINP ($log_2$) | 0.003 | 0.013 | 0.83 | 0.95 | -0.008 | 0.015 | 0.57 | 0.86 |
| rs2486072 | G | T | PINP ($log_2$) | 0.003 | 0.014 | 0.86 | 0.96 | 0.020 | 0.016 | 0.22 | 0.59 |
| rs10920574 | T | G | PINP ($log_2$) | -0.005 | 0.034 | 0.88 | 0.97 | -0.022 | 0.038 | 0.56 | 0.86 |
| rs2494302 | G | A | PINP ($log_2$) | -0.005 | 0.032 | 0.88 | 0.97 | -0.017 | 0.039 | 0.67 | 0.88 |
| rs880633 | C | T | PINP ($log_2$) | -0.002 | 0.013 | 0.89 | 0.97 | 0.026 | 0.014 | 0.07 | 0.52 |
| rs12123883 | C | T | PINP ($log_2$) | -0.002 | 0.027 | 0.95 | 0.97 | 0.012 | 0.029 | 0.68 | 0.88 |
| rs3766560 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.002 | 0.020 | 0.93 | 0.97 | -0.020 | 0.023 | 0.39 | 0.76 |
| rs4971226 | G | T | PINP ($log_2$) | -0.001 | 0.013 | 0.94 | 0.97 | 0.010 | 0.015 | 0.50 | 0.80 |
| rs6686206 | A | G | PINP ($log_2$) | 0.002 | 0.019 | 0.92 | 0.97 | 0.018 | 0.022 | 0.41 | 0.76 |
| rs871850 | T | C | PINP ($log_2$) | -0.001 | 0.013 | 0.92 | 0.97 | 0.013 | 0.014 | 0.36 | 0.74 |
| rs872129 | G | A | PINP ($log_2$) | -0.002 | 0.022 | 0.95 | 0.97 | -0.055 | 0.025 | 0.03 | 0.47 |
| rs3766539 | C | T | PINP ($log_2$) | -0.000 | 0.024 | 0.99 | 1.00 | 0.021 | 0.030 | 0.47 | 0.78 |

The lead SNP is printed in bold italics. The ß-coefficients represent the effect size for changes from non-effect (CC) to effect allele (GG). Results from sex-specific linear regression models adjusted for age and study.

ß, ß-coefficient; BTM, bone turnover marker; CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; FDR, false discovery rate; PINP, intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; std err, standard error

## Supplemental Figures




**Supplemental Figure 1**.YKL-40 concentration in 201 male and 181 female SHIP-Trend participants.