

Diplomarbeit

**Prädiktion des Frakturrisikos
MiRNAs als neue Biomarker**

eingereicht von

Leander Johannes Klaes

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie,
Universitätsklinikum Graz**

unter der Anleitung von

Ines Föbl, MSc

Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Barbara Obermayer-Pietsch

Graz, 5. Juli 2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 5. Juli 2022

Leander Klaes eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinen Betreuerinnen Frau Ines Föb1 und Frau Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Barbara Obermayer-Pietsch bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung meiner Diplomarbeit stets unterstützt haben. Vielen Dank!

Besonderer Dank gilt meiner Mutter, Malte, Silvester und natürlich Dir, Linda.

Ihr habt mich mit Eurem Frohsinn, Freigeistigkeit und Eurem Witz durch die gesamte Studienzzeit in Graz getragen.

in Andernach am Kirschbaum

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN.....	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS	X
ZUSAMMENFASSUNG	XI
ABSTRACT.....	XIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE GESELLSCHAFTLICHE RELEVANZ VON FRAKTUREN UND NEUE MÖGLICHKEITEN FÜR DIE ABSCHÄTZUNG DES FRAKTURRISIKOS.....	1
1.2 MIRNA.....	2
1.2.1 Biogenese der miRNAs.....	2
1.2.2 Nomenklatur und Einteilung der miRNAs.....	3
1.2.3 Zirkulierende, extrazelluläre miRNAs	4
1.2.4 Beispiele für miRNAs als Biomarker des Knochenstoffwechsels	5
1.3 OSTEOPOROSE UND DIABETOPOROSE.....	6
1.4 TESTVERFAHREN UND MESSPARAMETER.....	9
1.4.1 RT-qPCR	9
1.4.2 Parameter des quantitativen Knochenultraschalls (QUS)	10
1.4.3 Die Knochendichtemessung DXA und der T-Score	11
2 STUDIENHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG.....	13
2.1 STUDIENHYPOTHESEN	13
2.2 ZIELSETZUNG.....	14
2.3 ETHISCHER GESICHTSPUNKT	14
3 MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1 DATENERHEBUNG	15
3.1.1 Ausgewählte Studienpopulation in dieser Diplomarbeit.....	15
3.1.2 Die Auswahl der Studienpopulation	16
3.1.3 Die Fallzahl.....	16
3.1.4 Ein- und Ausschlusskriterien und Beobachtungszeitraum	16
3.1.4.1 Publikation 1: “Type 2 Diabetes mellitus in Nursing Home Patients: Effects on Bone Turnover, Bone Mass, and Fracture Risk”	17
3.1.4.2 Publikation 2: “Hip and Nonvertebral Fracture Prediction in Nursing Home Patients: Role of Bone Ultrasound and Bone Marker Measurements”	18
3.2 DATENAUSWERTUNG	19
3.2.1 Quantitative Expressionsbestimmung der miRNAs aus dem Blutserum	19
3.2.1.1 Untersuchte miRNAs und Primer-Auswahl	19
3.2.1.2 Qualitätskontrolle und Probenverarbeitung	20
3.2.1.3 Kontrollen.....	21
3.2.1.3.1 Exogene Kontrollen.....	21
3.2.1.3.2 Negativkontrollen	21
3.2.1.4 Expressionsanalyse.....	22
3.2.1.4.1 Extraktion der miRNA aus dem Blutserum.....	22
3.2.1.4.2 Reverse Transkription	23
3.2.1.4.3 Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR).....	25

3.3 DATENANALYSE	26
3.3.1 Relative Quantifizierung	26
3.3.2 Statistik und verwendete Software	27
4 ERGEBNISSE	30
4.1 AUSWERTUNG DER MERKMALE DER STUDIENPOPULATION	30
4.1.1 Baseline Charakteristika	30
4.1.2 Vorerkrankungen und verschriebene Medikationen	32
4.1.3 Laborwerte und Parameter der QUS	33
4.2 EXPRESSIONSANALYSE DER MIRNAS	41
4.2.1 Qualitätskontrolle der statistischen Auswertung	41
4.2.2 Exogene Kontrollen	41
4.2.3 Darstellung der differentiell exprimierten miRNAs	43
4.3 ROC-ANALYSE DER AUSWERTBAREN MIRNAS	49
5 DISKUSSION	52
5.1 STUDIENHYPOTHESE 1: EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN BEIDEN STUDIENPOPULATIONEN	52
5.1.1 Expressionsanalyse	52
5.1.2 Aktueller Wissensstand und Literaturvergleich	54
5.2 STUDIENHYPOTHESE 2: DIAGNOSTISCHE GÜTE DER UNTERSUCHTEN MIRNAS	62
5.2.1 Allgemeine Überlegungen zu der diagnostischen Güte	63
5.2.2 Sensitivität, Spezifität, AUC und pAUC	67
5.3 LIMITATIONEN UND STÄRKEN	71
5.3.1 Limitationen	71
5.3.2 Stärken	72
5.3.2.1 Baseline Charakteristika	73
5.3.2.2 Vorerkrankungen und verschriebene Medikationen	74
5.3.2.3 Laborwerte und Parameter der QUS	75
6 KLINISCHE IMPLIKATION	77
6.1 BESTEHENDE MÖGLICHKEITEN FÜR DIE ERMITTLUNG VON FRAKTURRISIKEN	77
6.2 MIRNAS ALS FRAKTURPRÄDIKTOREN	79
7 KONKLUSION UND AUSBLICK	82
8 LITERATURVERZEICHNIS	84

Glossar und Abkürzungen

AGE	Advanced Glycation Endproducts
AGO	Argonautenproteine
AKT	Serine/Threonine Protein Kinase B
ALP	Alkalische Phosphatase
AUC	Area Under the (ROC-) Curve
BMD	Bone Mineral Density
BMSC	Bone Marrow-Derived Stem/Stromal Cells
BTM	Biochemical Bone Turnover Markers
BUA	Broadband Ultrasound Attenuation
CKIP-1	Casein Kinase 2-Interacting Protein-1
co-SMAD	Common-mediator-SMAD
Ct	Threshold Cycle
CTXA	Computed Tomography X-Ray Absorptiometry
dB	Schalldruckpegel
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA	Dual energy X-ray Absorptiometry
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
Exp5	Exportin-5
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
FPR	False Positive Rate/ Falsch-Positiv-Rate (1-Spezifität)
FRAX	Fracture Risk Assessment Tool
FWER	Family-Wise Error Rate
gDNA	Genomische DNA
HDL	High Density Lipoprotein
HMGA2	AT-Hook 2
hMSCs	Human Mesenchymal Stem Cells
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Version
ICF	International Classification of Functioning, Disability and Health

IJO	Idiopathische Juvenile Osteoporose
ISCD	International Society for Clinical Densitometry
KHK	Koronare Herzkrankheit
LR	Likelihood Ratio
MHz	Megahertz
miRNA	MikroRNA
mRNA	Messenger-RNA
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
nm	Nanometer
NPV	Negativer Prädiktiver Wert
NTC	No Template Control
ÖGKM	Österreichische Gesellschaft für Knochen- und Mineralstoffwechsel
OPG	Osteoprotegerin
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PINP	Prokollagen Typ I N-Propeptid
PIWI	P-Element Induced Wimpy Testis
PLXNB1	Plexin B1
PPV	Positiver Prädiktiver Wert
PRE	Prävalenz
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten
PTH	Parathormon
QCT	Quantitative Computertomographie
QUS	Quantitative ultrasound
Ran-GTP	RAs-related Nuclear protein-Guanosintriphosphat
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RISC	RNA-Induced Silencing
RNAP II	RNA-Polymerase-II
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomale RNA
R-SMAD	Rezeptor-regulierte SMAD

RT-	RT (Reverse Transkriptase) Minus; fehlen der Reversen Transkriptase
RT-qPCR	Quantitative Real-Time PCR
Runx2	Runt-related transcription factor-2
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
Sema4D	Semaphorin 4D
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
SI	Stiffness Index; $SI = (0.67 \times BUA + 0.28 \times SOS) - 420$
SMAD	Kompositum: Das Gen der Taufliede <i>Drosophila melanogaster</i> , MAD (engl. mothers against decapentaplegic) und das Gen für Protein Sma (engl. small body size)
Smurf1	Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1
SOS	Speed Of Sound
T2DM	Diabetes Mellitus Typ 2
TBS	Trabecular Bone Score
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TNR	True Negative Rate/ Richtig-Negativ-Rate (Spezifität)
TPR	True Positive Rate/ Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität)
UTR	Untranslated Region

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Studienpopulation	15
Abbildung 2 Allgemeiner Arbeitsablauf für das miScript PCR System	22
Abbildung 3 Keine Expressionsunterschiede bei den exogenen Kontrollen.....	42
Abbildung 4 Expressionsunterschiede der miRNAs mit den höchsten Signifikanzniveaus	45
Abbildung 5 Expressionsunterschiede der miRNAs: mittlere, geringste und kein Signifikanzniveau	46
Abbildung 6 ROC-Kurven mit hohen AUC-Werten der herunterregulierten miRNAs mit den höchsten Signifikanzniveaus	50
Abbildung 7 Links ROC-Kurven mit hohen AUC-Werten und rechts hohe und niedrige AUC-Wert bei herunterregulierten miRNAs mit mittlerem, niedrigem und keinem Signifikanzniveau	50
Abbildung 8 ROC-Kurven der miRNAs mit höchstem Signifikanzniveau bezüglich Expressionsunterschieden;	69
Abbildung 9 ROC-Kurven der miRNAs mit mittlerem/ niedrigem/ keinem Signifikanzniveau bezüglich	69
Abbildung 10 Clinical utility of c-miRNAs as biomarkers for bone fragility and its benefits compared with the classical fragility fracture risk assessment tools.	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der Studienpopulation in Publikation 1	17
Tabelle 2 Einteilung der Studienpopulation in Publikation 2	18
Tabelle 3 Untersuchte miRNA mit Zielsequenz und verwendete Spike-Ins.....	19
Tabelle 4 Kontrolldesign in der Expressionsanalyse	21
Tabelle 5 Mastermix (für ein Template) für die cDNA Synthese mit dem miRCURY LNA RT Kit (Qiagen).....	24
Tabelle 6 Mastermix (für ein Template) für die RT-qPCR (miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen))	25
Tabelle 7 Konfiguration des qPCR-Zyklus in der Nutzung des miRCURY LNA miRNA PCR- Assays.....	26
Tabelle 8 Bis auf die Altersverteilung und die früheren Frakturen überwiegende Homogenität in den Baseline Charakteristika und früheren Frakturen	30
Tabelle 9 Keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Vorerkrankungen	32
Tabelle 10 Keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der Medikationen	33
Tabelle 11 OPG und am Kalkaneus gemessener T-Score als die beiden einzigen, signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen	35
Tabelle 12 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Baseline ..	36
Tabelle 13 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Laborparameter	37
Tabelle 14 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Baseline Charakteristika und Frühere Frakturen.....	38
Tabelle 15 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Vorerkrankungen.....	39
Tabelle 16 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Verschriebene Medikation	40
Tabelle 17 Keine Expressionsunterschiede bei den verwendeten Spike-Ins; geringe SD; kleine Log ₂ Fold change-Werte.	42
Tabelle 18 Expressionsunterschiede bei fast allen untersuchten miRNAs, abgesichert mit der Benjamini-	44
Tabelle 19 Hohe Signifikanzen in der statistischen Untersuchung der Expressionsunterschiede; miRNAs.....	47
Tabelle 20 Mittlere Signifikanzen, niedrige Signifikanz, keine Signifikanz in der statistischen Untersuchung der Expressionsunterschiede; miRNAs absteigend nach Signifikanzniveaus sortiert.....	48
Tabelle 21 Hohe AUC-Werte in ROC-Analyse; lediglich miR-141-3p besitzt einen zu geringen AUC-Wert (<i>Signifikanzniveau</i> > 0,05).....	51
Tabelle 22 Auswertbare miRNAs und ihre bekannten Funktionen.....	54
Tabelle 23 Statistische Kennwerte diagnostischer Tests und deren Berechnungen.....	63
Tabelle 24 Kennwerte der ROC-Kurve.....	65
Tabelle 25 MiRNAs mit pAUC _{FPR} 0,4-1,0 bei künstlich eingeführter Grenze von 60% Spezifität (= FPR 0,4); nach pAUC-Werten absteigend sortiert.....	67
Tabelle 26 miRNAs mit absteigender pAUC _{TPR 0,0-0,6} bei künstlich eingeführter Grenze von 60% Sensitivität (= TPR 0,6).....	68
Tabelle 27 mit G.Power (Version: 3.1.9.7) berechnete Testpower	71

Zusammenfassung

Hintergrund MikroRNAs (miRNAs) als diagnostische und prognostische Biomarker sind Gegenstand aktueller Forschung. Die Quantifizierung des Frakturrisikos bei gefährdeten PatientInnen mithilfe von miRNAs soll gezielte und frühzeitige Maßnahmen zur Frakturprävention ermöglichen, um die Lebensqualität zu steigern, den gesamtfinanziellen Aufwand der medizinischen Versorgung nach Frakturen zu reduzieren und eine Ergänzung oder kosteneffiziente Alternative zu algorithmusbasierten Risikoberechnungen schaffen. Eine mögliche klinische Nutzung der miRNA-basierten, kommerziellen Panel-Diagnostik für die Frakturprädiktion wird zurzeit untersucht. Um weitere miRNAs für eine solche Panel-Diagnostik nutzen zu können, zielt diese Arbeit auf die Identifizierung von miRNAs ab, die mit Frakturrisiken assoziiert sind.

Methodik Die Gesamtstichprobe setzte sich aus 46 postmenopausalen Frauen ($M_{Alter}=83,04$ Jahre, $SD_{Alter}=5,39$ Jahre, $Range_{Alter}$ 72 – 95 Jahre) mit der Diagnose Diabetes mellitus Typ 2 zusammen. Alle Probandinnen wurden aus der Studienpopulation einer prospektiven Studie (SOS-Hip Kohorte) rekrutiert. Die Probandinnen wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe mit Frakturen umfasste 24, die Kontrollgruppe ohne Frakturen bestand aus 22 Probandinnen. Die Expression von 14 vorselektierten miRNAs wurde in den Blutseren der Probandinnen gemessen und zwischen den beiden Gruppen verglichen. Die Expressionsanalyse der untersuchten miRNAs erfolgte mit der RT-qPCR. Die ausgegebenen Ct-Werte wurden in der relativen Quantifizierung im Sinne der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden auf statistische Signifikanz mit dem t-Test oder Mann-Whitney-U-Test überprüft und das Signifikanzniveau mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur adjustiert. Die diagnostische Güte der miRNAs wurde in der ROC-Analyse anhand der AUC, pAUC, Sensitivität und Spezifität bewertet.

Ergebnis Von den 14 untersuchten miRNAs zeigten 13 messbare (miR-3168 war nicht detektierbar) und 12 statistisch signifikante (Signifikanzniveau $\alpha \leq 0.05$) Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen. Statistisch hochsignifikant waren die Expressionsunterschiede ($p < 0.001$) bei den sieben miRNAs miR-140-3p, miR-93-5p, miR-19b-3p, miR-30d-5p, miR-19a-3p, miR-30e-5p und miR-25-3p. Eine mittlere Signifikanz ($p < 0.01$) konnte bei den vier miRNAs miR-29b-3p, let-7i-3p, miR-363-3p und miR-142-5p gefunden werden. Eine geringe Signifikanz ($p < 0.05$) konnte bei der miRNA miR-148b-3p ermittelt werden. Bei miR-141-3p war kein signifikanter

Expressionsunterschied feststellbar. In der ROC-Analyse zeigten die 12 miRNAs mit den statistisch signifikanten, differentiellen Expressionen ROC-Werte zwischen 0,712 für miR-148b-3p und 0,822 für miR-140-3p ($M_{AUC}=0,775$, $SD_{AUC}=0,034$).

Konklusion Anhand der 12 statistisch signifikanten miRNAs ist die Identifizierung eines erhöhten Frakturrisikos für einen Mindestzeitraum von zwei Jahren möglich. Zusätzlich zeigten die 12 miRNAs in der ROC-Analyse mit ihren akzeptablen bis exzellenten AUC- und pAUC-Werten eine hinreichend gute diagnostische Güte. Für die Absicherung der Ergebnisse und vor einem ersten praktischen Einsatz der untersuchten miRNAs werden allerdings weitere Studien mit größerer Fallzahl und erweiterten Studienmerkmalen benötigt.

Abstract

Background MicroRNAs (miRNAs) as diagnostic and prognostic biomarkers are subject of current research. Quantification of fracture risk in at-risk patients using miRNAs may enable targeted and early fracture prevention interventions to improve patient's quality of life, reduce the overall financial burden of medical care following fractures, and provide a complement or cost-efficient alternative to algorithm-based risk calculations. A potential clinical use of a miRNA-based commercial panel diagnostic for fracture prediction is currently being investigated. To be able to use further miRNAs for such panel diagnostics, this work aims to identify miRNAs associated with fracture risks.

Methods The total sample consisted of 46 postmenopausal women ($M_{Age}=83.04$ years, $SD_{Age}=5.39$ years, $Range_{Age}$ 72 - 95 years) diagnosed with type 2 diabetes mellitus. All subjects were recruited from the study population of a prospective study (SOS-Hip cohort). The participants were divided into two groups. The group with fractures included 24, and the control group without fractures consisted of 22 participants. The expression of 14 preselected miRNAs was measured in the blood sera of the participants and compared between the two groups. Expression analysis of the studied miRNAs was performed by RT-qPCR. The Ct value outputs were evaluated in relative quantification according to the $\Delta\Delta Ct$ method. Expression differences between the two groups were tested for statistical significance using the t-test or Mann-Whitney U test, and the significance level was adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure. The diagnostic accuracy of miRNAs was evaluated by ROC analysis using AUC, pAUC, sensitivity and specificity.

Results Out of the 14 miRNAs examined, 13 showed measurable (miR-3168 was not detectable) and 12 statistically significant (*significance level* $\alpha \leq 0.05$) differences in expression between the two groups. The expression differences were statistically highly significant ($p < 0.001$) for the seven miRNAs miR-140-3p, miR-93-5p, miR-19b-3p, miR-30d-5p, miR-19a-3p, miR-30e-5p, and miR-25-3p. Medium significance ($p < 0.01$) was found for the four miRNAs miR-29b-3p, let-7i-3p, miR-363-3p, and miR-142-5p. Low significance ($p < 0.05$) could be determined for miRNA miR-148b-3p. No significant expression difference was detected for miR-141-3p. In ROC analysis, the 12 miRNAs with the statistically significant differential expressions showed ROC values ranging from 0.712 for miR-148b-3p to 0.822 for miR-140-3p ($M_{AUC}=0.775$, $SD_{AUC}=0.034$).

Conclusion Based on the 12 statistically significant miRNAs, the identification of an increased fracture risk for a minimum period of two years is possible. In addition, the 12

miRNAs showed sufficiently good diagnostic accuracy in the ROC analysis with their acceptable to excellent AUC and pAUC values. However, to validate these findings and prior to an initial clinical implementation of the investigated miRNAs, further studies with a larger sample size and extended study characteristics are needed.

1 Einleitung

1.1 Die gesellschaftliche Relevanz von Frakturen und neue Möglichkeiten für die Abschätzung des Frakturrisikos

Frakturen, insbesondere Femurfrakturen stellen aufgrund der hohen Mortalität ein großes und vielschichtiges Problem für das österreichische Gesundheitswesen dar. So lag die 1-Jahres-Mortalität nach Femurfrakturen in Österreich um das Jahr 2010 für Personen ab 50 Jahren bei etwa 20% (1).

Neben der hohen Mortalität ist die Versorgung von PatientInnen mit Frakturen für das österreichische Gesundheitssystem mit einem hohen finanziellen Aufwand verbunden. So bezifferte eine, von der International Osteoporosis Foundation (IOF) in Auftrag gegebene Studie, den jährlichen, gesamtfinanziellen Aufwand für osteoporotische Frakturen in Österreich für das Jahr 2019 auf 1,3 Milliarden Euro. Dies entsprach 3,4% der gesamten Ausgaben des österreichischen Gesundheitswesens für das Jahr 2019 (2).

Als Folge der steigenden Frakturprävalenz in Österreich (3) kann zukünftig mit steigenden, frakturassoziierten Kosten für das Gesundheitswesen und einer wachsenden Mortalitätsrate gerechnet werden, da die Bevölkerung Österreichs kurz- und mittelfristig altert (4). Diese Entwicklung kann anhand von Femurfrakturen antizipiert werden. Die als S72 ICD-10 kodierten Femurfrakturen treten verglichen mit allen anderen Frakturarten am häufigsten auf, unabhängig von Risikofaktoren wie der Osteoporose sowie anderen Faktoren und ereignen sich vorwiegend im höheren Alter (5)(6).

Vor diesem Hintergrund sind Screening-Verfahren hinsichtlich potentieller Frakturrisiken für eine frühzeitige Prophylaxe essentiell. Aktuell gilt die Osteodensitometrie als Goldstandard zur Messung einer verringerten Knochendichte und ermöglicht die Bestimmung des Frakturrisikos. Der Einsatz der Knochendichtemessung als Reihenuntersuchung ist jedoch wegen des hohen Aufwandes und der Kosten nicht möglich. Als fragenbasierte Evaluationsmethoden der Frakturrisiken stehen derzeit mit dem Fracture Risk Assessment Tool (FRAX), QFracture und dem DVO-Risikomodell kostengünstige Modelle zur Verfügung. Diese stellen etablierte Methoden zur Bewertung von Frakturrisiken dar, weisen allerdings entscheidende Limitationen in ihrem Gebrauch auf, wie der Risikounterschätzung für Frakturen bei PatientInnen mit Diabetes mellitus Typ 2 (siehe Unterkapitel 6.1) (7).

Dementsprechend sind zumindest Ergänzungen zu den bestehenden Screening-Verfahren notwendig, die niederschwellig anwendbar in Bezug auf den Kostenaufwand sowie die Praktikabilität sind und darüber hinaus eine möglichst hohe, diagnostischen Güte aufweisen. MiRNAs als Biomarker können bestehende Möglichkeiten zur Erfassung von Frakturrisiken, wie der Risikoberechnung durch FRAX, erweitern (7) oder eine kosteneffiziente Alternative darstellen (8). So sind miRNA panels für die Frakturprädiktion Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ein entscheidender Nachteil von miRNAs ist deren geringe diagnostische Spezifität (9). Deshalb ist es notwendig und sinnvoll, miRNAs geschlechts- bzw. altersspezifisch und im Kontext mit bestimmten Merkmalen wie Vorerkrankungen und anderen Risikofaktoren zu untersuchen, die sich auf den Knochenstoffwechsel und das Sturzrisiko auswirken können. So soll mit dieser Diplomarbeit ein Beitrag zur weiteren Erforschung von miRNAs in Zusammenhang mit Frakturrisiken geleistet werden.

1.2 MiRNA

MikroRNAs (miRNAs) sind kurze RNA Stränge mit einer Länge von circa 22 Nukleotiden (10). MiRNAs kodieren keine Proteine, spielen jedoch eine Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung und bei der Apoptose von Zellen, indem sie die Proteinbiosynthese in der posttranskriptionellen Phase hemmen können. Die miRNAs binden hierbei mit einigen Nukleotiden an den 3'untranslatierten Bereich (UTR) der Messenger-RNAs (mRNAs) und können die weitere Translation unterdrücken bzw. die mRNAs degradieren (11)(12). Die Bindung der miRNAs an die mRNAs muss nicht über die gesamte Länge mit einer korrekten Basenpaarung erfolgen. Auf diesem Weg kann eine miRNA mehrere verschiedene mRNAs, oder mehrere miRNAs eine einzelne mRNA binden und so die Proteinbiosynthese kontrollieren (13). Die Inhibierung der Proteinbiosynthese kann auf mehreren Ebenen der Translation realisiert werden (14). MiRNAs können außerdem eine Vielzahl an Transkripten selbst regulieren (15). Es ist mittlerweile bekannt, dass 5.300 menschliche Gene, also etwa 30% des menschlichen Genoms, von miRNAs reguliert werden (16).

1.2.1 Biogenese der miRNAs

Die reifen miRNAs entstehen schrittweise aus ihren Vorläufern, den pri-miRNAs und pre-miRNAs. Im Zellkern werden für die Biogenese der miRNAs nicht kodierende Abschnitte der DNA von der RNA-Polymerase-II (RNAP II) transkribiert (17). Die pri-miRNAs sind

zu Beginn der Biogenese noch einige Kilobasen lang. Pri-miRNAs werden überwiegend im Zellkern im Zuge der Umwandlung zu pre-miRNAs auf etwa 70 Nukleotide gekürzt. Drosha, eine Klasse 3 Ribonuklease III, katalysiert die Kürzung der pri-miRNAs zu pre-miRNAs. Die so entstandenen einsträngigen pre-miRNAs weisen durch intramolekulare Basenpaarungen die Form einer Haarnadel auf, die auch als stem-loop Struktur beschrieben wird (17). Den Export der pre-miRNAs aus dem Zellkern ermöglicht das Karyopherin Exportin-5 (Exp5) in Gegenwart des Kofaktors Ran-GTP (18).

Im Zytoplasma wird die Schleife der Haarnadelstruktur abgespalten und somit die pre-miRNAs auf einen circa 22 bis 24 Nukleotiden langen, nun doppelsträngigen Stamm gekürzt. Dies erfolgt mit Hilfe des Enzyms Dicer, welches wie Drosha der RNase III Familie angehört (19). Im Zytoplasma kommen die kurzen pre-miRNAs in Kontakt mit Argonautenproteinen (AGO). Mit dem enzymatisch aktiven Bereich PIWI trennen diese Proteine einen der beiden Stränge der doppelsträngigen pre-miRNAs, den „passenger“ Strang, ab (14). Der „passenger“ Strang wird nicht degradiert und bleibt funktionstüchtig (20). Der „guide“ Strang verbleibt beim Protein AGO und bildet zusammen mit ihm den RNA-induced silencing complex (RISC-complex). Die so entstandenen, reifen, einsträngigen miRNAs können im RISC-complex mRNAs im 3'-untranslatierten Bereich binden.

1.2.2 Nomenklatur und Einteilung der miRNAs

Die Bezeichnung von miRNAs setzt sich aus mehreren Teilen zusammen (z.B. hsa-miR-140-3p). Für menschliche miRNAs wird das Präfix „hsa“ (Homo sapiens) vorangestellt, um auf die menschliche Gattung zu verweisen. Der nächste Teil bildet das „miR“ für reife miRNAs und „mir“ für dessen Vorstufen. Der dritte Teil der Nomenklatur besteht aus einer Nummer. Identische miRNAs erhalten die gleiche Nummer, unabhängig davon, in welchem biologischen Organismus sie vorkommen. Wenn miRNAs nahezu identisch sind, weist ein Buchstabe hinter der Nummer, mit „a“ beginnend, auf einen minimalen Unterschied zwischen miRNAs hin (z.B. miRNA-Familie hsa-miR-30: hsa-miR-30a, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c, etc.). Entspringen zwei reife miRNAs demselben Vorläufer, aber von entgegengesetzten Armen der haarnadelförmigen pre-miRNA, endet die Bezeichnung mit dem Suffix -3p (3'-Ende) oder -5p (5'-Ende) (21)(22). Eine historische Ausnahme von der Nomenklatur bildet die miRNA-Familie let-7, die als einer der ersten miRNAs im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gefunden wurde (21). Der Name „let“

bedeutet „letal“ (23), da bei Mutationen im Gen für let-7 der Fadenwurm nicht lebensfähig ist (24).

Die Datenbank miRBase zählt mittlerweile 38.589 Einträge für miRNAs von insgesamt 271 Organismen (Stand: Juni 2022) (25). Für eine gute Übersicht und eindeutige Nomenklatur werden die miRNAs in Familien eingeteilt. Gemeinsamkeiten finden sich bei Mitgliedern einer Familie am 5'-Ende. Das 5'-Ende ist jene Region, mit der die miRNAs an eine Zielstruktur binden können. Das 3'-Ende differiert zwischen den Mitgliedern einer miRNA-Familie. Auch das 3'-Ende kann an die Zielstruktur binden, ist jedoch alleine nicht ausreichend für eine stabile Bindung (26).

1.2.3 Zirkulierende, extrazelluläre miRNAs

Zirkulierende miRNAs können verschiedener Herkunft entspringen. Sie werden beispielweise aus Exosomen, Mikrovesikeln, anderen extrazellulären Vesikeln wie den apoptotischen Körperchen oder aus dem Lipoprotein HDL in das Blutplasma sezerniert (27). MiRNAs können extrazellulär in weiteren Körperflüssigkeiten wie Liquor, Harn oder Speichel nachgewiesen werden. Die Konzentration von miRNAs in den verschiedenen Körperflüssigkeiten ist nicht konstant und kann erheblich variieren (28).

Im Blutplasma liegen die miRNAs in unterschiedlicher Weise gebunden vor. Der größte Teil ist an Argonautenproteine gebunden und entspricht einem Anteil von 90% der gesamten, zirkulierenden miRNAs. Der übrige Teil der zirkulierenden miRNAs liegt in 50 bis 90 nm großen Exosomen (29) oder in anderen Strukturen gebunden vor (30)(31). Die Bindung erklärt die Stabilität der extrazellulären miRNAs gegenüber äußeren Einflüssen wie RNasen, oder auch physikalischen und chemischen Einwirkungen (27). Die Robustheit zirkulierender miRNAs gegenüber äußeren Einflüssen hängt von der Art der Bindung ab. So scheinen Vesikel assoziierte miRNAs stabiler zu sein als miRNAs ohne Assoziation mit Vesikeln (32).

Dennoch eignen sich zirkulierende miRNAs aus Blutproben grundsätzlich als überwiegend stabile Biomarker. Blutproben können über längere Zeit, ohne Änderung der Expression der miRNAs, bei einer Temperatur von -80°C gelagert werden. Die Reproduzierbarkeit von Expressionsanalysen kann jedoch bei uneinheitlicher Probenvorbereitung und -behandlung wie durch häufige Gefrier- und Auftauzyklen eingeschränkt sein (33).

1.2.4 Beispiele für miRNAs als Biomarker des Knochenstoffwechsels

Die Konzentration von miRNAs im Blutplasma ist in unterschiedlichen physiologischen sowie pathologischen Zuständen variabel (34). Abhängig von ihrer Konzentration nehmen im Blutplasma zirkulierende miRNAs Einfluss auf den Knochenmetabolismus sowie den Knochenumbau (bone remodeling). Der Knochenumbau, bei dem Knochenstrukturen durch Osteoblasten aufgebaut und durch Osteoklasten abgebaut werden, gewährleistet eine konsequente Anpassung an die physiologische Inanspruchnahme des Körpers und ist pathologischen Zuständen unterworfen. Für die Stabilität und Funktionalität des Knochens spielt der stetige Knochenumbau eine essentielle Rolle (35). Die Einflussnahme der zirkulierenden miRNAs auf den Knochenstoffwechsel wurde mittlerweile in einigen Forschungsarbeiten untersucht (siehe Unterkapitel 5.1.2).

So ist zum Beispiel über die exosomale miR-140-3p bekannt, dass sie Plexin B1 (PLXNB1) inhibieren und so die Osteogenese und die Knochenregeneration verbessern kann (36). Der Rezeptor Plexin B1, der sich auf Osteoblasten befindet, hemmt die Differenzierung von Osteoblasten und beeinträchtigt damit die Knochenbildung. Plexin B1 wird durch Semaphorin 4D (Sema4D) aktiviert, welches von Osteoklasten sezerniert wird (37). Mit dem Wissen über den Einfluss von miR-140-3p und Semaphorin 4D auf Plexin B1 konnte die gehemmte Knochenbildung und damit die reduzierte Heilung von Knochendefekten bei Herunterregulation der exosomalen miR-140-3p in Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden (36).

Ein weiteres Beispiel zeigt den Zusammenhang von miR-19a-3p mit Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass hochregulierte miR-19a-3p eine Suppression von Knochenmetastasen induzieren kann, indem es den TGF- β -Signalweg nutzt. Es wurde eine Hemmung von SMAD2 und SMAD4 durch hochreguliertes miR-19a-3p festgestellt, wodurch ein weiteres Knochenwachstum unterbunden wurde (38). Der TGF- β -Signalweg zeichnet sich wie folgt aus: TGF- β bindet an Serin/Threoninkinasen-Rezeptoren auf Knochenstammzellen, die dadurch Rezeptor-regulierte SMADs (R-SMADs) modulieren. R-SMADs sind intrazelluläre Signalproteine, die sich nach Modulation von der Zellmembran lösen und in der Zelle Komplexe mit common-mediator-SMAD4 (co-SMAD4) eingehen und so im Zellkern die Transkription der Zielgene regulieren. Durch diesen Signalweg können mesenchymale Stammzellen rekrutiert und die Osteogenese stimuliert werden (39).

1.3 Osteoporose und Diabetoporose

Der Knochenstoffwechsel wird bei den Erkrankungen Osteoporose und Diabetoporose unterschiedlich affektiert. Da bei fünf der 46 Probandinnen der Studienpopulation Osteoporose diagnostiziert worden war und alle Probandinnen an Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) litten (siehe Unterkapitel 4.1.2), sollen an dieser Stelle einleitend die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Osteoporose und Diabetoporose beleuchtet werden.

Die systemische Skeletterkrankung Osteoporose ist definiert als Erkrankung mit Verringerung der Knochenmasse und einer reduzierten Mikroarchitektur. Die WHO definiert die Erkrankung mit dem mittels Osteodensitometrie (DXA) ermittelten T-Score, nachdem andere Erkrankungen, die mit einer reduzierten Knochenmineraldichte verbunden sind, ausgeschlossen worden sind. Der T-Score muss für die Diagnosestellung $\geq 2,5$ Standardabweichungen (SD) unter der Norm liegen (40)(41).

Ätiologisch gesehen sind die meisten Fälle (95%) auf primäre Ursachen zurückzuführen. Primäre Ursachen sind die Osteoporose bei postmenopausalen Frauen (Typ I-Osteoporose), die Senile Osteoporose (Typ II-Osteoporose), oder seltene Formen der Osteoporose, wie der Idiopathische juvenile Osteoporose (IJO). Nur ein geringer Anteil der Fälle (5%) ist auf sekundäre Ursachen wie der medikamentösen Einnahme von Glukokortikoiden in der Langzeittherapie, endokrinologischen Erkrankungen, Essstörungen, Immobilität oder Inaktivität zurückzuführen.

Pathophysiologisch wird in Betrachtung der metabolischen Charakteristika zwischen einer „Fast-loser-Person“ und einer „Slow-loser-Person“ unterschieden. Erstere besitzt bei gesteigertem Knochenumbau („high turnover“) einen Verlust der trabekulären Knochendichte von mehr als 3% jährlich. Dies ist typisch für die frühe Phase der Postmenopause (die ersten 10 Jahre nach Menopause). Die „Slow-loser-Person“ verfügt dagegen bei verringertem Knochenumbau („low turnover“) einen jährlichen Verlust von weniger als 3%. Dies ist typisch für die spätere Phase der Postmenopause.

Hinsichtlich der Lokalisation der Frakturen bei der Osteoporose wird zwischen einer generalisierten Form, die vor allem bei Typ I- und Typ II-Osteoporose vorkommt, und einer lokalisierten Form, wie bei rheumatischen Erkrankungen, unterschieden. Frakturen treten insbesondere als Femurfrakturen oder vertebrale Frakturen auf.

Klinisch wird der Knochenmasseverlust in vier Stadien eingeteilt. Als präklinische Osteoporose weist die Osteopenie eine Abweichung von weniger als 2,5 SD unter der Norm der Knochendichte auf. Ab einer Abweichung von $\geq 2,5$ SD wird die Diagnose der Osteoporose als zweites Stadium des Knochenmasseverlustes gestellt, ohne dass Frakturen aufgetreten sind. Die manifeste Osteoporose als drittes Stadium besteht, wenn zusätzlich zum erniedrigten T-Score von $\geq 2,5$ unter der Norm, Wirbelkörperfrakturen aufgetreten sind. Bei Auftreten von multiplen Frakturen wird das vierte Stadium als fortgeschrittene Osteoporose bezeichnet (42).

Das klinische Bild der Osteoporose äußert sich vornehmlich als niedrigtraumatische Fragilitätsfraktur, welche für die Entstehung von Femurfrakturen einen der wichtigsten Risikofaktoren darstellt (43)(44). Ein weiteres wichtiges, klinisches Bild sind osteoporotische Sinterungsfrakturen im Bereich der Wirbelkörper, die mit dem meist typischen Tannenbaumphänomen charakterisiert sind (Aufwerfungen der Haut als tannenbaumartige Hautfalten am Rücken im Zuge der Körpergrößenminderung). Typische Symptome sind plötzlich eintretende oder chronische Frakturschmerzen (42).

Das Ziel der Osteoporosedagnostik ist die Erfassung eines möglichen hohen Frakturrisikos, um abhängig davon therapeutische Maßnahmen rasch einleiten zu können. Die Osteodensitometrie mit dem ermittelten T-Score ist der Goldstandard und die eigentliche, nach WHO-Richtlinie vorgegebene Osteoporosedagnostik. Für die Berechnung des individuellen Frakturrisikos werden fragenbasierte Vorhersagemodelle empfohlen (45), allen voran FRAX (Fracture Risk Assessment Tool) (46). Weitere diagnostische Möglichkeiten umfassen die erweiterte Anamnese mit der Abfrage von vergangenen oder rezenten Stürzen und die Erfassung von Risikofaktoren für die Entstehung von Osteoporose. Labordiagnostisch werden insbesondere Marker für die Knochenresorption, Osteogenese und eine Hormondiagnostik untersucht. Weitere Laborparameter werden für die Differentialdiagnose abgefragt. Bildgebend wird das konventionelle Röntgenbild in zwei Ebenen bei Verdacht auf bereits aufgetretene Frakturen eingesetzt, jedoch nicht standardmäßig bei Verdacht auf Osteoporose durchgeführt (42).

Die Therapieindikation für eine medikamentöse Osteoporose-Therapie muss individuell und orientierend am T-Score getroffen und Behandlungsrisiken gegen den Therapienutzen abgewogen werden (45). Für die Osteoporose- und Frakturprophylaxe stehen einerseits kausale Möglichkeiten wie eine Hormonsubstitution und andererseits eine symptomatische Behandlung wie eine ausreichende, alimentäre Zufuhr bzw. progressives Widerstandstraining zur Verfügung (42)(47). Die medikamentöse Therapie der Osteoporose

zielt mit ihren diversen Möglichkeiten auf einen antiresorptiven (z.B. selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM)), osteoanabolen (Teriparatid, Fragment eines rekombinanten humanen Parathormons) oder einen kombinierten (Romosozumab) Wirkmechanismus ab (48).

Eine Erhöhung des Frakturrisikos im Rahmen einer Diabeteserkrankung konnte verifiziert werden. Jedoch erhöht sich das Frakturrisiko bei Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) und T2DM in unterschiedlichem Ausmaß (41). Das gesteigerte Frakturrisiko bei Diabeteserkrankungen basiert auf mehreren Faktoren, beispielsweise auf einer veränderten Knochenmikrostruktur, auf metabolischen Ursachen wie hypoglykämischen Episoden, oder peripheren Neuropathien mit Visusverschlechterung (47). So steigt das relative Risiko für proximale Femurfrakturen bei Personen mit T1DM unabhängig vom Geschlecht um das drei- bis sechsfache an. Für vertebrale Frakturen besteht eine Risikoerhöhung um das zwei- bis dreifache im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Bei Personen mit T2DM zeigt sich eine geringere Erhöhung des Frakturrisikos für beide Geschlechter – das Frakturrisiko für proximale Femurfrakturen erhöht sich um das Eineinhalbfache (41).

Wie bei der Osteoporose kann auch bei T2DM eine veränderte Knochenmikrostruktur beobachtet werden. Allerdings scheint es einen Unterschied in der Genese der Veränderung der knöchernen Mikrostruktur bei T2DM zu geben (49). Bei T2DM ist mittlerweile eine Erhöhung der Knochendichte bekannt (50) und die für T2DM typische Erhöhung des Körpergewichts scheint protektiv gegenüber der Entstehung von Frakturen zu wirken (47)(49)(50). Studien deuten darauf hin, dass sich die Knochenveränderung bei T2DM aus einer Beeinträchtigung der Vaskularisation des Knochenskeletts ergibt – vor dem Hintergrund dieser Erkenntnis wurde der Begriff „Diabetoporose“ etabliert (49). Einen direkten Effekt auf die Knochenstruktur hat die versteifende Wirkung durch den vermehrten Einbau von advanced glycation endproducts (AGE) in die Kollagenmatrix. Bei T2DM scheint die kortikale Knochenstruktur poröser zu sein, was zu einer herabgesetzten mechanischen Stabilität des Knochens führt (47).

Die Diagnostik der Knochendichteminderung muss bei der Diabetoporose im Vergleich zu der Osteoporose angepasst sein. Wie bereits erwähnt, ist die BMD isoliert nicht für eine erhöhte Fragilität des Knochens bei T2DM ursächlich. Personen mit T2DM und Frakturen haben mehrheitlich einen T-Score im osteopenen Bereich. So ist das Frakturrisiko für Personen mit T2DM bei einem T-Score von $\leq -2,0$ gleich hoch wie bei Personen ohne T2DM mit einem T-Score $\leq -2,5$. Andere Studien deuten darauf hin, dass unter T2DM die BMD

schneller als bei Gesunden abnimmt. Auch FRAX unterschätzt das Frakturrisiko bei Personen mit T2DM.

Demgegenüber könnte der Trabecular Bone Score (TBS) als unabhängiger Frakturprädiktor für das Frakturrisiko bei Diabetes dienen. TBS generiert aus den Daten der zweidimensionalen Knochendichtemessung mit DXA Informationen über die Anzahl und Vernetzung der Trabekel im Knochen.

Weitere diagnostische Möglichkeiten bieten u.a. biochemische Marker. Hier sei auf die derzeitige Erforschung von miRNAs verwiesen, die als Biomarker für die Detektion der Fragilität des Knochens vielversprechend sind (47).

Die Therapie der Diabetoporose unterscheidet grundlegend nicht von der Osteoporosetherapie. Allerdings muss bei Diabetoporose zusätzlich der Diabetes mellitus als Grunderkrankung mitbehandelt und mit einem erweiterten Nebenwirkungsprofil gerechnet werden (47).

1.4 Testverfahren und Messparameter

Für eine bessere Verständlichkeit soll an der Stelle einige, für diese Arbeit relevante Messparameter und Testverfahren kurz vorgestellt und erläutert werden.

1.4.1 RT-qPCR

Das grundlegende Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (RT-qPCR) liegt in der Anwendung einer herkömmlichen PCR mit Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes unter enzymatischer Vermittlung. Ergänzend erfolgt die Quantifizierung der eingesetzten Probe anhand der Messung des Fluoreszenzsignals nach jedem Zyklus, also in Echtzeit. Den DNA-Polymerasen muss dafür der Startpunkt der zu amplifizierenden DNA mittels Primer angezeigt werden.

Die Abfolge der PCR zur Generierung der DNA-Abschnittskopien ist dreiteilig. Zunächst muss die doppelsträngige DNA im Denaturierungsschritt aufgetrennt werden. Gefolgt wird dieser Schritt von dem Annealing mit der Hybridisierung der eingesetzten Primer an die nun einsträngige Template-DNA. Abschließend erfolgt die Elongation, bei der die Einzelstränge mithilfe der DNA-Polymerase und Nukleotiden zu Doppelsträngen komplementiert werden. Als Resultat bildet sich jeweils ein zum Original komplementäres Amplifikat. Durch Wiederholung dieser Schrittabfolge in Zyklen ist im optimalen Fall eine exponentielle Vervielfältigung der DNA-Abschnitte möglich. Genau dieses mathematische Grundprinzip

der exponentiellen Vervielfältigung wird sich in der Diagnostik zunutze gemacht. So kann in der RT-qPCR und mit der in Echtzeit erfolgenden Detektion des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green auf die exponentiell anwachsende DNA-Menge pro Zyklus geschlossen und diese graphisch abgebildet werden. Die Messung der Fluoreszenzemission kann hierbei erst nach Bindung von SYBR Green an die DNA erfolgen (51).

Insgesamt besitzt die RT-qPCR eine hohe Sensitivität und Spezifität und eignet sich somit, um die Expression von miRNAs zu detektieren (52). Nach der Durchführung der RT-qPCR erfolgte in dieser Arbeit die relative Quantifizierung (siehe Unterkapitel 3.2.1.4.4) (73).

1.4.2 Parameter des quantitativen Knochenultraschalls (QUS)

Die Bestimmung der Knochenqualität und die Ermittlung der T-Scores mittels quantitativem Knochenultraschall bedient sich unterschiedlicher Wellenlängen (0,25 bis 1,25 MHz). Als Kopplungsmedium zwischen Ultraschall und dem Knochen wird Wasser mit konstanter Temperatur oder Gel verwendet (53). Die Ultraschallmessung korreliert mit der Knochendichte, der Trabekelausrichtung und dem Verhältnis zwischen dem trabekulären und kortikalen Anteil des Knochens. Diese Eigenschaften sind wichtige Indikatoren für die Steifigkeit des gesamten Knochens, die Bruchlast und das Frakturrisiko (54).

Die Parameter der QUS sind:

- 1) Speed of sound (SOS): Die Messung der temperaturabhängigen SOS (m/sec.) wird aus der zurückgelegten Strecke in Bezug auf die zeitliche Verzögerung des ausgesendeten und empfangenen Ultraschallsignals berechnet (55).
- 2) Breitbandultraschallabschwächung (broadband ultrasound attenuation, BUA): Die temperaturabhängige BUA (dB/MHz) berechnet sich aus der frequenzabhängigen (Hz) Ultraschallabschwächung (dB) (55).
- 3) Stiffness Index (SI, Kombination aus SOS und BUA): Der SI kombiniert die beiden Messwerte SOS und BUA zu einem klinischen Messwert, um den Präzisionsfehler zu verkleinern, da die Messwerte von SOS und BUA temperaturabhängig in entgegengesetzter Richtung variieren. Der Stiffness Index berechnet sich laut dem Hersteller GE Healthcare wie folgt:

$$SI = (0,67 \times BUA + 0,28 \times SOS) - 420$$

Der SI berechnet sich also aus der Summe der BUA- und SOS-Werte, die durch Subtraktion der niedrigsten beobachteten Werte zuvor normalisiert und anschließend

skaliert worden sind. Der SI ist ein Maß für das Risiko einer osteoporotischen Fraktur bei postmenopausalen Frauen (56).

Für die Messung der Parameter SOS, BUA, SI und dem ermittelten T-Score wurde am Kalkaneus das Gerät Achilles Express verwendet. Die Messung der SOS und der ermittelte T-Score für den Radius und die Phalanx wurde mittels des Ultraschallgeräts Sunlight Omnisense realisiert (siehe Unterkapitel 4.1.3).

Erwähnenswert ist, dass die International Society of Clinical Densitometry (ISCD) in seinem Bericht 2008 feststellte, dass nach Studienlage die Parameter der QUS grundsätzlich nicht vergleichbar mit jenen der DXA-Methode sind und gab somit vor, dass die Diagnose einer Osteoporose weiterhin mit dem T-Score nach der WHO-Diagnoseklassifikation erfolgen muss. Die Bewertung des Frakturrisikos durch QUS am Fersenbein stellt nach klinischer Evidenz laut ISCD Bericht eine Ausnahme dar (57).

1.4.3 Die Knochendichtemessung DXA und der T-Score

Das Messprinzip der Knochendichtemessung (Osteodensitometrie) wurde für die Ermittlung der, in dieser Arbeit verwendeten T-Scores nicht angewendet. Dennoch soll das Messprinzip an dieser Stelle erläutert werden, da die Messung der Knochendichte mittels Röntgenstrahlen den Goldstandard darstellt. Das Messprinzip der Knochendichtemessung mit Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA oder DEXA) beruht auf der Detektion der Absorption von harten und weichen Röntgenstrahlen, also Strahlen mit zwei unterschiedlichen Energien. Der Anteil der Strahlung, der durch das Weichteilgewebe absorbiert wird, kann herausgerechnet werden. Aus dem Anteil, der durch das Weichgewebe und den Knochen nicht absorbiert worden ist, wird die Knochendichte errechnet. Die ISCD empfiehlt die Messung am proximalen Femur bzw. an mindestens zwei Wirbelkörpern im Bereich der Lendenwirbelsäule (L1 bis L4). Die Messung der Masse pro Flächeneinheit, also die Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD), wird in der Einheit g/cm^2 angegeben. Die Strahlenbelastung bei der DXA ist erheblich geringer als bei einer konventionellen Röntgenaufnahme (42)(58)(59).

Die quantitative Knochendichtemessung mittels DXA zielt vornehmlich darauf ab, eine Osteoporose nach der Richtlinie der WHO (Goldstandard) zu diagnostizieren. Des Weiteren soll das Ausmaß der Verringerung der Knochendichte ermittelt werden. Dies dient einer

verbesserten, individualisierten Einschätzung des Frakturrisikos und damit verbunden einer etwaigen Therapieempfehlung (41).

Die Messwerte der DXA werden als T-Score ausgedrückt, die einen klinischen Kontext ermöglichen und eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlich verwendeten Geräten schaffen. Der T-Score entspricht der Standardabweichung (SD) der individuell gemessenen Knochenmineraldichte vom mittleren Normwert knochengesunder, junger, gleichgeschlechtlicher Erwachsener. Diese Referenzpopulation kann aus der Referenzdatenbank National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) rekrutiert werden. Der T-Score sollte für die Diagnostik bei Männern und postmenopausalen Frauen ab einem Alter von 50 Jahren Anwendung finden. Bei unter 50-jährigen Personen soll das Ergebnis der Knochendichtemessung als Z-Score ausgegeben werden. Der Z-Score vergleicht den mit DXA ermittelten Messwert mit der gleichgeschlechtlichen Altersgruppe und wird ebenfalls als SD angegeben (41)(59)(60).

2 Studienhypothesen und Zielsetzung

2.1 Studienhypothesen

Zirkulierenden miRNAs als Biomarker für die Diagnose und Prognose diverser Erkrankungen werden gegenwärtig intensiv beforscht, beispielsweise bei Brustkrebs, Ovarial- oder Zervixkarzinomen, kardiovaskulären Erkrankungen, bei Sepsis oder Erkrankungen des Nervensystems wie Alzheimer, Morbus Parkinson oder Epilepsie (9).

Bezogen auf den Knochenstoffwechsel, Osteoporose oder Fragilitätsfrakturen konnten bereits einige miRNAs identifiziert und im Rahmen dessen grundsätzliche Regelmechanismen im Knochenstoffwechsel analysiert werden (61)(62). Außerdem konnten miRNAs gefunden werden, die Fragilitätsfrakturen bei postmenopausalen Frauen mit diabetischer Stoffwechsellage anzeigen (63) oder die osteogene Differenzierung nach einer frischen, Osteoporose-bedingten Fragilitätsfraktur beeinflussen (64).

Mit dem OsteomiR-Test von TAmiRNA GmbH aus Wien wird mittlerweile an einer kommerziellen Einführung eines miRNA panel zur Analyse der Knochenqualität und Berechnung des Frakturrisiko-Scores gearbeitet (65).

Für eine weitere Verbesserung der Frakturprädiktion mittels miRNAs hinsichtlich einer Panel-Diagnostik ist es notwendig, mögliche Assoziationen zwischen miRNAs und Frakturrisiken in Gegenwart einzelner Frakturrisikofaktoren wie beispielsweise dem Geschlecht oder bestimmter Vorerkrankungen (z.B. T2DM) zu untersuchen.

Vor diesem Hintergrund ergaben sich folgende Studienhypothesen:

- 1. Die hier untersuchten miRNAs sind bei der Gruppe mit Frakturen im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschiedlich exprimiert.**

Für die nähere Spezifizierung der Expressionsunterschiede der miRNAs zwischen den beiden Studiengruppen wurden Signifikanzniveaus etabliert (siehe Unterkapitel 3.2.2).

- 2. Bei unterschiedlichem Expressionsverhalten der untersuchten miRNAs in der Studienpopulation sind diese für die Diagnostik verwendbar.**

Dafür wurde von einer ausreichend hohen diagnostischen Güte in Form von Sensitivität und Spezifität ausgegangen.

2.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs im Vergleich zwischen der Gruppe mit Fraktur und der Kontrollgruppe, sowie die Bestimmung der statistischen Signifikanz möglicher Unterschiede im Expressionsverhalten. Zusätzlich sollen die Ergebnisse durch eine Literaturrecherche in Bezug auf den aktuellen Wissensstand über die untersuchten miRNAs im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel und Frakturen gesetzt werden. Ferner soll die diagnostische Güte der untersuchten miRNAs analysiert werden, um einzuschätzen, ob diese potentiell diagnostisch eingesetzt werden können.

Für die Umsetzung dieser Ziele wurden folgende Arbeitsschritte definiert:

1. Datenerhebung: Auswahl der Probenseren bzw. der Studienpopulation
2. Datenauswertung:
 - 2.1 Expressionsanalyse
 - a) Extraktion der miRNA aus den Probenseren
 - b) Reverse Transkription der miRNA in cDNA
 - c) Quantitative Real-Time PCR zur Detektion der Ct-Werte
 - 2.2 Datenanalyse:
 - a) Relative Quantifizierung
 - b) Statistische Auswertung mittels Fold change
 - c) ROC-Analyse
3. Studienhypothese 1: Bewertung der Ergebnisse der Expressionsanalyse im Vergleich der zwei Gruppen und Einbettung der gefundenen Erkenntnisse in den bestehenden Wissensstand
4. Studienhypothese 2: Untersuchung und Bewertung der diagnostischen Güte anhand der ROC-Analyse

2.3 Ethischer Gesichtspunkt

Für die Analyse der, in dieser Diplomarbeit untersuchten miRNAs wurden Probenseren genutzt, die Teil einer bereits existierenden Kohorte mit prospektiver Frakturerefassung (SOS-Hip Kohorte) waren. Für diese Kohorte und den daran angeschlossenen beiden Studien lag bereits ein positiver Bescheid der Ethikkommission vor (EK 11-158 ex 98/99). In dieser Arbeit wurde eine Auswertung der pseudonymisierten Probandinnen durchgeführt. Ein neuerlicher Ethikantrag war dafür nicht notwendig.

3 Material und Methoden

3.1 Datenerhebung

3.1.1 Ausgewählte Studienpopulation in dieser Diplomarbeit

Für die Zusammenstellung der beiden verglichenen Gruppen (siehe Abbildung 1) wurden in dieser Diplomarbeit nur Probandinnen mit ausschließlich T2DM herangezogen, bei denen ein Eintreten oder Ausbleiben eines Frakturereignisses im Beobachtungszeitraum detektiert worden war. Ähnlich wie bei den, im Weiteren beschriebenen, beiden Publikationen wurden die Probandinnen auch in dieser Diplomarbeit in zwei Gruppen eingeteilt.

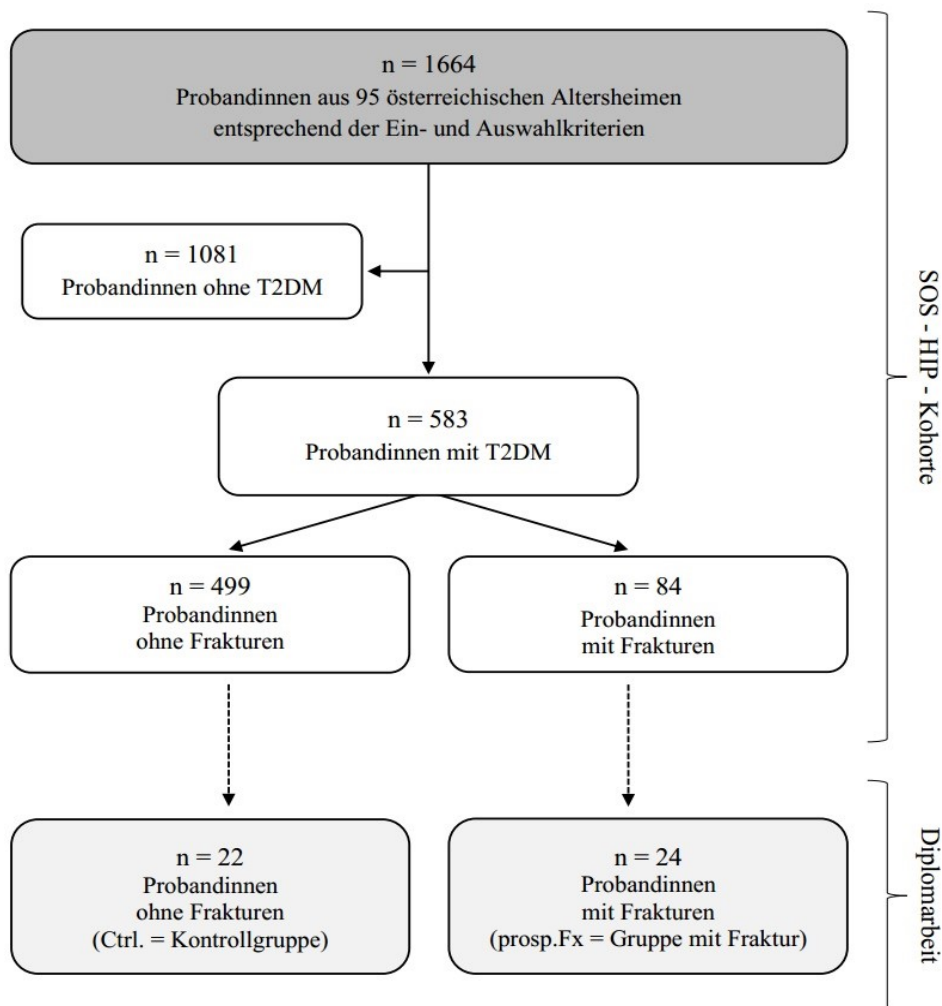


Abbildung 1 Studienpopulation

3.1.2 Die Auswahl der Studienpopulation

Für die in dieser Diplomarbeit ausgewählte Studienpopulation wurden die Ein- und Ausschlusskriterien, der definierte Beobachtungszeitraum, die Gruppenzuteilungen, die Baseline Charakteristika, die dokumentierten Vorerkrankungen und Medikation, die Laborwerte und die Parameter der QUS der beiden Publikationen (siehe Unterpunkte 3.1.4.1 und 3.1.4.2) verwendet. Diese beiden Publikationen beschäftigten sich erstmals mit den erhobenen Daten der SOS-Hip Kohorte und sollen daher im Weiteren kurz erläutert werden. Zudem erfolgte die Selektion der Probandinnen mit der Maßgabe einer kleinen Fallzahl (siehe Unterkapitel 3.1.3), nach der Qualitätskontrolle der Proberseren (siehe Unterkapitel 3.2.1.2) und anhand der Studienmerkmale, die möglichst homogen zwischen den beiden Studiengruppen verteilt sein sollte (siehe Unterkapitel 4.1).

3.1.3 Die Fallzahl

Das Ziel dieser Arbeit als Pilotstudie war die Identifikation von im Blutserum zirkulierenden miRNAs als Frakturprädiktoren. Da die Studienpopulation daher klein gewählt worden war, wurde darauf geachtet, eine möglichst homogene Verteilung der Studienpopulation zwischen den beiden Gruppen bezüglich der einzelnen Baseline Charakteristika zu gewährleisten und dies bei der Auswahl der Proberseren dementsprechend zu berücksichtigen (siehe Unterkapitel 4.1.1 bis 4.1.3).

3.1.4 Ein- und Ausschlusskriterien und Beobachtungszeitraum

Die Proberseren der für diese Diplomarbeit ausgewählten, postmenopausalen Probandinnen unterlagen den Auswahlkriterien für die Erstellung der SOS-Hip Kohorte, die die Studienpopulation der beiden Publikationen darstellte.

Für die SOS-Hip Kohorte wurden insgesamt 1664 Probandinnen aus 95 österreichischen Altersheimen ausgewählt. Für die Rekrutierung, die ursprünglich für die beiden anschließend erstellten Publikationen durchgeführt worden war, wurden die folgenden Auswahlkriterien angewandt (50)(66). Die untere Altersgrenze für die ausschließlich weiblichen, hellhäutigen Teilnehmerinnen lag bei mindestens 70 Jahren und umfasste drei Altersgruppen: 70 bis 79, 80 bis 89 und 90 bis 100 Jahre (siehe Tabelle 8). Es galten folgende Einschluss- und Ausschlusskriterien:

Als einschließendes Kriterium wurde eine eigenständige Bewältigung einer zumindest kurzen Gehstrecke ohne Gehhilfe, Gehstock oder Rollator vorausgesetzt. Ausgeschlossen wurden jene, bei denen eine maligne Erkrankung oder die Behandlung dessen innerhalb eines Jahres vor Studienbeginn vorlag. Weitere Ausschlusskriterien stellten eine Hyperkalzämie ($>2,6$ mmol/Liter) und eine fortgeschrittene Nieren- und Leberfunktionsstörung (Serumkreatininspiegel $>1,9$ mg/dl und Lebertransaminasen mehr als 3,5-mal höher als die obere Normgrenze) dar. Hinsichtlich chirurgischer Interventionen schloss ein beidseitiger Hüftersatz oder eine totale Gastrektomie eine Teilnahme an der Studie aus. Patientinnen mit dekompensierter Herzinsuffizienz (New York Heart Association Klasse 4), chronischem Alkoholismus, bekannter Osteomalazie, unbehandelter Schilddrüsenerkrankung oder mit chronischer Steroidbehandlung mit mehr als 5 mg Prednisolon-Äquivalent pro Tag wurden ebenfalls von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Der definierte Beobachtungszeitraum für etwaige auftretende Frakturen erstreckte sich entweder über längstens 2 Jahre, bis zum Versterben der Probandinnen oder bis zur ersten Fraktur, je nachdem, welches Ereignis als erstes eintraf (50)(66).

Für die Auswahl der Probandinnen zur Erstellung dieser Diplomarbeit wurde die Gruppeneinteilungen (T2DM, Frakturen) der beiden im Nachfolgenden beschriebenen Publikationen genutzt.

3.1.4.1 Publikation 1: “Type 2 Diabetes mellitus in Nursing Home Patients: Effects on Bone Turnover, Bone Mass, and Fracture Risk”

Gegenstand dieser Publikation war die Überprüfung eines potentiellen Effekts durch die Erkrankung T2DM auf die Knochenmasse, den Knochenstoffwechsel oder auf das Frakturrisiko bei alten, gebrechlichen Frauen in Altersheimen. Dafür wurden die Teilnehmerinnen wie nachfolgend beschrieben in zwei Gruppen unterteilt (50):

Tabelle 1 Einteilung der Studienpopulation in Publikation 1

Gruppe 1: Nicht-T2DM (Kontrollgruppe)	Gruppe 2: T2DM	Gesamte Studienpopulation
1081	583	1664

Jene Probandinnen wurden der T2DM Gruppe zugeordnet, die entweder eine manifeste Erkrankung diagnostiziert, eine antidiabetische Therapie verschrieben bekommen hatten oder einen erhöhten HbA1c Wert aufwiesen (HbA1c >5,9%). Als Therapieform wurde entweder eine entsprechende Diät ohne orale Antidiabetika (48,2% der T2DM-Probandinnen), eine orale Therapie mit Antidiabetikern (32,4%), oder eine Insulintherapie mit/ ohne orale Antidiabetika (19,4%) gewertet. Erwähnenswert ist, dass die Frakturrate sowohl in der Gruppe mit als auch ohne T2DM ähnlich hoch war. So lag die relative Frakturrate für Femurfrakturen in der Kontrollgruppe bei 3,1%, bei der Gruppe mit T2DM bei 3,4% und unterschied sich somit statistisch nicht signifikant voneinander.

3.1.4.2 Publikation 2: “Hip and Nonvertebral Fracture Prediction in Nursing Home Patients: Role of Bone Ultrasound and Bone Marker Measurements”

In dieser Publikation wurde untersucht, ob sich der quantitative Knochenultraschall (QUS) oder laborchemische Biomarker für Knochenumsatz und Knochenmetabolismus als potentielle Prädiktoren für Frakturrisiken bei alten, gebrechlichen Frauen in Altersheimen darstellten. Dafür wurden die Probandinnen in zwei Gruppen wie folgt aufgeteilt (66):

Tabelle 2 Einteilung der Studienpopulation in Publikation 2

Gruppe 1: ohne Frakturen (Kontrollgruppe)	Gruppe 2: mit Frakturen	Gesamte Studienpopulation
1433	231	1664

Jene Probandinnen wurden der Gruppe mit Frakturen zugeteilt, die im Beobachtungszeitraum Hüft- und/ oder nicht-vertebralen Frakturen erlitten hatten. Bei 231 Probandinnen ereignete sich eine Femurfraktur und/ oder eine nicht-vertebralen Fraktur. Alle anderen, die keine Frakturen innerhalb des Beobachtungszeitraums von maximal 2 Jahren erlitten hatten, wurden der Kontrollgruppe, also der Gruppe ohne Frakturen zugewiesen. Beide Gruppen stellten sich hinsichtlich der Charakteristika Alter, Größe, BMI, Mobility score, Muskelkraft, frühere Frakturen, Krankheiten und der Medikamenteneinnahme als überwiegend homogen verteilt dar und waren dementsprechend gut miteinander vergleichbar. Nur bezüglich des Mobility scores, einer psychotischen Störung und der Einnahme von Opiaten gab es statistisch leicht signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

3.2 Datenauswertung

3.2.1 Quantitative Expressionsbestimmung der miRNAs aus dem Blutserum

3.2.1.1 Untersuchte miRNAs und Primer-Auswahl

In Tabelle 3 sind die, im Vorfeld als differentiell-reguliert validierten 14 miRNAs mit ihren Zielsequenzen aufgelistet. Für die Validierung wurden Serumproben von 8 PatientInnen mit T2DM und Frakturen, 10 Patientinnen mit T2DM und ohne Frakturen aus der SOS-Hip Kohorte sowie eine Auswahl von PatientInnen der Trauma-Kohorte an Qiagen zur Small RNA Sequenzierung gesendet. Die Small RNA Sequenzierung nutzt die Methode der Sequenzierung durch Synthese (Illumina SBS). Es wurden jene miRNAs, die sich am meisten als differentiell reguliert darstellten für die hier durchgeführte Expressionsanalyse ausgewählt.

Tabelle 3 Untersuchte miRNA mit Zielsequenz und verwendete Spike-Ins

miRNAs	Zielsequenz ^a	Zugangsnummer ^a
hsa-let-7i-3p	62 – CUGC CGCAAGCUACUGCCUUGCU - 83	MIMAT0004585
hsa-miR-19a-3p	49 – UGUGCAA AUCUAUGCAA AACUGA - 71	MIMAT0000073
hsa-miR-19b-3p	54 - UGUGCAA AUCCAUGCAA AACUGA - 76	MIMAT0000074
hsa-miR-25-3p	52 - CAUUGCACUUGUCUGGUCUGA - 73	MIMAT0000081
hsa-miR-29b-3p	51 - UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU - 73	MIMAT0000100
hsa-miR-30d-5p	6 - UGUAAACA UCCCCGACUGGAAG - 27	MIMAT0000245
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACA UCCUUGACUGGAAG	MIMAT0000692
hsa-miR-93-5p	11 - CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG - 33	MIMAT0000093
hsa-miR-140-3p	62 - UACCACAGGGUAGAACCACGG - 82	MIMAT0004597
hsa-miR-141-3p	59 - UAACACUGUCUGGUAAGAUGG - 80	MIMAT0000432
hsa-miR-142-5p	16 - CAUAAAGUAGAAAGCACUACU - 36	MIMAT0000433
hsa-miR-363-3p	50 - AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA - 71	MIMAT0000707
hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	MIMAT0000759
hsa-miR-3168	9 - GAGUUCUACAGUCAGAC - 25	MIMAT0015043

Spike-In	Produkt Nummer (LNA miRNA PCR primer set, Qiagen)
UniSp 2	YP00203950
UniSp 4	YP00203953
UniSp 5	YP00203955
UniSp 6	YP00203954
cel-miR-39-3p	YP00203952

^a Informationen gewonnen aus Datenbank miRBase (25)

3.2.1.2 Qualitätskontrolle und Probenverarbeitung

Die in dieser Arbeit untersuchten Blutseren wurden direkt in den Altersheimen abgenommen. Während der Blutprobenabnahme waren die Probandinnen nicht nüchtern. Die Blutproben wurden zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur geronnen gelassen und anschließend sofort abzentrifugiert (Heraeus Biofuge - Kendro Laboratories, San Juan, Puerto Rico), aliquotiert, in Eiswasser gekühlt und anschließend in mobilen Kühlersystemen ins Studienzentrum nach Graz transportiert. Dort wurden diese endgültig bei -80°C für die weitere Verwendung gelagert. Bei einer Lagerung unter diesen Bedingungen zeigen sich miRNAs stabil hinsichtlich ihrer Konzentration (67)(68)(32).

Für die weitere Probenverarbeitung wurden jene Probenseren, die bei optischer Kontrolle hämolytische Verfärbungen aufwiesen für die Auswahl in dieser Arbeit ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlusskriterium war das Vorhandensein von jeglichen Aggregaten in den Probenseren. Außerdem war bei der Auswahl der Probenseren ein Mindestvolumen von 200 µl Serum für die weitere Probenbearbeitung notwendig.

Die anschließende, unten beschriebene Probenverarbeitung und Aufbereitung erfolgte stets nach Empfehlung des Herstellers und unter Verwendung der entsprechenden Arbeitsprotokolle (siehe Unterkapitel 3.2.1.4.1 bis 3.2.1.4.3).

3.2.1.3 Kontrollen

Tabelle 4 Kontrolldesign in der Expressionsanalyse

Arbeitsabschnitte in der Expressionsanalyse					
Extraktion der miRNA aus Serum			Reverse Transkription		
	UniSp 2	UniSp 4	UniSp 5	cel-miR-39-3p	UniSp 6
Probenseren	Kontrolle			Kontrolle	
NTC	der Probenextraktion			der cDNA Synthese	

3.2.1.3.1 Exogene Kontrollen

Die Überwachung der Extraktionseffizienz während der Quantifizierung der miRNAs aus den Probenseren erfolgte durch exogene Kontrollen mittels den Spike-Ins UniSp 2, UniSp 4, UniSp 5 und cel-miR-39-3p (synthetische miRNA der *Caenorhabditis elegans*; $1,6 \times 10^8$ Kopien). Die relative Normalisierung der Daten mit diesen exogenen Referenzgenen diente der Kontrolle einer möglichen, technischen Variabilität während des praktischen Teils der Genexpressionsanalyse.

Die Spike-In-Kontrollen UniSp 2, UniSp 4, UniSp 5 lagen laut Hersteller mit folgender, definierter Konzentration vor: UniSp 2 war 100-fach höher konzentriert als UniSp 4 (der Ct-Wert von UniSp 4 sollte circa 6,6 Zyklen größer sein als der von UniSp 2), UniSp 4 war wiederum 100-fach höher konzentriert als UniSp 5 (der detektierbare Ct-Wert von UniSp 5 sollte um circa 6,6 Zyklen größer sein als der von UniSp 4) (69).

Für die Qualitätssicherung der cDNA-Synthese wurde neben der erwähnten cel-miR-39-3p, die synthetische RNA-Spike-In Kontrolle UniSp 6 verwendet, die eine potentielle Inhibition der cDNA Synthese überprüfen sollte.

3.2.1.3.2 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen kamen ab der cDNA Synthese die Kontrollen „No Template Control“ (NTC) und „Reverse Transkriptase Minus“ (RT-) zum Einsatz. Bei der NTC wurde anstelle von Template RNase freies, destilliertes Wasser eingesetzt, um so etwaige Verunreinigung der jeweiligen Reaktionsansätze mit DNA und/ oder Fremdproteinen ausschließen zu können. Bei der Negativkontrolle RT- wurde im Reaktionsansatz die Reverse Transkriptase

weggelassen und eine Mischung aller eingesetzten Template pro Zyklus mit einem Gesamtvolumen von 2 µl hinzugegeben. Bei einer positiven Detektion der RT- in der qPCR wäre auf diesem Wege eine Verunreinigung mit gDNA und/ oder Primer-Dimeren identifiziert worden.

3.2.1.4 Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse besteht neben der Auswahl der Probenseren aus vier Arbeitsschritten (70), die nachfolgend erläutert werden.

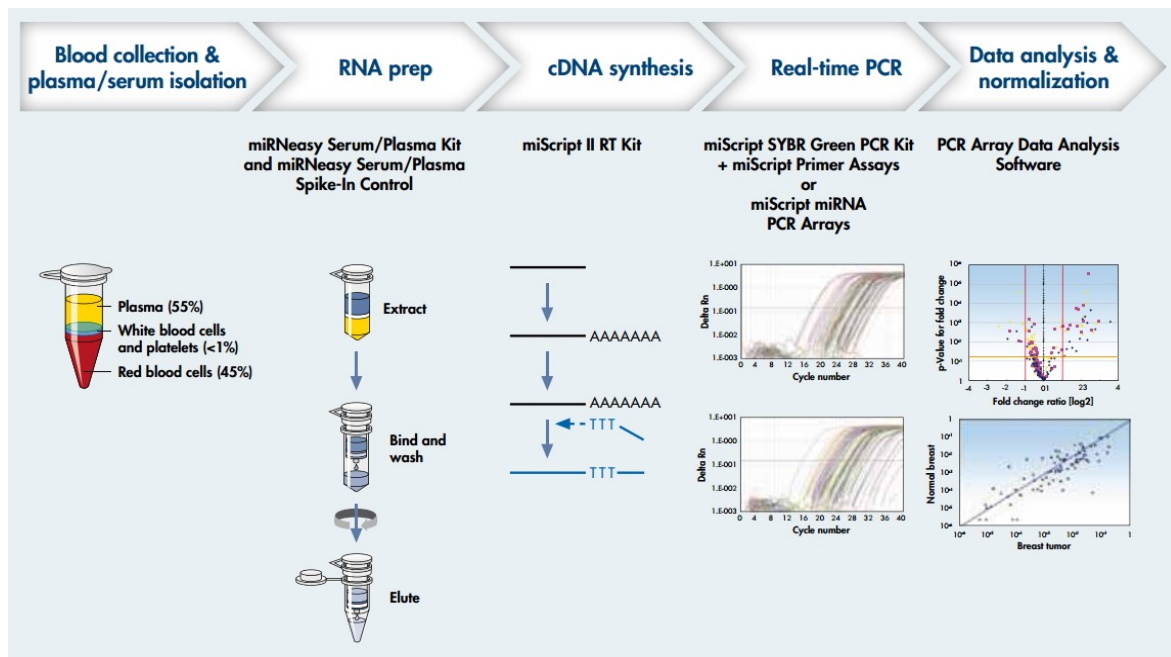


Abbildung 2 Allgemeiner Arbeitsablauf für das miScript PCR System
Quelle: Shaffer, J., Schlumpberger, M., Lader, E., 2012

3.2.1.4.1 Extraktion der miRNA aus dem Blutserum

Für die Extraktion der miRNA wurden die Serumproben und die Spike-Ins nach Anleitung mit dem miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) behandelt (69)(71).

Das Prinzip der miRNeasy miRNA Isolation beruht auf der Adsorption der zu analysierenden miRNA durch die Silika-Membran der mitgelieferten Trennsäulchen (QIAamp UCP MinElute®) und der Trennung von den übrigen Serumbestandteilen. Dafür müssen zunächst Proteine und RNasen mittels Guanidiniumthiocyanat-Ethanol denaturiert werden. In einer zweiten Phase werden durch die Trennsäulchen und weiteren Puffern in mehreren Waschschritten die Serumbestandteile so weit entfernt, bis am Ende nur noch die miRNA mit RNase freiem Wasser aus dem Trennsäulchen als Eluat gelöst werden kann.

Die für diese Arbeit verwendeten und vorher präparierten, bei -80°C gefrorenen Probenseren wurden nach oben beschriebener Qualitätskontrolle zunächst langsam auf Raumtemperatur aufgetaut und 200 µl der jeweiligen Proben für die Extraktion eingesetzt.

Zu Beginn wurde mittels des RPL-Puffers, der Guanidinthiocyanat und weitere Detergenzien enthält, die Lyse und Denaturierung von Proteinkomplexen, Exosomen und inaktivierten RNasen bewirkt. Mit der Zugabe des RPL-Puffers wurde zusätzlich ein RNA-Spike-In-Gemisch als Kontrolle (UniSp2, UniSp4, UniSp5) hinzugefügt – dieser Schritt zu diesem Zeitpunkt gewährleistete eine Gleichbehandlung zwischen Probenseren und Kontrollen. Das Gemisch wurde nach Mischen für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Hinzugabe des RPP-Puffers wurden im Anschluss daran die lysierten Proteine präzipitiert, die durch Zentrifugieren bei 12000 x g für wenige Minuten als Pellet an den Boden des Röhrchens zum Haften gebracht wurden. Der klare und farblose Überstand wurde für das weitere Vorgehen zusammen mit Isopropanol in das Trennröhrchen (UCP MinElute® Spin column) überführt. Isopropanol bewirkt hierbei ein Ausfällen der miRNA und schafft optimale Bindungsbedingungen für alle RNA-Moleküle, auch für kleine miRNAs ab einer Größe von etwa 18 Nukleotiden (71). Durch das anschließende Zentrifugieren bei 8000 x g für 15 Sekunden wurde die miRNA an die Silika-Membran der RNeasy Mini Spin Column gebracht. In den drei weiteren Waschschrritten wurde durch die Hinzugabe von jeweils zwei Puffern (RWT-Puffer, RPE-Puffer) und 80-prozentigen Ethanol mit jeweiligem Zentrifugieren bei 8000 x g für je 15 Sekunden die Probenseren weiter aufgereinigt. Anschließend erfolgte das Trocknen der Mini Spin Column durch maximale Zentrifugationsgeschwindigkeit für 5 Minuten, um auch letzte Puffer- und Ethanolreste aus der Silika-Membran zu schleudern. Zum Schluss wurde der Extraktionsansatz bestehend aus den zu untersuchenden miRNAs und dem RNA-Spike-In-Gemisch mit 20 µl RNase freiem Wasser aus der Silika-Membran eluiert.

3.2.1.4.2 Reverse Transkription

Für die, an die Extraktion der miRNA direkt anschließende reverse Transkription der isolierten RNA wurde das miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben benutzt (72). In weiterer Folge wurde angeschlossen an der reversen Transkription für die Real-Time qPCR das miRCURY SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet.

Das Prinzip der cDNA Synthese besteht aus vier Teilschritten und hat zum Ziel, die miRNA in cDNA umzuschreiben. Dafür generiert die Poly(A)-Polymerase zunächst durch Polyadenylierung an das 3'-Ende der miRNA einen Poly(A)-Schwanz, da reife miRNA nicht polyadenyliert ist. Dieser Schritt ist für die komplementäre Anlagerung des Oligo-dT-Primers an diesen Poly(A)-Schwanz im Anschluss notwendig, mit dessen Hilfe die RNA-abhängige DNA-Polymerase, das thermosensible Enzym Reverse Transkriptase die cDNA im Zuge der RT-PCR herstellen kann. Es entsteht also zunächst ein Doppelstrang aus RNA und DNA, aus der im Weiteren durch Abspaltung der Ausgangs-RNA die Erststrang-cDNA gebildet wird. Beide Schritte finden parallel im selben Reaktionsgefäß statt. Die Hybridisierungsreaktion läuft bei 42°C ab und wird am Ende bei 95°C hitzeinaktiviert. Für die reverse Transkription wurde folgender Mastermix angesetzt:

Tabelle 5 Mastermix (für ein Template) für die cDNA Synthese mit dem miRCURY LNA RT Kit (Qiagen)

Komponenten	Volumen (µl) für eine Serumprobe
5x miRCURY RT Reaction Buffer	2
RNase-free water	4.5
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1
Spike-In Kontrollen UniSp6, cel-miR-39-3p	0.5
Gesamtvolumen Mastermix	8
Zum Mastermix hinzugefügte RNA-Template	2
Totales Reaktionsvolumen	10

Der „Reaction Buffer“ beinhaltet die RT Primer, dNTPs und Mg^{2+} . Der „Enzyme Mix“ besteht aus der Poly(A)-Polymerase und der Reversen Transkriptase. Als Kontrolle für die Reverse Transkriptase wurden das synthetische RNA-Spike-In-Gemisch UniSp 6 und cel-miR-39-3p eingesetzt. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle die beiden Kontrollen NTC und RT- etabliert. Wie in Tabelle 5 bereits veranschaulicht, wurde dem Mastermix jeweils 2 µl RNA-Template ins Reaktionsgefäß hinzugeben, gemischt, kurz zentrifugiert und die gemischten Probenansätze auf Eis temporär gesammelt. Im nächsten Schritt wurden die Probenansätze dann im Thermocycler bei 42°C für 60 Minuten inkubieren und bei 95°C für 5 Minuten die Reverse Transkriptase hitzeinaktiviert. Danach wurde die synthetisierte cDNA auf 4°C abgekühlt und so temperiert aufbewahrt.

3.2.1.4.3 Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Nachdem die cDNA aller Probenseren schrittweise synthetisiert worden war, wurde für die weitere Expressionsanalyse das qPCR Protokoll von Qiagen verwendet. Hierzu wurde für die 384-Well PCR-Platte mit dem Individual miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen) (72) und dem Real-Time Cycler CFX384 (Bio-Rad) gearbeitet. Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels miRCURY SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Laut Hersteller ist unter Verwendung des Real-Time Cycler CFX384 von Bio-Rad eine Benutzung des ROX dye als Normalisierung des Fluoreszenzreportersignals nicht notwendig und wurde im Ansatz des Mastermixes durch Template ersetzt. Die eingesetzten Primer sind in dieser Arbeit gegen die untersuchten miRNAs gerichtet und die jeweiligen Zielsequenzen in Tabelle 3 aufgeführt. Für die qPCR wurde zunächst, kurz vor dem Gebrauch, die synthetisierten cDNAs mit 290 μ l DNase/RNase-freiem und destilliertem Wasser im Verhältnis 1:30 verdünnt. Nachfolgend wurde der Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6 Mastermix (für ein Template) für die RT-qPCR (miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen))

Komponenten	Volumen (μl) für eine Serumprobe
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5
PCR Primer Mix	1
DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	1
Gesamtvolumen Mastermix	7
cDNA Template	3 (Verdünnung 1:30)
Totales Reaktionsvolumen	10

Der „miRCURY SYBR Green Master Mix“ besteht aus dem universellen PCR Primer und der 5S rRNA Positivkontrolle. Der „PCR Primer Mix“ wurde aus den oben beschriebenen Primern aus je gleichen Teilen hergestellt. Beim Zusammenbringen des Reaktionsvolumens bestehend aus cDNA und Mastermix wurde zunächst der Mastermix in die jeweiligen Wells der 384-Well PCR-Platte, die auf Eis platziert worden war, vorgelegt. Anschließend erfolgte die Hinzugabe der verdünnten cDNA als Duplikat je Probe. Die beiden internen Kontrollen, die RT- und die NTC, wurden bei jeder Well PCR-Platte mitgeführt. Die NTC, die keine synthetisierte cDNA enthält, fungierte bei Benutzung des SYBR Green Master Mix darüber hinaus auch als Kontrolle für eine eventuelle Bildung von Primer-Dimeren (73). Nachdem alle Proben und die Kontrollen auf die 384-Well PCR-Platte aufgebracht worden waren,

wurde die Platte mit einer PCR-Folie verschlossen. Anschließend wurde die Well PCR-Platte vorsichtig bei Raumtemperatur gevortextet und in den Real-Time Cycler eingestellt. Die RT-qPCR erfolgte nach folgendem, vorprogrammierten Ablauf am Real-Time Cycler CFX384 (Bio-Rad) mit 40 Zyklen:

Tabelle 7 Konfiguration des qPCR-Zyklus in der Nutzung des miRCURY LNA miRNA PCR-Assays

Schritt	Zeit	Temp.	Ramp Rate (°C/sec.)
PCR initiale Hitzeaktivierung	2 min	95°C	Maximal
2-Schritt Zyklen:			
PCR Primer Mix	10 sec.	95°C	Maximal
DNase/RNase-freies destilliertes H ₂ O	60 sec.	56°C	Maximal
Anzahl der Zyklen	40		
Schmelzkurvenanalyse		60-95°C	

Die Bedienung, Konfiguration der Zyklen und Auswertung am Real-Time Cycler CFX384 (Bio-Rad) realisierte die geräteimmanente Software „CFX Maestro Software“. Diese stellt auch die Schmelzkurvenanalyse mit den entsprechenden Ct-Werte graphisch dar, die anschließend in Excel zur weiteren Analyse überführt wurden.

3.3 Datenanalyse

3.3.1 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung der RT-qPCR erfolgte die Auswertung in Anlehnung an der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (74). Hierbei wurden zunächst die Mittelwerte der, in Doppelbestimmung konzipierten Ct-Werte für alle Proben ermittelt – im Folgenden als „ \overline{Ct} -Werte“ bezeichnet. Im Weiteren wurden im Rahmen der Analyse der relativen Expressionsniveaus die \overline{Ct} -Werte der Kontrollgruppe mit denen der Gruppe mit Frakturen in Form der Fold change (FC) für jede miRNA einzeln verglichen.

Für die Berechnung der ΔCt -Werte wurde zunächst das arithmetische Mittel der \overline{Ct} -Werte der Kontrollproben gebildet. Von diesem Mittelwert der Kontrollgruppe wurden die jeweiligen \overline{Ct} -Werte jeder Probe aus beiden Gruppen subtrahiert und so die ΔCt -Werte als Differenz für jede Probe ermittelt (siehe Gleichung (1)).

$$(1) \Delta Ct_{probe} = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n k_i \right) - y \quad | \quad n = \text{Anzahl der Proben in Kontrollgruppe}$$

k = \overline{Ct} -Einzelwert einer Probe aus Kontrollgruppe
y = \overline{Ct} -Wert d. Probe aus Kontroll-/ Frakturgruppe

Die relativen Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen für jede miRNA wurden als Fold changes (FC) mit Hilfe der ΔCt -Werte ermittelt. Hierfür wurden jeweils die ΔCt -Werte jeder Probe quadriert und für jede Gruppe das geometrische Mittel dieser quadrierten ΔCt -Werte berechnet (siehe Gleichung (2)).

$$(2) FC = \bar{x}_{geom} = \sqrt[m]{\prod_{i=1}^m E_i^{\Delta Ct}} \quad | \quad FC = \text{Fold change}$$

m = Anzahl der Proben je zugehöriger Gruppe
E = PCR-Effizienz (näherungsweise 2)
 \bar{x}_{geom} = geometrische Mittel der Kontroll-/ Frakturgruppe

Die wahre Effizienz der Real-Time PCR liegt im Bereich zwischen 1,7 und 1,9 (73)(75). Die einzelnen Fold changes sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die Mittelwertdifferenz der \overline{Ct} -Werte zwischen den beiden Gruppen für jede miRNA ergibt sich aus:

$$(3) \log_2(FC) = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n k_i \right) - \left(\frac{1}{w} \sum_{i=1}^w p_i \right) \quad | \quad n = \text{Anzahl der Proben in Kontrollgruppe}$$

k = \overline{Ct} -Einzelwert einer Probe aus Kontrollgruppe
w = Anzahl der Proben in Frakturgruppe
p = \overline{Ct} -Einzelwert einer Probe aus Frakturgruppe

3.3.2 Statistik und verwendete Software

Die Durchführung der statistischen Auswertungen wurde mit IBM SPSS Statistics 27 realisiert.

Bei den Baseline Charakteristika wurden das Gewicht und der gesamte BMI mit dem t-Test auf statistisch signifikante Merkmalsunterschiede untersucht. Das Vorliegen der Normalverteilung der einzelnen Parameter wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk-Test ermittelt, wobei ausschlaggebend der Shapiro-Wilk-Test aufgrund seiner höheren Power war. Eine Gleichheit der Varianzen wurde mit dem Levene-Test sichergestellt. Die gesamte Altersverteilung und die Körpergröße waren nicht normalverteilt und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Merkmalsunterschiede hin getestet.

Dementgegen wurden die drei Altersgruppen, die fünf BMI Gruppen, der vierteilige Mobility score und die vor Studienbeginn aufgetretenen Frakturen mit dem Chi-Quadrat-Test oder Exakten Fisher-Test auf Unabhängigkeit zwischen Gruppenzugehörigkeit und einzelnen Parametern hin getestet. Der Exakte Fisher-Test kam immer dann zur Anwendung, wenn die Stichprobenzahl in den jeweiligen Untergruppen klein ($n < 5$) war. Andernfalls wurde in dieser Arbeit der Chi-Quadrat-Test aufgrund seiner größeren Güte bei statistischen Tests verwendet.

Bei der statistischen Bewertung der Unabhängigkeit bezüglich der Gruppenzugehörigkeit kam bei den Vorerkrankungen und verschriebene Medikationen wiederum der Chi-Quadrat-Test oder der Exakte Fisher-Test zum Einsatz.

Für zwei der drei T-Scores (radius, phalanx), für die beiden Parameter der QUS, die SOS und der Stiffness Index, und für die beiden Laborparameter Kalzium und OPG der t-Test durchgeführt, da diese sich allesamt im Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk-Test als normalverteilt zeigten. Eine Gleichheit der Varianzen wurde mit dem Levene-Test sichergestellt. Der dritte T-Score (Kalkaneus), die Messungen der BUA und alle übrigen Laborparameter stellten sich als nicht parametrisch verteilt dar. Bei diesen Parametern kam dementsprechend der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung.

Die Ausgabe der Ct-Werte für die einzelnen Templates nach Durchführung der RT-qPCR erfolgte bei Nutzung des Real-Time Cycler CFX384 von Bio-Rad durch die hauseigene CFX Maestro Software. Die ausgegebenen Ct-Werte wurden anschließend in Microsoft Excel überspielt und wie oben beschrieben weiter analysiert (siehe Unterkapitel 3.2.1.4.4).

Die Durchführung der statistischen Signifikanzprüfung hinsichtlich der Expressionsunterschiede der einzelnen, unabhängigen miRNAs wurde wie folgt durchgeführt:

In der explorativen Datenanalyse bei der Überprüfung auf Normalverteilung kam zunächst eine graphische Prüfung mittels Histogramms und Q-Q-Plot zum Einsatz, die in dieser Arbeit aufgrund des ausgedehnten Umfangs nicht aufgeführt worden ist. Für die statistischen Überprüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test eingesetzt. Die Prüfung der Varianzhomogenität wurde durch den Levene-Test realisiert.

In der weiteren statistischen Signifikanzuntersuchung der einzelnen Expressionsunterschiede kamen der t-Test und bei nicht parametrischer Verteilung der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Bei den insgesamt 13 auswertbaren miRNAs

wurden bis auf die drei nicht normalverteilten miRNAs miR-25-3p, miR-142-5p und miR-141-3p alle mittels t-Test auf statistische Signifikanz in der Expressionsanalyse untersucht. Für die statistische Signifikanzuntersuchung (*Signifikanzniveau* $\alpha \leq 0.05$) wurde hierbei die folgenden Signifikanzniveaus etabliert: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)).

Die Darstellung der Expressionsanalyse (siehe Abbildungen 3,4,5) erfolgte mit dem Programm PRISM (Version 8.0.2 für Windows) von GraphPad Software, Inc. Für die ROC-Analyse und die Erstellung der ROC-Kurven wurden SPSS mit der oben beschriebenen Version verwendet. Für die Erstellung der pAUCs wurde die Software MedCalc (Version 20.110 für Windows) von MedCalc Software Ltd verwendet (76).

Die Testpower, also die Trennschärfe der hier eingesetzten statistischen Testverfahren wurde mit dem Programm G.Power 3.1.9.7 (für Windows 10) berechnet (siehe Tabelle 27).

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der Merkmale der Studienpopulation

Im Rahmen der Auswahl der Probenseren wurden die Merkmale der Studienpopulation statistisch auf Homogenität zwischen den beiden Gruppen überprüft. Die Merkmale der Studienpopulation umfassten die Baseline Charakteristika, die Vorerkrankungen, die Medikationen, die Laborwerte und die Parameter der QUS.

4.1.1 Baseline Charakteristika

Die Betrachtung der in Tabelle 8 aufgeführten Baseline Charakteristika ergab folgende Ergebnisse:

Die Kontrollgruppe und die Gruppe mit Frakturen unterschieden sich in der Altersverteilung. Bei der Gruppe mit Frakturen gehörten 25% der Probanden der Altersfraktion der 90- bis 100-Jährigen an, während keine Probandinnen der Kontrollgruppe älter als 90 Jahre alt waren (Unterschied im Exakten Fisher-Test: $p=0,022$). Der Altersschnitt war jedoch in den Gruppen nicht unterschiedlich.

Weiterhin unterschieden sich die Gruppen im Auftreten früherer Frakturen, wobei in der Gruppe mit prospektiven Frakturen vorherige Frakturen häufiger vorkamen (Chi-Quadrat-Test: $p=0,007$) (siehe Tabelle 8).

Die gesamte Altersverteilung, Körpergröße, Körpergewicht, der gesamte BMI, wie auch die Fraktionen des BMI und die jeweiligen Fraktionen des Mobility scores wiesen keine statistisch auffälligen Unterschiede auf. Die früheren Frakturen, sowohl insgesamt als auch im Einzelnen, waren in Bezug auf die Verteilung zwischen beiden Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Tabelle 8 Bis auf die Altersverteilung und die früheren Frakturen überwiegende Homogenität in den Baseline Charakteristika und früheren Frakturen

	T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe) (N = 22)	T2DM mit Frakturen (N = 24)
M_{Alter}^a		83,04
SD_{Alter}^a		5,39

Range _{Alter} ^a	72 bis 95	
Alter (Jahren) ^I	82,14 ± 4,00	83,88 ± 6,38
70-79 Jahre ^{II}	7 ± 1,5 (31,81%)	7 ± 2,2 (29,16%)
80-89 Jahre ^{II}	15 ± 2,2 (68,18%)	11 ± 3,1 (45,83%)
90-100 Jahre ^{II}	0	6 ± 2,2 (25%) *
Größe (cm) ^I	155,67 ± 6,67	154,42 ± 6,57
Gewicht (kg) ^I	64,05 ± 9,35	62,58 ± 11,62
BMI (kg/m ²) ^I	26,91 ± 3,72	26,18 ± 4,14
<20 ^{II}	0	1 (4,17%)
20-25 ^{II}	7 (33,34%)	10 (41,67%)
25-30 ^{II}	9 (41,86%)	7 (29,16%)
30-35 ^{II}	4 (19%)	6 (25%)
>35 ^{II}	1 (4,80%)	0
Mobility score (MS) ^{II b}		
Mobility score 1	13 (59,09%)	12 (52,17%)
Mobility score 2	3 (16,63%)	6 (26,09%)
Mobility score 3	6 (27,27%)	5 (21,74%)
Mobility score 4	0	0
Frühere Frakturen ^{II}		
Frakturen insgesamt	12 (54,55%)	20 (83,33%) **
Frühere Femurfrakturen	4 (18,18%)	9 (37,50%)
Frühere radiale Frakturen	6 (27,27%)	5 (20,83%)
Frühere sonstige, nicht- vertebrale Frakturen	9 (40,91%)	16 (66,67%)

(siehe auch Tabelle 12 und Tabelle 14)

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^I getestet mit t-Test oder Mann-Whitney-U-Test

^{II} getestet mit Chi-Quadrat-Test oder Exaktem Fisher-Test

^a Angaben für alle 46 Probandinnen: der Mittelwert (M_{Alter}), die Standardabweichung (SD_{Alter}), die Altersspanne ($\text{Range}_{\text{Alter}}$)

^b MS 1: selbständiges Gehen; MS 2: Gehen mehrheitlich unter Verwendung einer Gehhilfe, aber ohne Rollstuhl; MS 3: tagsüber <50 % d. Zeit im Bett, mehrheitlich auf Rollstuhl angewiesen; MS 4: tagsüber <50 % d. Zeit im Bett

4.1.2 Vorerkrankungen und verschriebene Medikationen

In Tabelle 9 werden die prozentualen Verteilungen der Vorerkrankungen zwischen den beiden Gruppen und korrespondierend in Tabelle 10 die der verschriebenen Medikationen abgebildet.

Innerhalb der abgebildeten Vorerkrankungen zeigten sich in der ausgewählten Studienpopulation keine signifikanten Unterschiede. Keine Berücksichtigung fanden bei der Analyse der Vorerkrankungen aufgetretene Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, dermatologische, neurologische und Infektionserkrankungen, da sie entweder zahlenmäßig zu selten auftraten oder nicht spezifisch genug dokumentiert worden waren.

Tabelle 9 Keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Vorerkrankungen

	T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe) (N = 22)	T2DM mit Frakturen (N = 24)
Arterielle Hypertonie ^{II}	11 (50%)	12 (50%)
Schlaganfall ^{II}	4 (18,18%)	8 (33,33%)
Myokardinfarkt/ KHK ^{II}	11 (50%)	9 (37,50%)
Herzinsuffizienz/Arrhythmie ^{II}	8 (36,36%)	7 (29,17%)
Vaskuläre Erkrankungen ^{II a}	5 (22,73%)	7 (29,17%)
Nierenversagen/-insuffizienz ^{II}	1 (4,55%)	5 (20,80%)
Osteoporose ^{II}	1 (4,55%)	4 (16,67%)
Augenerkrankungen ^{II b}	2 (9,09%)	5 (20,83%)
Parkinson ^{II}	6 (27,27%)	8 (16,67%)
Depression ^{II}	6 (27,27%)	4 (16,67%)
Alzheimer/ Vergesslichkeit ^{II}	6 (27,27%)	5 (20,83%)

(siehe auch Tabelle 15)

^{II} getestet mit Chi-Quadrat-Test oder Exaktem Fisher-Test

^a pAVK, Aortensklerose, arteriosklerotische Mikroangiopathie, Lungenembolie, zerebrovaskuläre Insuffizienz, vertebrobasiläre Insuffizienz, TIA

^b Makuladegeneration, diabetische Retinopathie, Astigmatismus, Hypermetropie

Auch zeigte sich bei der Betrachtung der verschriebenen Medikationen eine statistisch gleichverteilte Studienpopulation.

Tabelle 10 Keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der Medikationen

	T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe) (N = 22)	T2DM mit Frakturen (N = 24)
NSAID ^{II}	8 (36,36%)	9 (37,50%)
Nitrate ^{II}	1 (4,55%)	3 (12,50%)
ACE-Hemmer ^{II}	9 (40,91%)	10 (41,67%)
Diuretika ^{II a}	13 (59,09%)	8 (33,33%)
Antihypertensiva ^{II b}	2 (9,09%)	6 (25%)
Digitalis ^{II}	8 (36,36%)	8 (33,33%)
Vitamin D ^{II}	1 (4,55%)	3 (12,50%)
Kalziumpräparate ^{II}	2 (9,09%)	4 (16,67%)
Opiate ^{II c}	3 (13,64%)	3 (12,50%)
Benzodiazepine ^{II}	1 (4,55%)	6 (25,00%)
Antipsychotika ^{II}	5 (22,73%)	4 (16,67%)
Antidementiva ^{II}	9 (40,91%)	13 (37,50%)
Parkinson-Therapeutika ^{II}	6 (27,27%)	8 (16,67%)
Antidepressiva ^{II}	9 (40,91%)	7 (29,17%)

(siehe auch Tabelle 16)

^{II} getestet mit Chi-Quadrat-Test oder Exaktem Fisher-Test

^a Hydrochlorothiazid, Spironolacton

^b Selektive Calciumkanalblocker, α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten

^c Tramadol, Dihydrocodein

4.1.3 Laborwerte und Parameter der QUS

In Tabelle 11 werden die prozentualen Verteilungen der laborchemischen Parameter, der T-Scores und der Parameter der QUS vergleichend dargestellt. Alle laborchemisch untersuchten Werte wurden aus dem Blutserum bestimmt. Mobile Teams führten die Messungen der QUS (BUA/ SOS) in den einzelnen Altersheimen im Beobachtungszeitraum durch (50). Die in dieser Diplomarbeit verwendeten T-Scores (siehe Tabelle 11) wurden mit zwei unterschiedlichen Geräten ermittelt. Die Messung der SOS, BUA und SI am Kalkaneus und die Ermittlung des T-Scores wurden mit dem Gerät Achilles Express (GE LUNAR Corp., Madison, WI) durchgeführt (56). Als Referenzpopulation diente eine weibliche, hellhäutige, amerikanische Studienpopulation im Alter zwischen 20 und 100 Jahren (66).

Für die Ermittlung der SOS und des T-Scores am distalen Drittel des Radius und an der proximalen Phalanx, jeweils auf der nicht-dominanten Körperhälfte, wurde mit dem Sunlight Omnisense Ultraschallgerät (Sunlight Ultrasound Technologies Ltd., Rehovot, Israel) durchgeführt. Die Referenzpopulation rekrutierte sich hier aus einer weiblichen, hellhäutigen israelischen Population im Alter zwischen 20 und 89 Jahren (66). Bei der Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede mittels t-Test war der Messwert des Osteoprotegerin (OPG) als einziger Laborparameter statistisch signifikant niedriger in der Gruppe mit Frakturen. Der am Fersenbein (Kalkaneus) ermittelte T-Score war in der Gruppe mit Frakturen statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. In der Zusammenschau aller Werte in Tabelle 11 konnte eine generelle Tendenz in der Gruppe mit Frakturen hin zu kleineren Werten in der QUS und geringeren T-Scores beobachtet werden, wenngleich auch diese Unterschiede bis auf die beiden erwähnten Ausnahmen statistisch nicht signifikant waren.

Tabelle 11 OPG und am Kalkaneus gemessener T-Score als die beiden einzigen, signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen

	T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe) (N = 22)	T2DM mit Frakturen (N = 24)
Kreatinin ^{I a} [mg/dl]	1,17 ± 0,24	1,13 ± 0,21
Albumin ^{I a} [g/dl]	4,06 ± 0,30	3,98 ± 0,30
Kalzium ^{I a} [mmol/l]	2,35 ± 0,11	2,38 ± 0,09
Parathormon ^{I a} [ng/l]	69,32 ± 41,70	66,61 ± 37,37
Osteoprotegerin (OPG) ^{I a} [pmol/l]	6,97 ± 1,88	5,63 ± 1,78 *
Vitamin D3 ^{I a} (1,25-(OH)2-D3) [ng/l]	10,23 ± 7,50	12,04 ± 10,94
Osteokalzin ^{I a} [ng/ml]	28,77 ± 13,45	31,17 ± 13,23
Parameter der QUS ^I		
BUA (dB/ MHz) ^c	97,73 ± 21,27	87,90 ± 16,35
SOS (m/sec) ^{b c}	1524,46 ± 47,9	1492,00 ± 25,3
Stiffness Index (SI) ^c	72,32 ± 26,96	56,65 ± 17,26
T-Scores ^I		
T-Score Radius ^b	-2,64 ± 1,78	-3,23 ± 1,23
T-Score Phalangeal ^b	-2,76 ± 1,05	-3,15 ± 1,19
T-Score Kalkaneal ^c	-2,25 ± 1,60	-3,47 ± 1,28 *

(siehe auch Tabelle 12 und 13)

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^I getestet mit t-Test oder Mann-Whitney-U-Test

^a im Blutserum bestimmt

^b ermittelt mit Sunlight Omnisense ultrasound bone sonometer (Sunlight Ultrasound Technologies Ltd., Rehovot, Israel); Messort: distales Drittel des Radius, proximale Phalanx d. Mittelfingers

^c ermittelt mit Achilles Express (GE LUNAR Corp., Madison, WI)

SI = (0.67 x BUA + 0.28 x SOS) – 420

Tabelle 12 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Baseline Charakteristika, T-Scores, BUA, SOS, SI

	Studienpopulation				Normalverteilung ^c				Varianzhomogenität				Signifikanz		Signifikanz		Signifikanz	
	Fälle		Fehlende Daten		Statistik	df	Sig. p-Wert	Statistik	df	Sig. p-Wert	F	Sig. ^f p-Wert	Statistik T-Wert	df	Exakte Sig. (2-seitig)	Statistik T-Wert	Z	Exakte Sig. (2-seitig)
	Gültige Daten	Fehlende Daten	Control §	prosp. Fx §														
Alter (Jahren)	Control §	22	0	82,14	4,00	0,854	0,179	22	0,064	0,894	22	0,023 [#]			217,5	-1,026	0,311	
	prosp. Fx §	24	0	83,88	6,38	1,303	0,097	24	0,753	0,966	24	0,587						
Größe (cm)	Control §	21	1	155,67	6,67	1,455	0,220	21	0,008	0,840	21	0,003 [#]						
	prosp. Fx §	24	0	154,42	6,57	1,303	0,130	24	0,415	0,960	24	0,393						
Gewicht (kg)	Control §	22	0	64,05	9,35	1,993	0,105	22	0,823	0,962	22	0,529						
	prosp. Fx §	24	0	62,58	11,62	2,373	0,128	24	0,382	0,951	24	0,284	2,44	0,125 ⁼	0,47	44	0,643	
BMI (kg/m ²)	Control §	21	1	26,91	3,72	0,814	0,173	21	0,101	0,932	21	0,154						
	prosp. Fx §	24	0	26,18	4,14	0,846	0,145	24	0,210	0,949	24	0,257	1,03	0,315 ⁼	0,62	43	0,539	
T-Score (Radius)	Control §	22	0	-2,64	1,78	0,380	0,127	22	0,478	0,944	22	0,238						
	prosp. Fx §	20	4	-3,23	1,23	0,276	0,123	20	0,614	0,983	20	0,970	2,78	0,103 ⁼	1,24	40	0,221	
T-Score (Phalanx)	Control §	19	3	-2,76	1,05	0,242	0,124	19	0,657	0,947	19	0,349						
	prosp. Fx §	23	1	-3,15	1,19	0,248	0,100	23	0,872	0,955	23	0,371	0,48	0,491 ⁼	1,08	40	0,285	
T-Score (Kalkaneus)	Control §	22	0	-2,25	1,60	0,342	0,161	22	0,145	0,883	22	0,014 [#]						
	prosp. Fx §	20	4	-3,47	1,28	0,287	0,166	20	0,152	0,960	20	0,540						
BUA	Control §	11	11	97,73	21,27	6,413	0,260	11	0,037 [#]	0,880	11	0,104						
	prosp. Fx §	10	14	87,90	16,35	5,171	0,168	10	0,688	0,957	10	0,750	(0,34)	(0,567)	(118)	19	(0,254)	0,512
SOS	Control §	11	11	1524,5	47,9	14,446	0,171	11	0,546	0,869	11	0,076						
	prosp. Fx §	10	14	1492,0	25,3	8,006	0,132	10	1,230	0,940	10	0,549	2	0,173 ⁼	1,91	19	0,071	
SI	Control §	11	11	72,32	26,96	8,129	0,215	11	0,166	0,867	11	0,072						
	prosp. Fx §	10	14	56,65	17,26	5,458	0,111	10	1,550	0,984	10	0,985	1,3	0,269 ⁼	1,57	19	0,134	

Signifikanzniveau α : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

^a Arithmetisches Mittel

^b Standardfehler des Mittelwertes

^c keine Normalverteilung: [‡]; Normalverteilung: =

^d Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

^e bei Signifikanz ($p < 0,05$) ausschlaggebend für Beurteilung der Normalverteilung

^f Varianzgleichheit = =, Varianzungleichheit = [‡]

[§] Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

Tabelle 13 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Laborparameter
Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

	Studienpopulation				Normalverteilung ^c						Varianzhomogenität			Signifikanz				
	Fälle		Fehlende Daten		Kolmogorov-Smirnov Test ^d			Shapiro-Wilk-Test ^e			Levene-Test		t-Test		Mann-Whitney-U-Test			
	Gültige Daten	22	0	0	Statistik	df	Sig. p-Wert	Statistik	df	Sig. p-Wert	F	Sig. p-Wert	Statistik T-Wert	df	Exakte Sig. (2-seitig)	Statistik T-Wert	Z	Exakte Sig. (2-seitig)
Kreatinin [mg/dl]	Control [§]	22	0	1,17	0,24	0,050	0,178	22	0,069	0,942	22	0,213				267	-0,610	0,555
	prosp. Fx [§]	24	0	1,13	0,21	0,043	0,152	24	0,159	0,901	24	0,022 [#]				204,5	-1,320	0,196
Albumin [g/dl]	Control [§]	24	0	3,98	0,30	0,630	0,257	22	0,001 [#]	0,705	22	0,000 [#]						
	prosp. Fx [§]	24	0	3,98	0,30	0,616	0,163	24	0,098	0,898	24	0,019 [#]						
Kalzium [mmol/l]	Control [§]	22	0	2,35	0,11	0,024	0,163	22	0,134	0,934	22	0,150						
	prosp. Fx [§]	24	0	2,38	0,09	0,018	0,099	24	0,860	0,881	24	0,912	0,25	0,622				
PTH [ng/l]	Control [§]	22	0	69,32	41,70	8,891	0,266	22	0,000 [#]	0,761	22	0,000 [#]						
	prosp. Fx [§]	23	1	66,61	37,37	7,793	0,119	23	0,556	0,950	23	0,298						
OPG [pmol/l]	Control [§]	20	2	6,97	1,88	0,420	0,119	20	0,682	0,976	20	0,876						
	prosp. Fx [§]	21	3	5,63	1,78	0,389	0,155	21	0,206	0,936	21	0,178	0	0,997				
Vitamin D3 [ng/l]	Control [§]	22	2	10,23	7,50	1,600	0,223	22	0,000 [#]	0,733	22	0,000 [#]						
	prosp. Fx [§]	23	1	12,04	10,94	2,281	0,310	23	0,000 [#]	0,649	23	0,000 [#]						
Osteokalzium [ng/ml]	Control [§]	22	2	28,77	13,45	2,804	0,175	22	0,078	0,915	22	0,059						
	prosp. Fx [§]	23	1	31,17	13,23	2,758	0,188	23	0,035 [#]	0,849	23	0,003 [#]						

^a Arithmetisches Mittel

^b Standardfehler des Mittelwertes

^c keine Normalverteilung: #; Normalverteilung: =

^d Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

^e bei Signifikanz ($p < 0,05$) ausschlaggebend für Beurteilung der Normalverteilung

^f Varianzgleichheit = =, Varianzungleichheit = #

[§] Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

Tabelle 14 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Baseline Charakteristika und Frühere Frakturen

	Studienpopulation Fälle		Signifikanz Fisher-Test	Signifikanz Chi-Quadrat	Exakte Sig. (2-seitig)
	Gültige Daten	Fehlende Daten	Exakte Sig. (2-seitig)	Statistik	
Altersgruppe	Control ^a	22	0		
	prosp. Fx ^a	24	0		
70-79 Jahre	Control ^a	7 ± 1,5 (31,81%)		0,038 ^b	0,549
	prosp. Fx ^a	7 ± 2,2 (29,16%)			
80-89 Jahre	Control ^a	15 ± 2,2 (68,18%)		2,333 ^b	0,109
	prosp. Fx ^a	11 ± 3,1 (45,83%)			
90-100 Jahre	Control ^a	0			
	prosp. Fx ^a	6 ± 2,2 (25%)	0,022 ^c *		
BMI (kg/m ²)	Control ^a	21	1		
	prosp. Fx ^a	24	0		
<20	Control ^a	0			
	prosp. Fx ^a	1 (4,17%)	1,000 ^c		
20-25	Control ^a	7 (33,34%)		0,331 ^b	0,759
	prosp. Fx ^a	10 (41,67%)			
25-30	Control ^a	9 (41,86%)		0,916 ^b	0,369
	prosp. Fx ^a	7 (29,16%)			
30-35	Control ^a	4 (19,00%)			
	prosp. Fx ^a	6 (25%)	0,729 ^c		
>35	Control ^a	1 (4,80%)			
	prosp. Fx ^a	0	0,467 ^c		
Mobility score (MS)	Control ^a	22	0		
	prosp. Fx ^a	23	1		
Mobility score 1	Control ^a	13 (59,09%)		0,218 ^b	0,767
	prosp. Fx ^a	12 (52,17%)			
Mobility score 2	Control ^a	3 (16,63%)			
	prosp. Fx ^a	6 (26,09%)	0,459 ^c		
Mobility score 3	Control ^a	6 (27,27%)		0,186 ^b	0,738
	prosp. Fx ^a	5 (21,74%)			
Mobility score 4	Control ^a	0			
	prosp. Fx ^a	0			
Frühere Frakturen	Control ^a	22	0		
	prosp. Fx ^a	24	0		
Frakturen insgesamt	Control ^a	19 (38,78%; N _{gesamt} = 49)		2,494 ^b	0,080
	prosp. Fx ^a	30 (61,22%; N _{gesamt} = 49)			
Frühere Femurfrakturen	Control ^a	4 (18,18%)			
	prosp. Fx ^a	9 (37,50%)	0,197 ^c		
Frühere radiale Frakturen	Control ^a	6 (27,27%)		0,262 ^b	0,734
	prosp. Fx ^a	5 (20,83%)			
Frühere sonstige, nicht-vertebrale Frakturen	Control ^a	9 (40,91%)		3,069 ^b	0,138
	prosp. Fx ^a	16 (66,67%)			

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

^b Anzahl in Unterzellen $N \geq 5$

^c Anzahl in Unterzellen $N \leq 5$

Tabelle 15 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Vorerkrankungen

			Signifikanz Fisher-Test	Signifikanz Chi-Quadrat	
		Studienpopulation Fälle	Exakte Sig. (2-seitig)	Statistik	Exakte Sig. (2-seitig)
Arterielle Hypertonie	Control ^a	11 (50%)		0,000 ^b	1,000
	prosp. Fx ^a	12 (50%)			
Schlaganfall	Control ^a	4 (18,18%)	0,321 ^c		
	prosp. Fx ^a	8 (33,33%)			
Myokardinfarkt/ KHK	Control ^a	11 (50%)		0,730 ^b	0,552
	prosp. Fx ^a	9 (37,50%)			
Herzinsuffizienz/ Arrhythmie	Control ^a	8 (36,36%)		0,271 ^b	0,755
	prosp. Fx ^a	7 (29,17%)			
Vaskuläre Erkrankungen	Control ^a	5 (22,73%)		0,247 ^b	0,742
	prosp. Fx ^a	7 (29,17%)			
Nierenversagen/ -insuffizienz	Control ^a	1 (4,55%)	0,190 ^c		
	prosp. Fx ^a	5 (20,80%)			
Osteoporose	Control ^a	1 (4,55%)	0,349 ^c		
	prosp. Fx ^a	4 (16,67%)			
Augenerkrankungen	Control ^a	3 (13,64%)	0,702 ^c		
	prosp. Fx ^a	5 (20,83%)			
Parkinson	Control ^a	6 (27,27%)		0,199 ^b	0,754
	prosp. Fx ^a	8 (16,67%)			
Depression	Control ^a	6 (27,27%)	0,484 ^c		
	prosp. Fx ^a	4 (16,67%)			
Alzheimer/ Vergesslichkeit	Control ^a	6 (27,27%)		0,262 ^b	0,734
	prosp. Fx ^a	5 (20,83%)			

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

^b Anzahl in Unterzellen $N \geq 5$

^c Anzahl in Unterzellen $N \leq 5$

Tabelle 16 Testung auf unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Studiengruppen: Verschiedene Medikation

		Studienpopulation Fälle	Signifikanz Fisher-Test	Signifikanz Chi-Quadrat	Exakte Sig. (2-seitig)
			Exakte Sig. (2-seitig)	Statistik	
NSAID	Control ^a	8 (36,36%)		0,006 ^b	1,000
	prosp. Fx ^a	9 (37,50%)			
Nitrate	Control ^a	1 (4,55%)	0,609 ^c		
	prosp. Fx ^a	3 (12,50%)			
ACE-Hemmer	Control ^a	9 (40,91%)		0,003 ^b	1,000
	prosp. Fx ^a	10 (41,67%)			
Diuretika	Control ^a	13 (59,09%)		3,069 ^b	0,138
	prosp. Fx ^a	8 (33,33%)			
Antihypertensiva	Control ^a	2 (9,09%)	0,247 ^c		
	prosp. Fx ^a	6 (25%)			
Digitalis	Control ^a	8 (36,36%)		0,046 ^b	1,000
	prosp. Fx ^a	8 (33,33%)			
Vitamin D	Control ^a	1 (4,55%)	0,915 ^c		
	prosp. Fx ^a	3 (12,50%)			
Kalziumpräparate	Control ^a	2 (9,09%)	0,581 ^c		
	prosp. Fx ^a	4 (16,67%)			
Opiate	Control ^a	3 (13,64%)	1,000 ^c		
	prosp. Fx ^a	3 (12,50%)			
Benzodiazepine	Control ^a	1 (4,55%)	0,098 ^c		
	prosp. Fx ^a	6 (25%)			
Antipsychotika	Control ^a	5 (22,73%)	0,718 ^c		
	prosp. Fx ^a	4 (16,67%)			
Antidementiva	Control ^a	9 (40,91%)		0,809 ^b	0,394
	prosp. Fx ^a	13 (37,50%)			
Parkinson- Therapeutika	Control ^a	5 (22,73%)		1,183 ^b	0,346
	prosp. Fx ^a	9 (37,50%)			
Antidepressiva	Control ^a	9 (40,91%)		0,698 ^b	0,538
	prosp. Fx ^a	7 (29,17%)			

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

^b Anzahl in Unterzellen $N \geq 5$

^c Anzahl in Unterzellen $N \leq 5$

4.2 Expressionsanalyse der miRNAs

Nach Durchführung der qPCR ergaben sich in der statistischen Auswertung die im Folgenden beschriebenen Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen. Es sollte überprüft werden, ob eine signifikante Änderung der Expression der jeweiligen miRNAs in der Gruppe mit Frakturen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden war.

4.2.1 Qualitätskontrolle der statistischen Auswertung

Berücksichtigung fanden bei der statistischen Auswertung nur jene miRNAs, bei denen entweder mehr als 50% der untersuchten Probenseren pro Gruppe detektierbare Expressionen aufwiesen und kein statistisch signifikanter Unterschied beim Expressionsmuster zwischen den beiden Gruppen vorlag.

Hier fand sich, dass die miRNA miR-3168 nicht detektierbar war. MiRNA miR-141-3p wies bei insgesamt 7 Templates keine Expressionen auf. Der Exakte Fisher-Test zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zwischen beiden Gruppen in allen untersuchten miRNAs.

4.2.2 Exogene Kontrollen

In den exogenen Kontrollen mit UniSp 2, UniSp 4, UniSp 5 und cel-miR-39-3p zeigten sich bei Betrachtung der Abbildung 3 keine Expressionsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Frakturen. Aus Tabelle 17 ist ersichtlich, dass die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant und die Log₂ Fold changes gering waren. Auch sind die Streuungen der jeweils aufgetragenen Fold changes in den einzelnen Kontrollen und Gruppen gering.

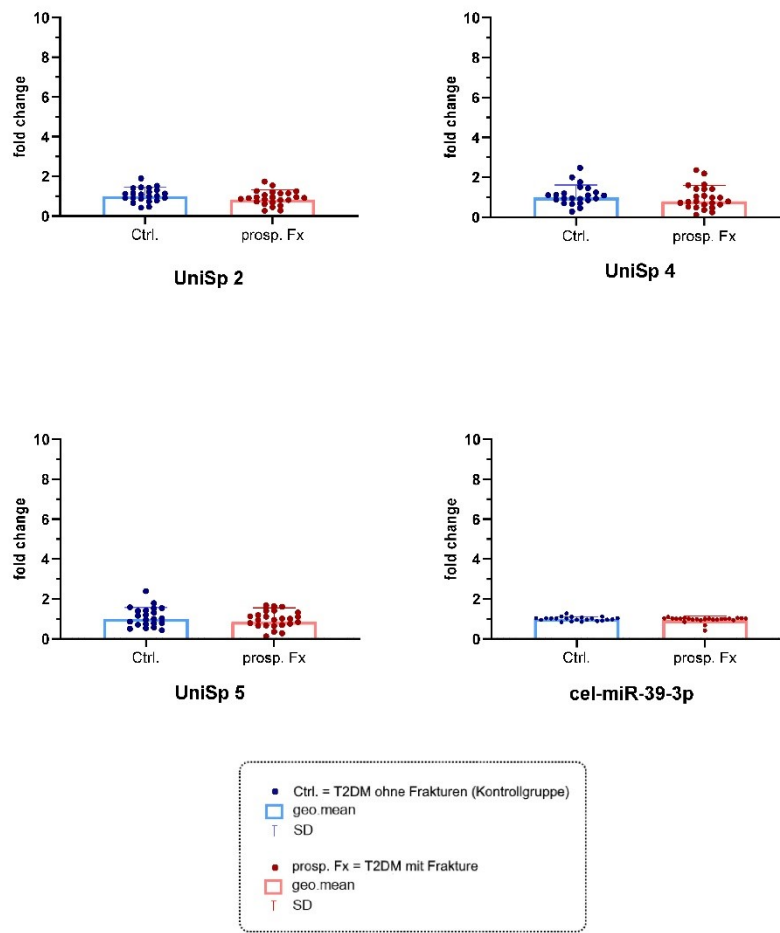


Abbildung 3 Keine Expressionsunterschiede bei den exogenen Kontrollen

Tabelle 17 Keine Expressionsunterschiede bei den verwendeten Spike-Ins; geringe SD; kleine Log₂ Fold change-Werte.

	Gruppe 1: T2DM ohne Frakturen (Ctrl= Kontrollgruppe)		Gruppe 2: T2DM mit Frakturen (prosp. Fx= Gruppe mit Fraktur)		Signifikanz	Log ₂ Fold change
	geo. Mittel	SD ^a	geo. Mittel	SD ^a	Exakte Sig. (2-seitig) p-Werte*	
UniSp 2	1,00	0,35	0,83	0,36	0,185	-0,26705
UniSp4	1,00	0,50	0,80	0,58	0,220381	-0,31471
UniSp5	1,00	0,49	0,85	0,42	0,492	-0,23000
cel-miR-39-3p	1,00	0,10	0,95	0,08	0,5060	-0,02620

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a SD = Standard Deviation

4.2.3 Darstellung der differentiell exprimierten miRNAs

Von den insgesamt 14 untersuchten miRNAs konnten 13 miRNAs ausgewertet werden. Bei miR-3168 konnte in beiden Gruppen überwiegend keine Expression gemessen werden. Für die 13 miRNAs zeigten sich in der Expressionsanalyse folgende Verteilung (siehe Tabelle 18):

Die 7 miRNAs miR-140-3p, miR-93-5p, miR-19b-3p, miR-30d-5p, miR-19a-3p, miR-30e-5p und miR-25-3p stellten sich mit der höchsten Signifikanz ($***p < 0,001$) als differentiell exprimiert dar. Weitere 4 miRNAs, miR-29b-3p, let-7i-3p, miR-363-3p und miR-142-5p wiesen eine mittlere Signifikanz ($**p < 0,01$) und lediglich eine miRNA, miR-148b-3p, die geringste Signifikanz ($*p < 0,05$) auf. MiR-141-3p zeigte keine differentielle Expression ($p = 0,616$). Nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur (Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,05$) blieben signifikante Unterschiede bei 12 der 13 miRNAs erhalten.

Bei der Betrachtung der Log_2 Fold change konnten bei allen untersuchten miRNAs eine Verringerung der Expression in der Gruppe mit Frakturen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Die genauen Ergebnisse der einzelnen statistischen Untersuchungen der Expressionsanalysen sind der Tabelle 19 und Tabelle 20 zu entnehmen.

In Abbildung 4 und Abbildung 5 sind im Folgenden die Expressionsunterschiede abgebildet. Hier wurden, wie auch in Abbildung 3 die Fold change jeder einzelnen Probe als einzelne Datenpunkte entlang der y-Achse aufgetragen und so für jede miRNA die Gruppenmittelwerte der Fold changes und die Standardabweichungen der beiden Gruppen verglichen. In der Tabelle 19 und Tabelle 20 sind die, für die jeweils untersuchten miRNAs gültigen und fehlenden Ct-Werte genau aufgeschlüsselt.

Tabelle 18 Expressionsunterschiede bei fast allen untersuchten miRNAs, abgesichert mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur; geringe SD; große Log₂ Fold change-Werte

	Gruppe 1: T2DM ohne Frakturen (Ctrl = Kontrollgruppe)		Gruppe 2: T2DM mit Frakturen (prosp. Fx = Gruppe mit Fraktur)		Signifikanz Exakte Sig. (2- seitig) p-Werte*	Adjustierung des α - Niveaus mit Benjamini- Hochberg-Korrektur (FDR) ^o	Log ₂ Fold change
	geo. Mittel ^b	SD ^a	geo. Mittel ^b	SD ^a			
	miR-140-3p***	1,00	1,60	0,30	0,52	0,000093***	0,00121 ^o
miR-93-5p***	1,00	1,84	0,29	0,63	0,000177***	0,001151 ^o	-1,77208
miR-19b-3p***	1,00	2,16	0,30	0,80	0,000202***	0,00088 ^o	-1,72375
miR-30d-5p***	1,00	1,00	0,43	0,41	0,00050***	0,00163 ^o	-1,20933
miR-19a-3p***	1,00	2,51	0,26	0,98	0,000611***	0,00159 ^o	-1,27289
miR-30e-5p***	1,00	1,75	0,34	0,77	0,000711***	0,00154 ^o	-1,57696
miR-25-3p***	1,00	2,38	0,30	1,01	0,001***	0,00186 ^o	-1,72901
miR-29b-3p**	1,00	2,38	0,25	0,48	0,001061**	0,00172 ^o	-1,57809
let-7i-3p**	1,00	1,34	0,44	0,42	0,001329***	0,00192 ^o	-1,20027
miR-363-3p**	1,00	3,54	0,23	1,08	0,001626***	0,00211 ^o	-2,11674
miR-142-5p**	1,00	1,67	0,32	0,66	0,0050**	0,00591 ^o	-1,63540
miR-148b-3p*	1,00	1,27	0,47	0,58	0,011470*	0,01243 ^o	-1,08761
miR-141-3p	1,00	2,24	0,82	2,17	0,6260	0,62600	-0,50342

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^o Signifikanzniveau α : $p = 0.05$

^a SD = Standard Deviation

^b geo.Mittel (geometrische Mittel) = Fold change

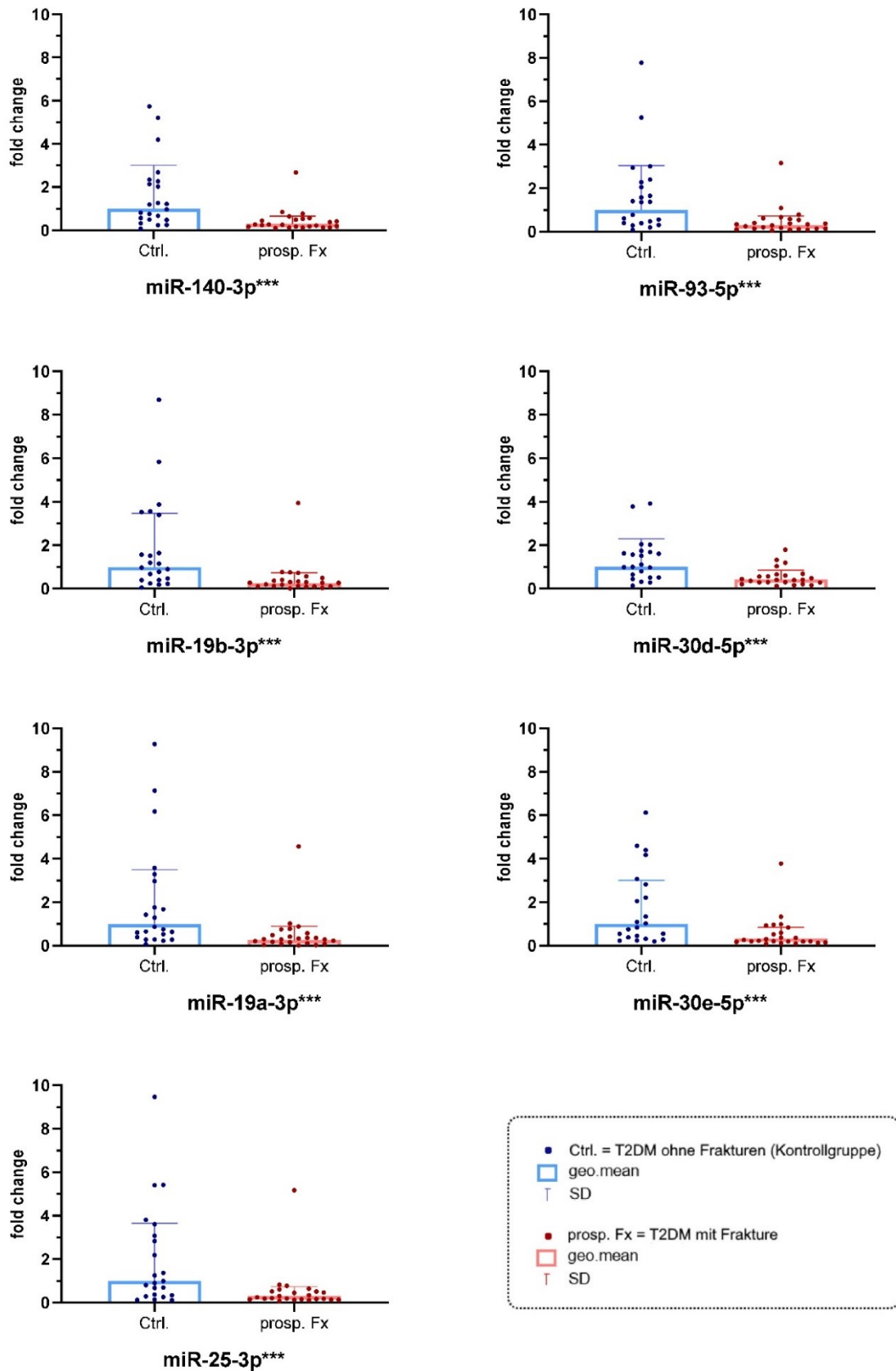


Abbildung 4 Expressionsunterschiede der miRNAs mit den höchsten Signifikanzniveaus
 Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

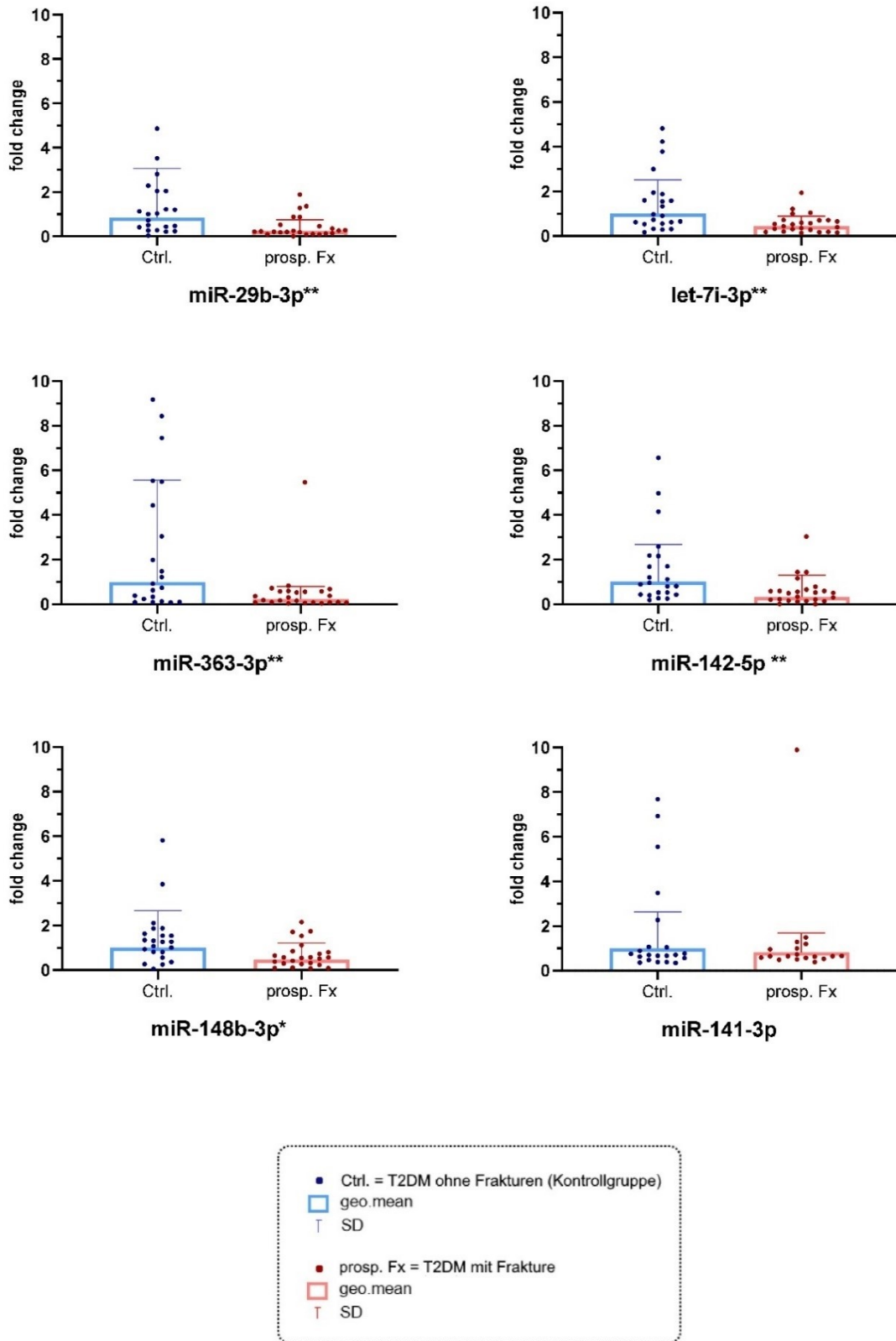


Abbildung 5 Expressionsunterschiede der miRNAs: mittlere, geringste und kein Signifikanzniveau
 Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tabelle 19 Hohe Signifikanzen in der statistischen Untersuchung der Expressionsunterschiede; miRNAs absteigend nach Signifikanzniveaus sortiert

miRNA	Ct-Werte		Normalverteilung ^c			Shapiro-Wilk-Test ^e		Levene-Test		Signifikanz			Signifikanz				
	Gültige Ct-Werte	Fehlende Ct-Werte	Statistik	df	Sig. p-Wert	Statistik	df	Sig. p-Wert	F	Sig. p-Wert	t-Test	Statistik T-Wert	df	Exakte Sig. (2-seitig)	Mann-Whitney-U-Test	Statistik T-Wert	Z
miR-140-3p***	22	0	0,102	22	0,882	0,973	22	0,786	2,145	0,150	4,298	44	0,000094***				
	prosp. Fx [§]	24	0,135	24	0,310	0,936	24	0,130									
miR-93-5p***	22	0	0,154	22	0,191	0,908	22	0,979	1,504	0,227	4,095	44	0,000178***				
	prosp. Fx [§]	24	0,104	24	0,754	0,603	24	0,967									
miR-19b-3p***	22	0	0,110	22	0,746	0,980	22	0,910	0,617	0,436	4,054	44	0,000202***				
	prosp. Fx [§]	24	0,121	24	0,490	0,960	24	0,439									
miR-30d-5p***	22	0	0,148	22	0,839	0,961	22	0,509	0,776	0,383	3,744	44	0,000522***				
	prosp. Fx [§]	24	0,083	24	0,101*	0,979	24	0,885									
miR-19a-3p***	22	0	0,090	22	1,101	0,976	22	0,835	0,211	0,648	3,691	44	0,000612***				
	prosp. Fx [§]	24	0,127	24	0,405	0,965	24	0,544									
miR-30e-5p***	22	0	0,115	22	0,639	0,941	22	0,203	1,388	0,245	3,641	44	0,000711***				
	prosp. Fx [§]	24	0,163	24	0,096	0,928	24	0,089									
miR-25-3p***	22	0	0,108	22	0,781	0,915	22	0,500									
	prosp. Fx [§]	24	0,150	24	0,173	0,849	24	0,015#							120	-3,167	0,001***

Signifikanzniveau α : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

^a Arithmetisches Mittel

^b Standardfehler des Mittelwertes

^c keine Normalverteilung; †; Normalverteilung: =

^d Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

^e bei Signifikanz ($p < 0,05$) ausschlaggebend für Beurteilung der Normalverteilung

^f Varianzgleichheit = =, Varianzungleichheit = †

[§] Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

Tabelle 20 Mittlere Signifikanzen, niedrige Signifikanz, keine Signifikanz in der statistischen Untersuchung der Expressionsunterschiede; miRNAs absteigend nach Signifikanzniveaus sortiert

miRNA	Ct-Werte		Normalverteilung ^c				Shapiro-Wilk-Test ^e			Varianzhomogenität		Signifikanz		Signifikanz				
	Gültige Ct-Werte	Fehlende Ct-Werte	Statistik	df	Sig. p-Wert	Statistik	df	Sig. p-Wert	F	Sig. f p-Wert	Statistik T-Wert	df	Exakte Sig. (2-seitig)	Statistik T-Wert	Z	Exakte Sig. (2-seitig)		
																	Kolmogorov-Smirnov Test ^d	Levene-Test
miR-29b-3p**	Control ^g	22	0,094	22	1,021	0,977	22	0,860	0,821	0,370	3,505	44	0,001061**					
	prosp. Fx ^g	24	0,127	24	0,399	0,957	24	0,374										
let-7i-3p**	Control ^g	22	0,090	22	1,107	0,972	22	0,764	1,738	0,194	3,428	44	0,001329**					
	prosp. Fx ^g	24	0,121	24	0,489	0,967	24	0,604										
miR-363-3p**	Control ^g	22	0,126	22	0,495	0,919	22	0,073	3,996	0,052	3,358	44	0,001626**					
	prosp. Fx ^g	24	0,155	24	0,142	0,931	24	0,103						137	-2,793	0,005**		
miR-142-5p**	Control ^g	22	0,104	22	0,839	0,961	22	0,509										
	prosp. Fx ^g	24	0,163	24	0,101	0,979	24	0,885										
miR-148b-3p*	Control ^g	22	0,189	22	0,059	0,914	22	0,058	0,083	0,774	2,639	44	0,011470*					
	prosp. Fx ^g	24	0,128	24	0,391	0,945	24	0,205										
miR-141-3p	Control ^g	21	0,238	21	0,003 [#]	0,840	21	0,003 [#]										
	prosp. Fx ^g	18	0,232	18	0,012 [#]	0,718	18	0,000 [#]									171	-0,507

Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ a Arithmetisches Mittel

^b Standardfehler des Mittelwertes

^c keine Normalverteilung: [#]; Normalverteilung: =

^d Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

^e bei Signifikanz ($p < 0,05$) ausschlaggebend für Beurteilung der Normalverteilung

^f Varianzgleichheit = =, Varianzungleichheit = [#]

^g Control = T2DM ohne Frakturen (Kontrollgruppe); prosp. Fx = T2DM mit Frakturen

4.3 ROC-Analyse der auswertbaren miRNAs

In der Abbildung 6, Abbildung 7 und der Tabelle 21 sind die einzelnen Ergebnisse der ROC-Analysen, die Werte der jeweiligen Area under the curve (AUC) und die statistischen Signifikanztests der ROC-Kurven für die untersuchten miRNAs abgebildet. Insgesamt besaßen bis auf miR-141-3p alle auswertbaren miRNAs ähnliche AUC-Werte mit einem mittleren AUC-Wert von 0,775 ($SD_{AUC}=0,034$) innerhalb der 12 miRNAs mit statistisch signifikanten, differentiellen Expressionen. Die höchsten AUC-Werte besaßen miR-140-3p***, miR-29b-3p** und miR-19b-3p***. Die niedrigsten Werte konnte bei den miRNAs let-7i-3p**, miR-363-3p**, miR-142-5p ** und miR-148b-3p* beobachtet werden. MiR-141-3p besaß einen zu geringen AUC-Wert, der sich bei einem Signifikanzniveau α von 5% statistisch nicht signifikant von der Diagonalen der ROC-Kurve unterschied.

Für eine bessere Lesbarkeit der ROC-Kurven wurden in den Graphiken in Abbildung 6 und Abbildung 7 nicht mehr als 4 ROC-Kurven pro einzelne Graphik verwendet. Die Aufteilung der miRNAs zu den einzelnen Graphiken erfolgte orientierend an den Signifikanzniveaus hinsichtlich der Expressionsunterschiede, ermittelt in der Expressionsanalyse.

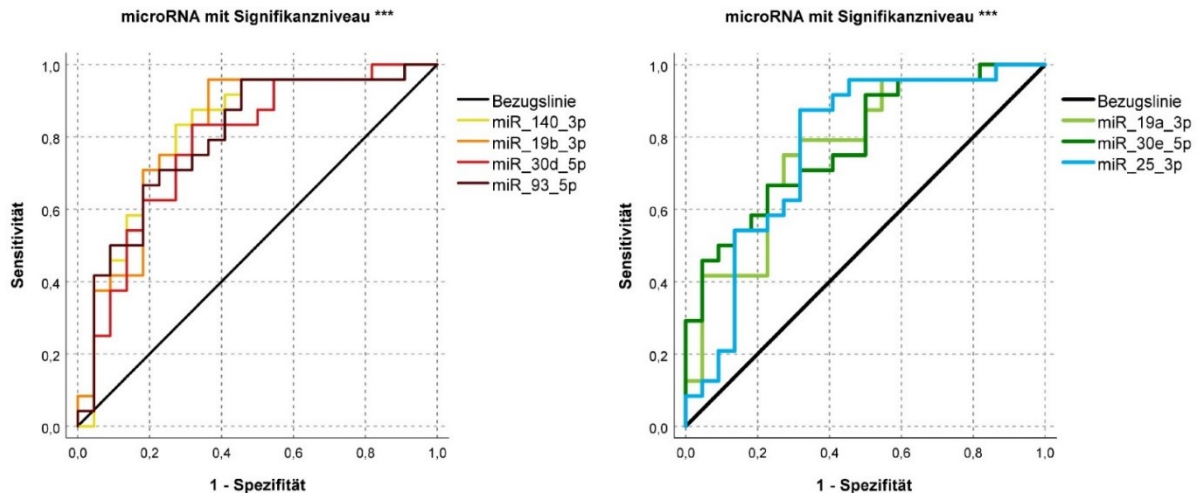


Abbildung 6 ROC-Kurven mit hohen AUC-Werten der herunterregulierten miRNAs mit den höchsten Signifikanzniveaus

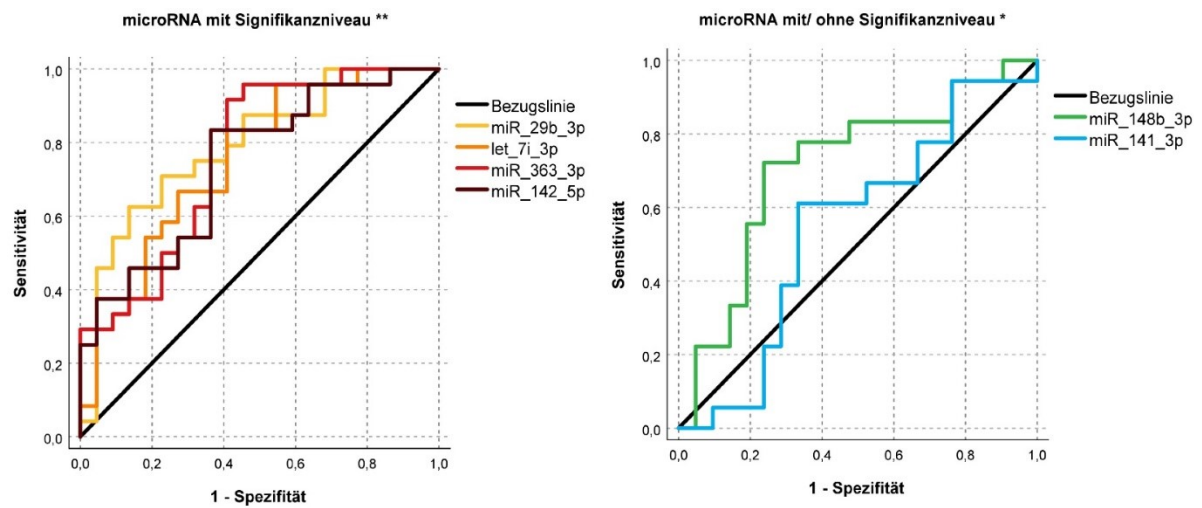


Abbildung 7 Links ROC-Kurven mit hohen AUC-Werten und rechts hohe und niedrige AUC-Wert bei herunterregulierten miRNAs mit mittlerem, niedrigem und keinem Signifikanzniveau

Tabelle 21 Hohe AUC-Werte in ROC-Analyse; lediglich miR-141-3p besitzt einen zu geringen AUC-Wert (Signifikanzniveau >0,05)

miRNA	AUC	Asymptotische Signifikanz ^a (p-Wert)
miR-140-3p***	0,822 (95% CI: 0,70 – 0,95)	0,000
miR-93-5p***	0,797 (95% CI: 0,67 – 0,93)	0,000
miR-19b-3p***	0,811 (95% CI: 0,68 – 0,94)	0,000
miR-30d-5p***	0,780 (95% CI: 0,64 – 0,92)	0,000
miR-19a-3p***	0,771 (95% CI: 0,63 – 0,91)	0,000
miR-30e-5p***	0,784 (95% CI: 0,65 – 0,91)	0,000
miR-25-3p***	0,773 (95% CI: 0,63 – 0,92)	0,000
miR-29b-3p**	0,815 (95% CI: 0,68 – 0,95)	0,000
let-7i-3p**	0,754 (95% CI: 0,60 – 0,91)	0,001
miR-363-3p**	0,754 (95% CI: 0,60 – 0,91)	0,000
miR-142-5p **	0,725 (95% CI: 0,57 – 0,89)	0,001
miR-148b-3p*	0,712 (95% CI: 0,54 – 0,88)	0,014
miR-141-3p	0,548 (95% CI: 0,36 – 0,73)	0,616
Mittlere AUC aller auswertbaren miRNAs	0,757 (SD:0,071)	
Mittlere AUC aller 12 miRNAs mit statistisch signifikanten, differentiellen Expressionen	0,775 (SD:0,034)	

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht, ob und wie aussagekräftig die untersuchten miRNAs beider Gruppen differentiell exprimiert waren. Für eine gute Vergleichbarkeit wurde bei der Auswahl der Studienpopulation auf eine homogene Verteilung zwischen den beiden erstellten Gruppen hinsichtlich der einzelnen Merkmale der Probandinnen geachtet (siehe Unterkapitel 5.3.2).

Die Auswertung der Expressionsanalyse zeigte signifikant unterschiedliche Expressionen der untersuchten miRNAs in der Gruppe mit Frakturen verglichen mit jenen der Kontrollgruppe.

Die untersuchten miRNAs wiesen zudem eine hinlängliche diagnostische Güte bezogen auf ihre diagnostische Verwendbarkeit auf.

Nachfolgend soll die Analyse der Ergebnisse genauer ausgeführt und u.a. hierbei die untersuchten miRNAs in Kontext mit bestehendem Wissen aus der Literatur gebracht werden.

5.1 Studienhypothese 1: Expressionsunterschiede zwischen den beiden Studienpopulationen

5.1.1 Expressionsanalyse

In der ersten Studienhypothese wurde angenommen, dass die untersuchten miRNAs in der Gruppe mit Frakturen im Vergleich zu der Kontrollgruppe differentiell exprimiert sind. Nach Durchführung der Expressionsanalyse zeigten insgesamt 12 der 14 beleuchteten miRNAs statistisch signifikante, differentielle Expressionen zwischen den beiden Gruppen. Somit lässt sich das Ergebnis der Expressionsanalyse wie folgt interpretieren: Eine Unterscheidung der Probandinnen hinsichtlich eines erhöhten Frakturrisikos ist für einen Mindestzeitraum von zwei Jahren (wegen des zweijährigen Beobachtungszeitraums) mit 12 der 14 untersuchten miRNAs möglich.

Nach Analyse der oben beschriebenen Ergebnisse können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

In der Betrachtung der Spike-In Kontrollen konnte bei allen Spike-Ins, die den Probenseren der Gruppe mit Frakturen hinzugefügt worden waren, leicht geringere Expressionen im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Unterschiede waren allerdings nur marginal und statistisch nicht signifikant fassbar. Dementsprechend kann bei der

Betrachtung der Durchführung der Expressionsanalyse davon ausgegangen werden, dass alle untersuchten Proben bezüglich der Probenbehandlung gleichwertig bearbeitet wurden und eine Missinterpretation der Ergebnisse aufgrund einer Ungleichbehandlung während der Expressionsanalyse somit ausgeschlossen werden kann.

Bei den 14 untersuchten miRNAs zeigten sich 13 miRNAs auswertbare Ct-Werte. Bei miR-3168 konnte in beiden Gruppen überwiegend kein Ct-Wert gemessen werden. Dementsprechend fand diese miRNA bei der weiteren Analyse keine Berücksichtigung (siehe Unterkapitel 4.2.1).

Insgesamt konnte bei allen untersuchten miRNAs bei Betrachtung der Log_2 Fold change verminderte Expressionen der miRNAs in den Probenseren der Probandinnen mit Frakturen im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen werden. Die Expressionsunterschiede waren bei über der Hälfte der untersuchten und auswertbaren miRNAs hochsignifikant. Nach Adjustierung des α -Niveaus mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur waren drei miRNAs hochsignifikant, sieben miRNAs wiesen eine mittlere Signifikanz auf. Nach der Bonferroni-Korrektur, konnten immer noch bei zehn der 13 miRNAs bei einem Signifikanzniveau von 5% Expressionsunterschiede statistisch gesichert werden.

Bei der Auswahl der Studienpopulation wurde, wie bereits erwähnt, auf größtmögliche Homogenität zwischen den beiden Gruppen geachtet. Insofern wird die Herunterregulation der miRNAs in der Gruppe mit Frakturen überwiegend nicht von Unterschieden der in Unterkapitel 4.1 und 5.3.2 beschriebenen Merkmale zwischen den beiden Gruppen begründet. Durch das Ausschalten von Unterschieden innerhalb der Merkmale kann eine Einflussnahme unterschiedlich verteilter Merkmale auf das Expressionsverhalten der jeweiligen, untersuchten miRNAs vermieden werden. Das stellt einen wichtigen Aspekt bei der Bewertung der Expressionsunterschiede dar und kann die Aussagekraft der gefundenen Resultate präzisieren. Eine mögliche Beeinflussung des Expressionsverhaltens der miRNAs durch die, bereits oben erwähnten vier unterschiedlich verteilten Merkmale konnte nicht verifiziert werden. Die jeweiligen Verteilungen der vier Merkmale innerhalb der beiden Gruppen waren inhomogen. Außerdem ließ sich kein Muster zwischen den Proben mit herunterregulierten miRNAs, den dazu gehörigen Merkmalen und der Gruppenzugehörigkeit identifizieren. Die vier unterschiedlich verteilten Merkmale betrafen den, am Kalkaneus ermittelten T-Score, den OPG-Wert und die Altersgruppe der 90- bis 100-Jährigen und die gesamten früheren Frakturen (siehe Unterkapitel 4.1).

5.1.2 Aktueller Wissensstand und Literaturvergleich

In der nachfolgenden Tabelle 22 sind die bekannten Funktionen der auswertbaren miRNAs in Bezug auf den Knochenstoffwechsel dargestellt. Für miR-3168 gibt es derzeit noch keine Informationen im Zusammenhang mit Frakturen oder dem Knochenstoffwechsel. Für die weitere Diskussion sind für eine bessere Zuordnung, die hier untersuchten miRNAs entsprechend ihrer statistischen Signifikanz hinsichtlich der Expressionen markiert ($p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)).

Tabelle 22 Auswertbare miRNAs und ihre bekannten Funktionen

MiRNA	① Bekannte Funktion und Korrelationen der miRNA ② Überlegungen und Beobachtungen bezogen auf diese Arbeit
hsa-let-7i-3p**	① Für die miRNA Familie let-7 konnte in vitro mit der gain- und loss-of-function Methode ein Effekt auf die Osteogenese festgestellt werden. Weitere Studien konnten nachweisen, dass let-7 die Expression von AT-Hook 2 (HMGA2) unterdrücken kann. Die genaue Regulation der Osteogenese über let-7 und HMGA2 ist weiterhin unbekannt (77). Bei let-7i-5p konnte eine Assoziation mit der Osteogenese hergestellt werden. Eine Überexpression von let-7i-5p hemmt die Expression von Casein kinase 2-interacting protein-1 (CKIP-1) und stimuliert die Differenzierung von Bone marrow-derived stem/stromal cells (BMSC). CKIP-1 hemmt die Osteogenese. Im Tiermodell konnte dieser Regelmechanismus bestätigt werden (78).
hsa-miR-19a-3p***	① Es konnte eine Herunterregulation der miRNA bei osteoporotischen Frakturen unabhängig vom Alter/ Geschlecht festgestellt werden (79). Hochreguliertes miR-19a-3p hemmt SMAD2 und SMAD4 des TGF- β -Signalwegs (Transforming Growth Factor beta); dabei spielt die TGF- β -Signalübertragung eine Schlüsselrolle bei der zeitlichen und räumlichen Regulierung des Knochenumbaus (38). Während der Knochenresorption durch Osteoklasten wird TGF- β aus Knochenmatrix freigesetzt und aktiviert. Aktives TGF- β rekrutiert

	<p>über den SMAD-Signalweg mesenchymale Stammzellen am Knochenresorptionsort (39).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine Herunterregulation der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar.</p>
hsa-miR-19b-3p***	<p>① Es konnte eine Herunterregulation der miRNA bei osteoporotischen Frakturen unabhängig vom Alter/ Geschlecht festgestellt werden (79). Eine signifikante Überexpression der miRNA in menschlichen, mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) und Vorläuferzellen von Osteoblasten (MC3T3-E1) konnte während der osteogene Differenzierung festgestellt werden (80). Unabhängig von einer Osteoporose-Therapie trat eine höhere Expression der miRNA bei Personen mit vertebrealen Frakturen und niedrigem BMD verglichen mit Personen ohne Fraktur und niedrigem BMD auf (81). MiR-19b-3p wurde im OsteomiR-Test der TAmiRNA GmbH zur Evaluierung der Knochenqualität und zur Berechnung eines Frakturrisiko-Scores eingesetzt (65).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine Herunterregulation der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar. Es besteht ein Unterschied zwischen der in dieser Arbeit gefundenen Herunterregulation der miRNA bei erhöhtem Risiko für nicht-vertebrale Frakturen im Vergleich zur höheren Expression bei vertebrealen Frakturen in der Literaturrecherche.</p>
hsa-miR-25-3p***	<p>① Es konnte eine höhere Expression der miRNA bei Personen mit Osteoporose und Femurfraktur(en) im Vergleich mit Personen ohne Osteoporose und Femurfraktur(en) festgestellt werden (82). Im Tiermodell bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass exosomale miR-25 aus Stammzellen des Knochenmarks (BMSC) die Frakturheilung über die Interaktion SMURF1/ Runx2 (Runx2-related transcription factor-2) fördern kann. MiR-25 inhibiert Smad ubiquitination regulatory factor-1 (SMURF1). SMURF1 hemmt die Expression von Runx2 (83) - Runx2 ist ein Transkriptionsfaktor für</p>

	<p>die Osteoblastendifferenzierung und induziert die Differenzierung von multipotenten Stammzellen in unreifen Osteoblasten (84).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine differentielle Expression der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar.</p>
hsa-miR-29b-3p**	<p>① Es konnte eine Herunterregulation der miRNA bei osteoporotischen Frakturen unabhängig vom Alter/ Geschlecht und eine signifikante Korrelation zu P1NP (N-terminales Propeptid von Typ 1 Prokollagen) festgestellt werden (79). P1NP ist ein Biomarker für die Knochenbildung (85). Eine Herunterregulation der miRNA bei Personen mit Osteoporose und peripheren oder nicht-vertebralen Fragilitätsfrakturen konnte gezeigt werden (86). Es konnte eine mögliche Verbindung der miRNA zu Knochenumbau markern (BTM) wie dem Prokollagen Typ I N-Propeptid (PINP), Osteocalcin oder der knochenspezifischen Alkalische Phosphatase (ALP)), zum Knochenstoffwechsel und zur Knochenheilung gezeigt werden (87). Außerdem wurde diese miRNA im OsteomiR-Test der TAmiRNA GmbH zur Evaluierung der Knochenqualität und Berechnung eines Frakturrisiko-Scores eingesetzt (65).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine Herunterregulation der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar. Allerdings ist die miRNA ebenfalls im Zuge des erhöhten Frakturrisikos herunterreguliert. Dies wirft die Frage auf, ob eine Herunterregulation der miRNA bei erhöhtem Frakturrisiko unabhängig vom Vorliegen einer Osteoporose erfolgen kann?</p>
hsa-miR-30d-5p***	<p>① Für die miRNA Familie miR-30 (miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e) konnte gezeigt werden, dass diese die Osteoblastendifferenzierung durch Suppression von Runx2 hemmen kann (88).</p>
hsa-miR-30e-5p**	<p>① Es konnte eine Herunterregulation der miRNA bei osteoporotischen Frakturen unabhängig vom Alter/ Geschlecht gezeigt werden (79).</p>

	<p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine Herunterregulation der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar.</p>
hsa-miR-93-5p***	<p>① Es konnte eine erhöhte Expression der miRNA im Blutserum, Knochengewebe und in Knochenzellen bei osteoporotischen Patienten, unabhängig vom Geschlecht und mit direkter Korrelation zum BMD festgestellt werden (89). Eine Herunterregulation der miRNA bei osteoporotischen Frakturen konnte unabhängig vom Alter/ Geschlecht beobachtet werden (79).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine differentielle Expression der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar. Zudem sind die beiden gefundenen Ergebnisse aus der Literaturrecherche teilweise widersprüchlich bezüglich der differentiellen Expression der miRNA.</p>
hsa-miR-140-3p***	<p>① Es konnte eine gesteigerte Expression der miRNA bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose gezeigt werden (90). Im Tierexperiment mit Ratten wurde bei verringerter Expression von exosomaler miR-140-3p in BMSC und bei diabetischer Stoffwechsellage eine erniedrigte Knochenregeneration durch fehlende Inhibierung von PLXNB1 (Plexin B1) festgestellt – Semaphorin 4D (Sema4D) kann durch Bindung den Rezeptor PLXNB1 auf Osteoblasten aktivieren, der dadurch die Differenzierung von Osteoblasten und die Knochenbildung hemmt (36). Unter Glukosebelastung konnte eine Herunterregulation der endothelialen miR-140-3p in Endothelzellen (EC) in Mausmodellen und menschlichen EC festgestellt werden (miR-140-3p/FOXK2-Kaskade) (91)</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine differentielle Expression der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar. Im Mausmodell konnte unter Glukosebelastung eine Herunterregulation der zellulären miRNA gezeigt werden. In dieser</p>

	<p>Arbeit besaßen allerdings alle Probandinnen eine diabetische Stoffwechsellage – im Rahmen dieser Arbeit war die Herunterregulation der untersuchten, extrazellulären miRNA unter dieser Stoffwechsellage unbeeinflusst.</p>
hsa-miR-141-3p	<p>① Exosomale miR-141-3p aus Tumorzellen der Prostata sind in der Lage, Osteoblastenaktivität zu fördern und Knochenmetastasen zu induzieren (92). Außerdem wurde diese miRNA im OsteomiR-Test der TAmiRNA GmbH zur Evaluierung der Knochenqualität und für die Berechnung eines Frakturrisiko-Scores eingesetzt (65).</p>
hsa-miR-142-5p**	<p>① Eine Korrelation bei Überexpression der miRNA konnte mit einer aktiven Osteoblastogenese während der Knochenheilungsphase gezeigt werden. Auch konnte eine Förderung der Osteoblastenaktivität und Mineralisierung der Knochenmatrix durch Regulierung des Gens für E3-Ubiquitin-Proteinligase 1 (in vitro) festgestellt werden (93).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: Vor dem Hintergrund der Literaturrecherche stellt sich die Frage, ob die Herunterregulation der miRNA nicht nur mit einem erhöhten Frakturrisiko korreliert, sondern auch auf eine verminderte Osteoblastogenese deuten kann?</p>
hsa-miR-363-3p**	<p>① Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei Patienten mit Osteoporose miR-363-3p hochreguliert war und die Osteoklastogenese dadurch gefördert wurde. MiR-363-3p aktiviert den PI3K/AKT- Signalweg, der auf PTEN – ein Tumorsuppressor – abzielt. MiR-363-3p wurde auch von den AutorInnen der Studie als mögliche Behandlungsmethode für Osteoporose vorgeschlagen (94)(95).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: In dieser Arbeit hatten nur wenige Probandinnen Osteoporose. Eine differentielle Expression der miRNA in dieser Arbeit durch Osteoporose ist dadurch nicht erklärbar.</p>
hsa-miR-148b-3p*	<p>① Eine erhöhte Expression der miRNA stimuliert die Osteogenese (Stimulation von hMSCs im Knochenmark) (96).</p> <p>② <u>Überlegung</u>: Vor dem Hintergrund der Literaturrecherche stellt sich die Frage, ob die Herunterregulation der miRNA nicht nur mit einem</p>

	erhöhten Frakturrisiko korreliert, sondern auch auf eine verminderte Osteoblastogenese deuten kann?
hsa-miR-3168	

Spezifisch für die beiden miRNAs let-7i-3p**, miR-30d-5p*** konnten nach Literaturvergleich keine bekannten Funktionen oder Assoziationen im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel oder Frakturrisiken gefunden werden. Deshalb könnte die in dieser Arbeit gefundene Assoziation mit einem erhöhten Frakturrisiko einen Erkenntnisgewinn darstellen, der im Weiteren durch eine Überprüfung mit einem erweiterten ProbandInnenkollektiv und anderen Merkmalen (vor allem männliche Probanden) abgesichert und erweitert werden müsste.

Im Literaturvergleich konnte eine Herunterregulation der, in dieser Arbeit, statistisch signifikantesten miRNA miR-140-3p*** auch im Mausmodell und in menschlichen Endothelzellen unter Glukosebelastung festgestellt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass miR-140-3p durch Hemmung der FOXK2 einen proangiogenen Effekt besitzt (91). Ob dieser proangiogene Effekt wohlmöglich auch im Knochen einen direkten oder indirekten Einfluss auf den Knochenmetabolismus besitzt, ist nicht geklärt. Für FOXK2 speziell ist eine Funktion im Knochen nicht bekannt. FOXK2 zählt zu den Forkhead-Box-Proteinen, die als Fox-Familie im Jahr 2000 identifiziert worden waren (97). Generell beeinflussen die Forkhead-Box-Proteine die Transkription von Genen und können so aktiv in Stoffwechselprozesse wie der Zellproliferation und Zelldifferenzierung eingreifen. Es sind mittlerweile auch eine Vielzahl von Forkhead-Box-Proteinen im Rahmen des Knochenstoffwechsels bekannt und in der Übersichtsarbeit von Jianxiang Xu et al. zusammen getragen worden (98). So fördert z.B. ein hochreguliertes FOXF1 über den TGF- β -Signalweg die Frakturheilung (99).

In einer weiteren Arbeit konnten Ning Wang et al. im Tiermodell zeigen, dass bei diabetischer Stoffwechsellaage exosomale miR-140-3p aus Knochenstammzellen eine verringerte Expression aufwies. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass exosomale miR-140-3p durch eine gezielte Inhibierung von Plexin B1 über den Regelprozess mit Semaphorin 4D die Osteogenese und die Knochenregeneration verbessern konnte (36).

Diese Beobachtungen sind in Bezug auf diese Arbeit sehr interessant, da die gesamte ausgewählte Studienpopulation an T2DM litt, aber miR-140-3p nur in der Gruppe mit Frakturen herunterreguliert war. Es bleibt also die Frage offen, ob noch weitere Faktoren für

den Regelprozess der Osteogenese zwischen miR-140-3p, Plexin B1 und Semaphorin 4D relevant sind.

Für miR-93-5p^{***} wurde in einer Arbeit von Kelch et al. eine erhöhte Expression im Vergleich zu ProbandInnen ohne Osteoporose festgestellt. MiR-93-5p wurde aus Osteoblasten, Osteoklasten und dem Serum osteoporotischer PatientInnen isoliert. Dieser Expressionsunterschied wurde unabhängig vom Geschlecht und Alter gemessen. Eine mögliche Erklärung für diese erhöhte Expression von miR-93-5p in osteoporotischen ProbandInnen sahen die AutorInnen der Studie darin, dass die Osteoklastogenese durch erhöhte Level von IL-8 stimuliert worden war (89). Diese Überlegung gründete auf den Erkenntnissen, dass zum einen das Zytokin IL-8 die Osteoklastogenese stimuliert (100)(101) und hohe IL-8 Level in osteoporotischen Patienten vorkommen (102), wobei auch der Signalweg über Plexin B1 und Semaphorin 4D genutzt wird (37). Eine weitere Erkenntnis war die Identifizierung einer möglichen Interaktion zwischen IL-8 und miR-93 (103)(104). In einer Wiener Studie der AutorInnen Kocijan et al. konnte eine Herunterregulation der Expression von miR-93-5p bei osteoporotischen StudienteilnehmerInnen mit Frakturen unabhängig vom Geschlecht und Alter feststellen (79). In dieser Studie konnte neben miR-93-5p auch eine signifikante Herunterregulation der miRNAs miR-19a-3p^{***}, miR-19b-3p^{***}, miR-29b-3p^{**} und miR-30e-5p^{***} in der untersuchten, osteoporotischen Studienpopulation, die Fragilitätsfrakturen aufwiesen, nachgewiesen werden. Die Herunterregulation der Expression für jede der fünf miRNAs war vom Alter (vor allem prämenopausal und postmenopausal) und Geschlecht unabhängig.

Demgegenüber konnte in dieser Diplomarbeit nachgewiesen werden, dass miR-93-5p abhängig von einem erhöhten Frakturrisiko und unabhängig vom Vorliegen von Osteoporose herunterreguliert war. Somit stellt sich die Frage, ob eine Herunterregulation von miR-93-5p vom Vorliegen einer Osteoporose, Frakturereignissen oder von anderen Risikofaktoren für Frakturen abhängt.

Für miR-29b-3p^{**} konnte eine Korrelation mit Prokollagen Typ 1 N-terminales Propeptid (P1NP) nachgewiesen werden (79). P1NP ist ein direktes Maß der Osteoblastenaktivität (85) und kann daher als Biomarker für das Monitoring beispielsweise von Knochenverlust bei systemischen Erkrankungen (105), dem Therapieverlauf unter der medikamentösen Behandlung von Osteoporose (106) oder als Biomarker für den Knochenstoffwechsel nach körperlichem Training (87) fungieren.

Wie bereits beschrieben, konnten die AutorInnen Kocijan et al. in ihrer Studie zeigen, dass miR-19a-3p^{***} bei osteoporotischen Frakturereignissen signifikant herunterreguliert war

(79)(86). Demgegenüber können die Ergebnisse der AutorInnen Wa Q et al. gestellt werden, die in ihrer Studie die miR-19a-3p in Zusammenhang mit Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom untersucht hatten. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass hochreguliertes miR-19a-3p durch den TGF- β -Signalweg eine Suppression von Knochenmetastasen induzieren kann (38). Der TGF- β -Signalweg ist im Unterkapitel 1.2.4 genauer erläutert.

Auf der Suche nach Gründen der verlangsamten Heilung von Knochendefekten im Alter (107) fanden die AutorInnen Tu M et al. im Tier- und Zellmodellen heraus, dass hochregulierte miR-142-5p** und miR-140-3p*** mit der aktiven Osteoblastogenese während des Knochenheilungsprozesses korrelierte (93). MiR-142-5p erwies sich als äußerst signifikant und wurde bezüglich des regulatorischen Mechanismus genauer untersucht. In einem Teil der Studie wurde im Zellversuch festgestellt, dass bei hochreguliertem miR-142-5p das Gen WWP1 direkt unterdrückt worden war. In einem nachgeschalteten Bestätigungsversuch konnte bei ausgeschaltetem miR-142-5p durch Antagomir-142-5p erhöhte Proteinlevel des Gens WWP1 (E3-Ubiquitin-Protein-Ligase) nachgewiesen werden. Das Gen WWP1 degradiert die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und JunB (93). RUNX2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und ist damit wichtig für die Knochenbildung (108). Dementsprechend gelang der Nachweis, dass durch hochregulierte miR-142-5 die Osteoblastenaktivität und Knochenmineralisation direkt positiv beeinflusst wird. In einem anderen Teil der Studie wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum im Tiermodell nachgewiesen, dass bei älteren Mäusen im Knochenkallus miR-142-5p niedriger, das WWP1-Level höher und Osteocalcin und RUNX2-Level niedriger waren als im Vergleich zu jüngeren Mäusen. Dies führte zusammenfassend zur Erkenntnis, dass miR-142-5p direkt über die Steuerung des Gens WWP1 die Knochenheilung nach einer Fraktur positiv beeinflussen kann und die Knochenheilung im Alter aufgrund einer geringeren Expression von miR-142-5p langsamer verläuft (93).

Eine Studie der AutorInnen Mollazadeh et al. untersuchte den Einfluss von miR-148b-3p* auf die Osteogenese. Es konnte bei Überexpression der miRNA eine gesteigerte osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in humanen Knochenstammzellen belegt werden. Dieser positive Effekt auf die Osteogenese konnte durch die Differenzierungsmarker der Osteoblasten, die knochenspezifische alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I in der Immunhistochemie und mittels Western Blot gemonitort werden (96). Diese Erkenntnis deckte sich mit den Beobachtungen, dass miR-148b bei der frühen

osteogenen Differenzierung menschlicher, mesenchymaler Stammzellen vermehrt exprimiert war (109). Eine mögliche Erklärung des positiven Effekts von miR-148b-3p auf die Osteogenese wurde in einer direkten Herunterregulation des Gens NOG vermutet (96). Es konnte gezeigt werden, dass miR-148b das Gen NOG gezielt herunterregulieren kann (110). Dessen Genprodukt Noggin, ein extrazelluläres Protein und Komponente des Spemann-Mangold-Organisators, antagonisiert die Aktivität der BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) durch dessen Bindung (111). Folglich hemmt damit Noggin die Osteogenese (112) und die Knochenentwicklung und kann eine schwere Osteoporose bewirken (113).

Dieser positive Effekt auf die Osteogenese durch Überexpression von miR-148b-3p untermauert die in dieser Arbeit gefundene Herunterregulation der miRNA bei Diabetikerinnen mit erhöhtem Frakturrisiko.

5.2 Studienhypothese 2: Diagnostische Güte der untersuchten miRNAs

In der zweiten Studienhypothese wurde angenommen, dass die untersuchten miRNAs bei unterschiedlichem Expressionsverhalten aufgrund einer guten diagnostischen Güte für die Diagnostik verwendbar sind.

Im Nachfolgenden konnte gezeigt werden, dass in der Analyse der diagnostischen Güte bis auf miR-141-3p alle auswertbaren miRNAs akzeptable bis sehr gute AUC-Werte und eine gute diagnostische Güte besaßen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sich, mit Ausnahme von miR-29b-3p** die Rangfolge der Signifikanzniveaus der miRNAs bei der Expressionsanalyse der Reihenfolge der Signifikanztestungen der ROC-Kurven, angegeben mittels p-Wert, ähnelte (siehe Tabelle 21).

Für die Wahl des richtigen Gütemaßes hinsichtlich einer diagnostischen Verwendbarkeit eigneten sich am besten das Maßzahlen-Paar Sensitivität und Spezifität, die AUCs und die pAUCs der ROC-Analyse.

Bei der hypothetischen Überlegung, wie die untersuchten miRNAs in der Diagnostik eingesetzt werden könnten, muss sich die Auswahl der entsprechend geeigneten miRNAs an der Funktion eines miRNA panels im Sinne der Frakturprädiktion orientieren.

Eine solche Funktion stellt die Detektion eines möglichen Frakturrisikos als Screening-Methode dar. Dafür sind idealerweise, eine gleichermaßen hohe Sensitivität, wie auch

Spezifität und damit verbunden wenige falsch-positive und falsch-negative Testergebnisse wünschenswert. In der praktischen Anwendung muss diesbezüglich häufig ein Kompromiss gefunden werden. So sind für eine Screening-Methode nicht-detektierte Endpunkte, in diesem Fall nicht gefundene Frakturrisiken, und somit falsch-negative Ergebnisse schwerer zu tolerieren als im Vergleich falsch-positive Ergebnisse. Dementsprechend kommt der Sensitivität ein höherer Stellenwert zu. Wie bereits erwähnt, ist die Fähigkeit für ein Testsystem nützlich, das Testergebnis während des Screenings gleichzeitig bestätigen oder falsifizieren zu können – dafür ist eine hohe Spezifität und damit möglichst wenige, falsch-negative Ergebnisse erforderlich (114).

Diese Überlegungen konnten wie folgt auf die hier untersuchten miRNAs übertragen werden. Bei der näheren Betrachtung der Sensitivität und Spezifität aller untersuchten miRNAs wurden zwei Ranglisten mit jeweils der höchsten Sensitivität und Spezifität orientierend an den jeweiligen pAUC-Werten erstellt (siehe Tabelle 25 und Tabelle 26). Anschließend wurde resümiert, welche miRNAs als Messparameter durch eine eher höhere Sensitivität, Spezifität oder eine kombinierte Eigenschaft charakterisiert worden waren.

5.2.1 Allgemeine Überlegungen zu der diagnostischen Güte

Tabelle 23 Statistische Kennwerte diagnostischer Tests und deren Berechnungen

Testergebnis (T)	Endpunkt/ krank	Kein Endpunkt/ nicht krank	Summe
T +	a	b	a + b
T -	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	a + b + c + d = n
Begriff			
Begriff	Erläuterung	Berechnung^a	
Sensitivität	Richtig-Positiv-Rate (TPR), Testempfindlichkeit	$TPR = \frac{a}{(a + c)}$	
Spezifität	Richtig-Negativ-Rate (TNR)	$TNR = \frac{d}{(b + d)}$	
1-Spezifität	Falsch-Positiv-Rate (FPR)	$TNR = \frac{b}{(b + d)}$	
Positiver Prädiktiver Wert (PPV)	Positiver Vorhersagewert, Wahrscheinlichkeit bei	$PPV = \frac{TPR \times RE}{(TPR \times PRE + (1 - TNR) \times (1 - PRE))}$ $= \frac{a}{(a + b)}$	

	positivem Testergebnis tatsächlich krank zu sein	
Negativer Prädiktiver Wert (NPV)	Negative Vorhersagewert, Wahrscheinlichkeit bei negativem Testergebnis tatsächlich gesund zu sein	$NPV = \frac{TNR \times (1 - PRE)}{((1 - TPR) \times PRE + TNR \times (1 - PRE))}$ $= \frac{d}{(c + d)}$
Prävalenz (PRE)	Anteil Erkrankter in der Grundgesamtheit (erst bei hohem Stichprobenumfang aussagekräftig)	$PRE = \frac{(a + c)}{n}$

^a Formeln für die Berechnung entnommen aus Sachs, 2006 (115)

Diagnostische Tests messen mit ihrer Sensitivität und Spezifität unterschiedlich gut den zu messenden Endpunkt, wie beispielsweise eine Erkrankung oder ein Frakturrisiko. Die Sensitivität gibt Auskunft über die Höhe der Wahrscheinlichkeit, wie zuverlässig ein tatsächlich bestehender Endpunkt durch das Testsystem als richtig positiv angezeigt wird. Demgegenüber beschreibt die Spezifität die Höhe der Wahrscheinlichkeit, bei einem nicht vorhandenen Endpunkt korrekterweise ein richtig negatives Testergebnis zu erhalten. Sensitivität und Spezifität sind nicht von der Prävalenz, also der Erkrankungswahrscheinlichkeit bzw. Merkmalswahrscheinlichkeit, abhängig. Diese beiden Maßzahlen des Testverfahrens sind von der Erhöhung oder Erniedrigung der Anzahl der getesteten Personen nicht beeinflussbar (116). Zusammen geben diese beiden Maßzahlen somit das diagnostische Leistungsvermögen des Testsystems selbst an, welches dementsprechend unabhängig von der Prävalenz des getesteten Merkmals in der PatientInnenstichprobe ist. Daher eignen sich diese zusammen mit der ROC-Kurve laut der Zulassungsbehörde EMA (Europäische Arzneimittel-Agentur) als Messgrößen bei der Neuzulassung diagnostischer Testverfahren (117).

Daneben lassen sich diagnostische Testverfahren auch mit dem positiven und negativen prädikativen Wert (PPV/ NPV) charakterisieren, die beide als Vorhersagewerte die Aussagekraft medizinischer Testverfahren widerspiegeln können. Der PPV gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine getestete Person nach einem positiven Testresultat auch wirklich „positiv“ ist, also den untersuchten Endpunkt aufweist. Der NPV gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit bei einem negativen Testergebnis die untersuchte Person den getesteten Endpunkt tatsächlich nicht aufweist. Allerdings sind PPV und NPV, anders als

die Sensitivität und Spezifität, von der Prävalenz des Endpunkts abhängig (siehe Tabelle 23). Sie müssen deshalb mit Vorsicht interpretiert werden, da sie künstlich erhöht oder erniedrigt werden können, indem entweder mehr Personen mit dem zu untersuchenden Endpunkt, oder mehr Personen ohne den Endpunkt zu der Gesamtmenge der getesteten Personen hinzugefügt werden. Der Vorteil des PPV und NPV liegt in der Aussagekraft eines individuellen Testergebnisses einer getesteten Person. Somit werden die Maßzahlen PPV und NPV eher im klinischen Alltag eingesetzt, als für die Beurteilung des diagnostischen Leistungsvermögens (116).

Die weitere Analyse hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit bzw. Verwendbarkeit der untersuchten miRNAs kann mit Hilfe der einzelnen ROC-Kurven vollzogen werden, die im Unterkapitel 4.3 mit den dazugehörigen AUCs erläutert worden sind. Anhand der ROC-Kurve kann bei veränderlichem Schwellenwert das resultierende, jeweilige Wertepaar Sensitivität und Spezifität abgelesen werden (116). Die ROC-Kurve wird von den nachstehenden Maßzahlen und Interpretationen charakterisiert:

Tabelle 24 Kennwerte der ROC-Kurve

y-Achse:	Richtig-Positiv-Rate (TPR) entspricht der Sensitivität (118)
x-Achse:	Falsch-Positiv-Rate (FPR) entspricht der 1-Spezifität (118)
AUC/ pAUC:	Werte der AUC können theoretisch Werte zwischen 0,0 und 1,0 annehmen. Allerdings erzeugen Zufallswerte eine Diagonale zwischen 0,0 und 1,0 – die AUC solcher Zufallswerte läge im Idealfall bei 0,5. Somit ist eine AUC von 0,5 de facto der schlechteste Wert im Sinne einer diagnostischen Trennschärfe (118). Ein diagnostischer Test weist erst dann eine verwendbare Trennschärfe auf, wenn sich der Kurvenverlauf statistisch signifikant von der Diagonalen unterscheidet – je stärker, umso größer die AUC und je höher die Trennschärfe. Dabei ist die Fläche der AUC nicht direkt mit der diagnostischen Güte im klinischen Sinne gleichzusetzen. Die diagnostische Güte, ergibt sich stets aus dem Wertepaar bestehend aus Sensitivität und Spezifität. Werden sich schneidende ROC-Kurven miteinander verglichen, ist es sinnvoll, nur gewisse Abschnitte (pAUC) miteinander zu vergleichen, indem entweder die Sensitivität oder Spezifität fixiert und dann der

	jeweilige ROC-Kurvenverlauf und die pAUCs gegenübergestellt werden. (119)
standardisierte pAUC	Die standardisierte pAUC besitzt einen Wertebereich von 0,5 bis 1,0 und ermöglicht somit die Betrachtung der pAUCs wie die der AUCs (76)(120).

5.2.2 Sensitivität, Spezifität, AUC und pAUC

In Unterkapitel 4.3 sind in Tabelle 21 die einzelnen AUC-Werte gesammelt. Dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass bis auf miR-141-3p alle auswertbaren miRNAs akzeptable bis exzellente pAUC-Werte besaßen (121). Diese Werte sind vergleichbar mit AUC-Werten für den Risikorechner FRAX, für den Werte zwischen 0,62 und 0,78 bei postmenopausalen Frauen mit Haupt-Frakturen (major osteoporotic fractures) und AUC-Werte zwischen 0,64 bis 0,88 bei Femurfrakturen bekannt sind (41).

In Tabelle 25 sind die miRNAs nach absteigender $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ und der jeweilig verbundenen Sensitivität $FPR\ 0,4$ bei einer künstlich eingeführten Grenze von 60% Spezifität aufgelistet (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

Die pAUC-Werte lagen dicht beieinander. Die damit verbundenen und abgelesenen Werte für die Sensitivitäten bei einer Falsch-Positiv-Rate von genau 0,4 entsprachen nicht der Reihenfolge der pAUC-Werte, da die ROC-Kurvenverläufe sprunghaft waren.

Tabelle 25 MiRNAs mit $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ bei künstlich eingeführter Grenze von 60% Spezifität (= FPR 0,4); nach pAUC-Werten absteigend sortiert

miRNA ^a	standardisierte $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ ^b	Sensitivität $FPR\ 0,4$ ^c
miR-29b-3p**	0,729° (95% CI: 0,54 – 0,86)	77,62%
miR-19b-3p***	0,726° (95% CI: 0,53 – 0,87)	96,19%
miR-30e-5p***	0,725° (95% CI: 0,59 – 0,85)	70,95%
miR-93-5p***	0,718° (95% CI: 0,53 – 0,86)	79,08%
miR-140-3p***	0,701° (95% CI: 0,51 – 0,85)	87,62%
miR-30d-5p***	0,701° (95% CI: 0,51 – 0,85)	83,34%
miR-19a-3p***	0,696 (95% CI: 0,52 – 0,84)	79,05%
miR-25-3p***	0,668 (95% CI: 0,47 – 0,83)	87,62%
miR-148b-3p*	0,662 (95% CI: 0,47 – 0,82)	77,86%
let-7i-3p**	0,658 (95% CI: 0,50 – 0,81)	73,57%
miR-142-5p **	0,657 (95% CI: 0,51 – 0,79)	83,10%
miR-363-3p**	0,648 (95% CI: 0,50 – 0,80)	83,10%
miR-141-3p	0,531 (95% CI: 0,39 – 0,70)	60,95%

^a Expressionsunterschiede mit Signifikanzniveau α : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

^b pAUC: mögliche Werte zwischen 0,5 bis 1,0

^c Sensitivität abgelesen auf Höhe FPR = 0,4

° Akzeptable pAUC-Werte

In Tabelle 26 wurden die miRNAs nach absteigender $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ und der jeweilig verbundenen Spezifität $TPR\ 0,6$ bei einer künstlichen Grenze von 60% Sensitivität aufgelistet (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Insgesamt waren die $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ -Werte im Vergleich zu den $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ -Werten höher.

In Abbildung 8 und Abbildung 9 wurden die jeweiligen künstlichen Grenzen in den ROC-Kurven eingezeichnet.

Tabelle 26 miRNAs mit absteigender $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ bei künstlich eingeführter Grenze von 60% Sensitivität (= TPR 0,6)

miRNA ^a	standardisierte $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ ^b	Spezifität $TPR\ 0,6$ ^c
miR-140-3p***	0,782° (95% CI: 0,62 – 0,90)	81,60%
miR-19b-3p***	0,776° (95% CI: 0,61 – 0,90)	81,60%
miR-25-3p***	0,744° (95% CI: 0,59 – 0,87)	72,86%
miR-30d-5p***	0,738° (95% CI: 0,58 – 0,87)	81,60%
miR-363-3p**	0,730° (95% CI: 0,59 – 0,85)	69,05%
miR-29b-3p**	0,728° (95% CI: 0,57 – 0,86)	87,14%
miR-19a-3p***	0,718° (95% CI: 0,57 – 0,85)	77,38%
let-7i-3p**	0,707° (95% CI: 0,56 – 0,84)	73,33%
miR-148b-3p*	0,696 (95% CI: 0,53 – 0,84)	76,43%
miR-30e-5p***	0,696 (95% CI: 0,55 – 0,83)	77,38%
miR-142-5p**	0,678 (95% CI: 0,54 – 0,82)	63,33%
miR-93-5p***	0,578 (95% CI: 0,58 – 0,87)	81,60%
miR-141-3p	0,556 (95% CI: 0,42 – 0,71)	67,38%

^a Expressionsunterschiede mit Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^b $pAUC$: mögliche Werte zwischen 0,5 bis 1,0

^c Spezifität abgelesen auf Höhe $TPR = 0,6$

°Akzeptable $pAUC$ -Werte

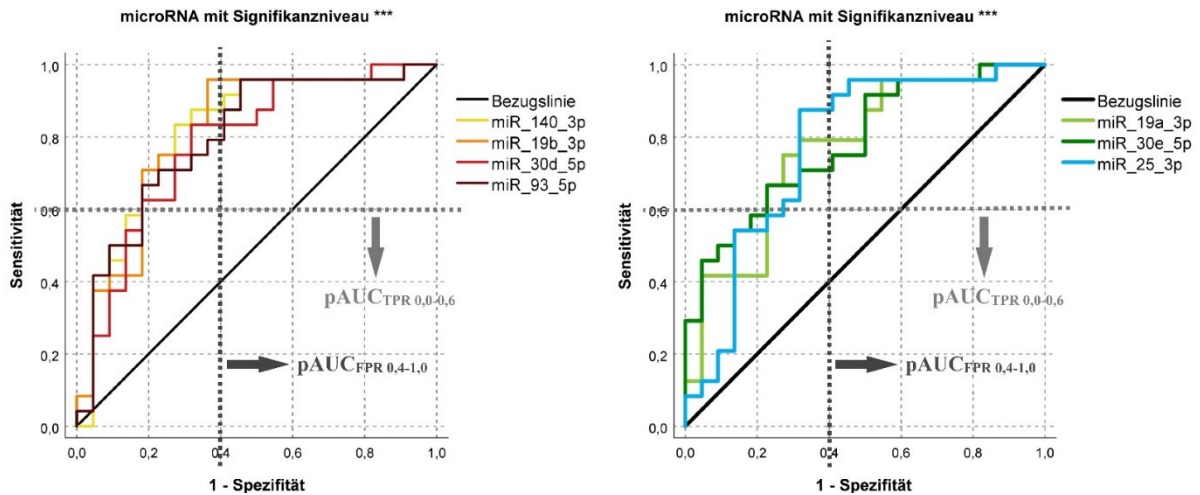


Abbildung 8 ROC-Kurven der miRNAs mit höchstem Signifikanzniveau bezüglich Expressionsunterschieden; eingezeichnete Grenzen für die $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ und $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$

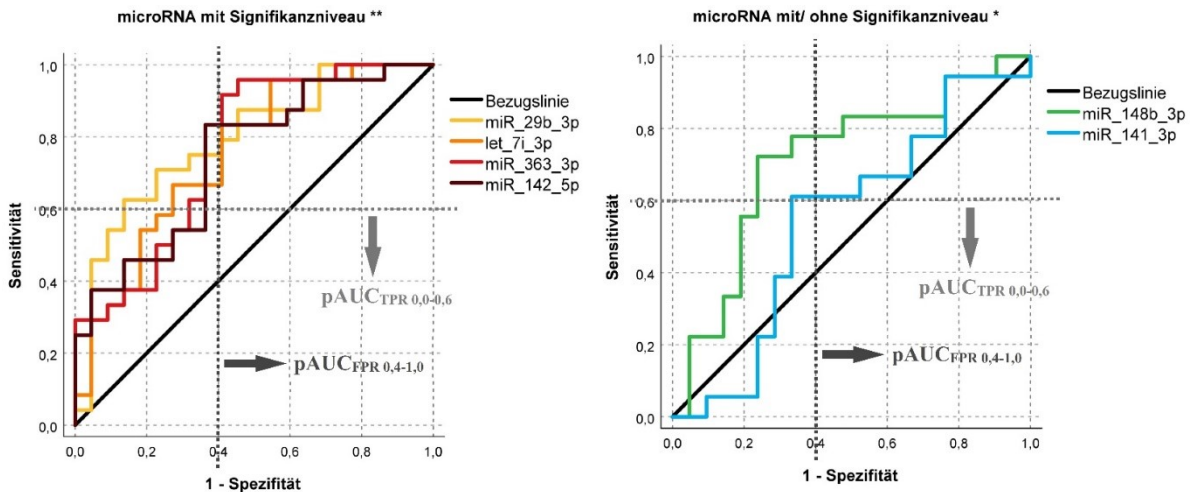


Abbildung 9 ROC-Kurven der miRNAs mit mittlerem/ niedrigem/ keinem Signifikanzniveau bezüglich Expressionsunterschieden; eingezeichnete Grenzen für die $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ und $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$

Zusammenfassend können nach Analyse der $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ und $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ folgende Schlussfolgerungen getroffen werden:

Die höchsten $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ -Werte besaßen die vier miRNAs miR-29b-3p**, miR-19b-3p***, miR-30e-5p*** und miR-93-5p***, wobei miR-29b-3p** und miR-19b-3p*** auch mit die höchsten $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ -Werte und eine hohe abgelesene Sensitivität und Spezifität zeigten.

Demgegenüber lagen bei den beiden miRNAs miR-30e-5p*** und miR-93-5p*** eher einseitig hohe $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ -Werte vor. Alle vier genannten miRNAs, miR-19b-3p***,

miR-29b-3p**, miR-30e-5p*** und miR-93-5p***, wiesen bereits in einer anderen Studie hervorragende AUC-Werte auf (79).

Die höchsten $pAUC_{TPR\ 0,0-0,6}$ -Wert konnte bei miR-140-3p*** und miR-19b-3p*** beobachtet werden. Bei miR-140-3p*** lagen ebenfalls ein guter $pAUC_{FPR\ 0,4-1,0}$ -Wert und jeweils eine gute, abgelesene Sensitivität und Spezifität vor. Dennoch war diese miRNA eher durch eine leicht einseitig gute Spezifität charakterisiert.

Für eine theoretische Zusammenstellung eines miRNA panels könnten somit als sensitive Biomarker miR-29b-3p**, miR-19b-3p***, miR-30e-5p*** und miR-93-5p*** und als spezifische Marker miR-140-3p***, miR-25-3p*** und miR-30d-5p*** herangezogen werden. Allerdings ist weitere Forschungsarbeit für eine Absicherung der Resultate notwendig (siehe Kapitel 7).

5.3 Limitationen und Stärken

5.3.1 Limitationen

Die wichtigste Limitation dieser Arbeit ist die geringe Fallzahl. Wie bereits in Unterkapitel 3.1.3 erläutert, wurde diese Arbeit als Pilotstudie konzipiert und dementsprechend eine kleine Fallzahl gewählt. Sie äußert sich in einer reduzierten Testtrennschärfe (Testpower) der statistischen Testverfahren. Die mit der Software G.Power (122)(123) ermittelten Testtrennschärfen, die als Post-hoc-Test in der Testpower-Analyse berechnet worden sind, können Tabelle 27 entnommen werden. Die Testpower sollte bei einem Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,05$ und einer mittleren Populationseffektstärke von $d_{\text{Cohen}} = 0,50$ optimalerweise $1-\beta \geq 0,80$ aufweisen (124), die allerdings in dieser Arbeit nicht erreicht worden war. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Trennschärfe erhöht werden kann, indem beispielsweise die Fallzahl erhöht oder das Signifikanzniveau α vergrößert wird.

Tabelle 27 mit G.Power (Version: 3.1.9.7) berechnete Testpower

Testart (Test auf stat. Signifikanz)	Df ^d	Testpower (1- β) ^e
t-Test ^a	44	0,38* / 0,17** / 0,04***
Mann-Whitney-U-Test ^a		0,37* / 0,16** / 0,04***
Chi-Quadrat-Test ^b	45	0,53* / 0,32** / 0,14***
Exakter Fisher-Test ^c		0,08* / 0,02** / 0,003***

^a zweiseitiger Test für Mittelwertsvergleich zw. zwei unabhängigen Stichproben; Effektstärke: $d_{\text{Cohen}} = 0,50$; Größe Gruppe 1 $n = 22$; Größe Gruppe 2 $n = 24$

^b zweiseitiger Chi-Quadrat-Test auf Varianzhomogenität; Ratio $\text{var1} / \text{var0} = 1,5$; Größe Gesamtpopulation $n = 46$

^c zweiseitiger Exakter Fisher-Test Ungleichheit zw. zwei unabhängigen Stichproben; Proportion $p1 = 0,5$, Proportion $p1 = 0,6$; Größe Gruppe 1 $n = 22$; Größe Gruppe 2 $n = 24$

^d Freiheitsgrade

^e Power bei Signifikanzniveau α : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Eine weitere Limitation ist die eingeschränkte Aussagekraft der Resultate aufgrund der einseitigen Studienpopulation. Diese Einseitigkeit, also die fehlende Betrachtung männlicher Probanden und das Fehlen einer weiteren Kontrollgruppe ohne T2DM, wurde allerdings bewusst in Kauf genommen, da somit das Augenmerk bei der kleinen Fallzahl auf eine, sonst überwiegend homogene Merkmalsverteilung innerhalb der Studienpopulation gelegt werden konnte.

Eine weitere wichtige Limitation stellt die in dieser Arbeit verwendete Kontrollmethode dar, da sie in hohem Maß die Reproduzierbarkeit der Expressionsanalyse bestimmt (125). Die in dieser Arbeit verwendeten exogenen Kontrollen monitoren lediglich die Probenbehandlung während der Experimente, nicht aber die Qualität der Proben selbst (126). Eine Minderung der Qualität der Proben dürfte sich allerdings nach optischer Kontrolle in der Qualitätskontrolle bei der Auswahl der Probenseren (siehe Unterkapitel 3.2.1.2) in Grenzen gehalten haben. Darüber hinaus haben sich miRNAs als stabile, klinische Biomarker erwiesen (67)(68)(32). Eine Normalisierung der Daten mittels der „global mean“-Methode oder der „Quantile normalization“-Methode wäre wegen der vergleichsweise geringen Anzahl an untersuchten miRNAs nicht möglich gewesen (127)(128). Im Gegensatz zur Betrachtung von zellulärer RNA war bei den hier untersuchten, zellfreien und frei im Blutplasma zirkulierenden miRNAs die Einführung von endogenen Kontrollen in Form von Housekeeping-Genen als mehr oder wenig stabile Referenzgene bei der relativen Genexpressionsanalyse ebenfalls nicht möglich gewesen. Mehr oder wenig stabil meint, dass Housekeeping-Gene nicht jederzeit und ubiquitär im biologischen System stabil vorliegen müssen und selbst u.a. durch pathologische Stoffwechselprozesse im Zellzyklen beeinflusst werden können (129)(130)(131).

5.3.2 Stärken

Die wichtigste Stärke dieser Arbeit lag in der Nutzung der detailreichen Merkmalsdaten (Baseline Charakteristika, Vorerkrankungen, verschriebene Medikation, Laborwerte, Parameter der QUS) der SOS-Hip Kohorte und deren Konzeption als prospektive Kohortenstudie hinsichtlich prospektiver Frakturen.

Es konnte bei der Zusammenstellung der beiden Studiengruppen für diese Arbeit eine homogene Verteilung der Merkmale zwischen den beiden Studiengruppen durch die Selektion der Probenseren im Rahmen der Probenauswahl erreicht werden. Somit war eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den beiden Studiengruppen in dieser Arbeit möglich.

Im Weiteren soll gesondert auf die unterschiedlichen Merkmale, die Baseline Charakteristika, die Vorerkrankungen, die verschriebenen Medikationen, Laborwerte und Parameter der QUS eingegangen und die jeweiligen Merkmale mit dem Wissen aus der Literatur verknüpft werden.

Zusammenfassend kann resümiert werden, dass mit Ausnahme der vier Unterschiede bei der Merkmalsverteilung zwischen den beiden Studiengruppen - die Verteilung in der

Altersfraktion der 90- bis 100-Jährigen, die gesamten früheren Frakturen, dem Laborparameter OPG und dem, am Kalkaneus ermittelten T-Score - jene Merkmale mit einer gleichen Verteilung zwischen den beiden Studiengruppen im gleichen Maß die Knochenqualität im zweijährigen Beobachtungszeitraum beeinträchtigt hatten und somit auch nicht verantwortlich für die Herunterregulationen der miRNAs in der Gruppe mit Frakturen waren.

5.3.2.1 Baseline Charakteristika

Innerhalb der gesamten Baseline Charakteristika (siehe Tabelle 8 in Unterkapitel 4.1.1) zeigten sich Differenzen zwischen den beiden Gruppen bei der Altersfraktion der 90- bis 100-Jährigen. In dieser Altersfraktion gab es mehr Probandinnen in der Gruppe mit Frakturen als in der Kontrollgruppe. Für diese Probandinnen könnte ein erhöhtes Frakturrisiko während des Beobachtungszeitraums erwartet werden, wenn bedacht wird, dass mit steigendem Alter und unabhängig von der Knochendichte das Frakturrisiko ansteigt (132). Eine weitere Inhomogenität zwischen den beiden Studiengruppen zeigte sich bei den gesamten früheren Frakturen, nicht jedoch bei der einzelnen Betrachtung der früheren Frakturen am Femur sowie Radius und der anderen, nicht-vertebralen Frakturen. Die Betrachtung dieser Merkmale war deshalb so wichtig, weil frühere Frakturen mit einem erhöhten, zukünftigen Frakturrisiko assoziiert sind (135). Dementsprechend trägt auch FRAX in seinem Algorithmus für die Berechnung des Frakturrisikos Rechnung (46). Ein gesteigertes Frakturrisiko bei vorangegangenen Frakturen ist allen voran einem erniedrigten BMD geschuldet. Dies haben Studien gezeigt, die das Frakturrisiko in Abhängigkeit zum BMD untersucht hatten (134). Auf die Verteilung des BMD in der Studienpopulation wird weiter unten im Unterkapitel 5.3.2.3 eingegangen.

Neben der gesamten Altersverteilung und den früheren Frakturen war insbesondere keine Unterkategorie des Mobility scores zwischen den beiden Gruppen unterschiedlich verteilt. Der Mobility score ist wie die Altersverteilung ein relevanter Parameter, da er bezogen auf jeden einzelnen Mobility score-Wert individuell mit einer unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung bei Stürzen und damit bei Frakturereignissen verbunden ist. Generell folgt die Sturzhäufigkeit nicht linear einer steigenden Immobilität bzw. einem höheren Mobility score. Personen mit einer mittleren Bewegungseinschränkung bzw. einem mittleren Mobility score zeigen das höchste Sturzrisiko (133). Deshalb war es wichtig, dass explizit jede Unterkategorie des Mobility scores, also jeder Mobility score-Wert, zwischen

den beiden Gruppen zu Beginn des Beobachtungszeitraums gleich verteilt sein sollte, um die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Studiengruppen zu erhöhen. Das wird umso mehr deutlich, da der Mobility score für die Entstehung von Frakturen ein Schlüsselparameter darstellt, da Stürze die häufigste Ursache für Frakturen überhaupt sind (44).

Eine weitere Gleichverteilung zwischen den beiden Gruppen konnte in sämtlichen Untergruppen des BMI gefunden werden. Zu bedenken war, dass eine Reduktion des BMI mit einem erniedrigten BMD assoziiert war (134) und das Frakturrisiko steigerte – konkret: Je eine Einheit des BMI wird das Frakturrisiko am Femur um 6% erhöht (66).

5.3.2.2 Vorerkrankungen und verschriebene Medikationen

Alle Probandinnen beider Gruppen waren sowohl bezüglich der Vorerkrankungen als auch hinsichtlich der Medikationen gleich verteilt (siehe Unterkapitel 4.1.2). Wichtig war die Berücksichtigung der Verteilung der Vorerkrankungen und der verordneten Medikamente vor allem hinsichtlich des Sturzrisikos, da Stürze, wie bereits erwähnt, sich als die häufigste Ursache für Frakturen darstellen. Eine gleiche Verteilung dieser Merkmale zwischen den beiden Studiengruppen in dieser Arbeit zu Beginn des Beobachtungszeitraums war also wichtig, da diese Merkmale über die Beeinflussung des Sturzrisikos Frakturereignisse vermindern oder begünstigen können. Allerdings können keine Risikofaktoren hervorgehoben werden, die hauptsächlich für Stürze verantwortlich gemacht werden können. Vielmehr resultiert ein erhöhtes Sturzrisiko aus einem Konglomerat aus intrinsischen Faktoren, wie Alter, Erkrankungen und Komorbiditäten und extrinsischen Risikofaktoren, wie Medikation oder der Umgebungsbeschaffenheit (136)(137).

Bei der Betrachtung der hier aufgeführten Vorerkrankungen hätte das Sturzrisiko durch jene Erkrankungen erhöht werden können, die das Sehvermögen affektierten. Weitere wichtige Vorerkrankungen diesbezüglich waren kardiovaskuläre Vorerkrankungen (138) und psychische Erkrankungen wie eine Parkinson-Krankheit (139) oder Depression (140).

Osteoporose erhöht als Erkrankung nicht das Sturzrisiko, dafür aber das Frakturrisiko im Rahmen von Fragilitätsfrakturen. Osteoporose wurde innerhalb der insgesamt 46 Probandinnen bei nur fünf Probandinnen diagnostiziert und war damit nicht häufig vertreten. Bei den Medikationen standen insbesondere Medikamentengruppen im Fokus, die mit ihrer Haupt- und Nebenwirkung Stürze hätten provozieren oder zumindest begünstigen können. So musste beispielsweise die Einnahme von kreislaufbeeinflussenden Medikamenten und solche, die die Gerinnung beeinflussen, bedacht werden. Diese beiden

Medikamentengruppen wurden in einer, von der österreichischen Sozialversicherung in Auftrag gegebenen Studie über die Epidemiologie von Frakturen hervorgehoben. In dieser Studie wurde resümiert, dass Personen mit einer Frakturdiagnose diese häufiger einnahmen, als Personen ohne Frakturen (5)(6). Medikamente, die den Knochenstoffwechsel direkt beeinflussten (141), allen voran Bisphosphonate, Denosumab, Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren aber auch Glukokortikoide wurden in der ausgewählten Studienpopulation mit Ausnahme einer Probandin (Methylprednisolon) nicht eingenommen. Supplementation mit Vitamin D und/ oder Kalziumpräparaten nahmen lediglich jene Probandinnen mit einer diagnostizierten Osteoporose ein.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass bei der Erfassung der Medikationen die einzelnen Medikamentendosen und die tägliche Einnahme der verschriebenen Medikamente zum Teil unbekannt und deshalb ein quantitativer Vergleich bezüglich der Menge der Medikamenteneinnahme zwischen den Gruppen hier nur eingeschränkt möglich war.

5.3.2.3 Laborwerte und Parameter der QUS

Unterschiede zwischen beiden Gruppen lagen nur beim Laborparameter OPG und beim, am Fersenbein gemessene T-Score vor (siehe Unterkapitel 4.1.3).

Das OPG war in der Kontrollgruppe höher als in der Gruppe mit Frakturen. OPG ist für eine Hemmung der Osteoklastogenese durch Blockade der Bindung von RANKL an RANK verantwortlich (142) und kann die Knochendichte beeinflussen (143).

Bei der Betrachtung der Laborparameter zeigte sich analog zur Verteilung der Vorerkrankungen keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den, im Alter typischen Organschäden in der Niere und der Leber. Organschäden in diesen beiden Organen können das Frakturrisiko steigern. So weisen Personen mit chronischer Nierenerkrankung ein höheres Frakturrisiko auf, auch wenn der Hauptfaktor einer eingeschränkten Knochenstabilität wegen der vielen Einflussfaktoren unklar bleibt (144). Konkret zeigten Studien, dass Personen mit chronischer Nierenerkrankung und einer verminderten eGFR unter $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ein anderthalb bis zweifach höheres Risiko für Femurfrakturen besaßen als Personen ohne chronische Nierenerkrankung (145)(146). Bei Personen mit chronischer Lebererkrankung kann das Frakturrisiko durch das Entstehen einer Osteoporose erhöht werden. So wurden häufiger Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoporose bei Personen mit chronischer Lebererkrankung gefunden. Zu diesen Risikofaktoren gehören Hypogonadismus, ein übermäßiger Alkoholkonsum, schlechte Ernährung und die Einnahme

von Glukokortikoiden (147). Der Umstand des gemeinsamen Auftretens von chronische Lebererkrankung und einer metabolischen Knochenerkrankung, wie der Osteoporose oder seltener der Osteomalazie, wird unter der Bezeichnung der hepatischen Osteodystrophie/ Osteopathie gefasst (148).

6 Klinische Implikation

Für die Erörterung der klinischen Bedeutsamkeit von zirkulierenden miRNAs für die Frakturprädiktion werden in einem ersten Unterpunkt die Stärken und Schwächen der bestehenden Möglichkeiten zur Erfassung des Frakturrisikos diskutiert. In einem zweiten Unterpunkt soll der klinische Nutzen der miRNAs in der Abschätzung von Frakturrisiken und dazu der aktuelle Forschungsstand beleuchtet werden.

6.1 Bestehende Möglichkeiten für die Ermittlung von Frakturrisiken

Einer der wichtigsten Möglichkeiten zur Ermittlung des Frakturrisikos ist die Messung der Knochendichte mittels DXA, mit der primär die Diagnose einer Osteoporose nach den Richtlinien der WHO erfolgen kann. Allerdings besitzt die Knochendichtemessung bezogen auf die Beurteilung des Frakturrisikos bei einer hohen Spezifität nur eine geringe Sensitivität. Zudem ist das individuelle Risiko für Frakturen von vielen weiteren Risikofaktoren abhängig (45).

Eine weitere, wichtige Möglichkeit der Ermittlung des Frakturrisikos sind die algorithmusbasierten Risikoberechnungen – allen voran der von der WHO empfohlene, fragenbasierte Algorithmus FRAX. Dieser berechnet das 10-Jahres-Risiko für Hüft- und schwere osteoporotische Frakturen unter Berücksichtigung von Alter (zwischen 40 bis 90 Jahre), Geschlecht, Gewicht, Körpergröße und weiteren Risikofaktoren wie Nikotinkonsum oder der Einnahme von Glukokortikoiden (46). Ausgangspunkt für die Berechnung des Individualrisikos ist die kalibrierte Hazard-Funktion, die an jenem Land ausgerichtet wird, in dem die Risikoberechnung erfolgt. Die Hazard-Funktion selber wurde auf Datengrundlage vieler Kohortenstudien aus unterschiedlichen Länder ermittelt (149). Ein wesentlicher Vorteil der Algorithmus-basierten Berechnung des Frakturrisikos ist die einfache Abfrage von Risikofaktoren und damit die Berechnung eines individuellen Frakturrisikos. Mit einfließen in die Berechnung des Frakturrisikos kann auch die Knochendichtemessung (BMD) mittels DXA (46). Eine kombinierte Nutzung aus BMD und der Risikoberechnung mit FRAX wird empfohlen (150). Es sei angemerkt, dass ohne vorhandene BMD die Spezifität der fragenbasierten Risikoberechnung mit FRAX geringer ausfällt (60)(151).

Generell muss die Nutzung von Risikorechnern wie FRAX oder den nicht länderspezifischen Risikomodellen QFracture (152) oder das DVO-Risikomodell (45) stets kritisch erfolgen (153), welche die Grundlage für weiterführende Diagnoseverfahren oder die Einleitung von medikamentösen Präventivmaßnahmen bezüglich Osteoporose sein können (vgl. aktuelle Leitlinie zur Osteoporose der Österreichische Gesellschaft für Knochen- und Mineralstoffwechsel (ÖGKM) (45)). Ein Nachteil bei fragenbasierten Risikorechnern wie FRAX oder QFracture ist beispielsweise die Konzeption der Datenabfrage mit ihren größtenteils dichotom angelegten Fragen (153). Dies lässt bei der Einnahme von Glukokortikoiden z.B. außer Acht, dass die Dosis und die Dauer der Einnahme das Risiko an Osteoporose zu erkranken maßgeblich verändert (154). So wertet FRAX eine Einnahme von Glukokortikoiden lediglich ab einer gewissen Schwelle für die Risikoabschätzung (>3 monatige Einnahme einer Dosis von mindestens 5mg Prednisolon) (46).

Ein weiterer Nachteil bei FRAX ist eine fehlende individuelle und ethniespezifische Adjustierung der Risikoberechnung. Zwar werden den einzelnen Ländern mit ihren jeweiligen Bevölkerungszusammensetzungen durch eine Länderauswahl Rechnung getragen und die Berechnung der Hazard-Funktion dementsprechend kalibriert. Dagegen kann sich dies bei der individuellen Berechnung des Frakturrisikos auch als nachteilig erweisen. So müssen beispielsweise in Österreich für Patientinnen und Patienten mit Migrationshintergrund z.B. aus anderen europäischen Staaten korrekterweise eine spezifische Länderauswahl getroffen werden (153). Dies kann sich bereits jetzt schon vor dem Hintergrund der erhöhten Mobilität innerhalb der europäischen Staaten als ein Problem bei der länderspezifischen Risikoberechnung darstellen.

Bei QFracture gibt es keine länderindividuelle Adjustierung, sondern nur eine für die britische Bevölkerung. Dementsprechend wird die Nutzung nur für das britische Staatsgebiet empfohlen (152). Das DVO Risikomodell trägt der länderspezifischen Adjustierung ebenfalls keine Rechnung.

Ein weiterer Nachteil bei FRAX könnte die mangelnde Risikobewertung bei älteren Personen mit T2DM, wie die hier in dieser Arbeit untersuchte Studienpopulation sein. Die Erkrankung T2DM stellt sich unabhängig von der Knochendichte als ein Risikofaktor für Frakturen bei älteren Personen dar. Interessanterweise zeigt sich bei T2DM eine erhöhte, mit DXA gemessene Knochendichte. So kann FRAX das Frakturrisiko bei Personen mit T2DM unterschätzen. Das könnte dazu führen, dass zukünftig die Diagnose T2DM als ein weiterer, unabhängiger Risikofaktor für Frakturen bei FRAX hinzugefügt wird (155)(63).

Bezogen auf die Altersgrenze von 90 Jahren bei FRAX und QFracture ergibt sich ein weiterer Nachteil bei der Risikoberechnung – hier wird das kurzfristige Frakturrisiko unterschätzt. Dies betrifft vor allem Bewohnerinnen und Bewohner von Pflegeheimen (156).

6.2 MiRNAs als Frakturprädiktoren

Die in dieser Arbeit an der ausgewählten Studienpopulation untersuchten miRNAs müssen selbstverständlich noch weiter erforscht werden, um als Biomarker für die Früherkennung von Frakturen fungieren zu können. Um allerdings den Nutzen von miRNAs als Biomarker hervorzuheben, soll das Potential des Einsatzes von miRNAs als Frakturprädiktoren herausgestellt werden.

Für die Nutzung der miRNA als Biomarker für die Früherkennung von prospektiven Frakturen ergeben sich sowohl Vorteile als auch Nachteile gegenüber anderen, bestehenden Verfahren (siehe Abbildung 10).

Ein Vorteil des Einsatzes von miRNAs liegt zum einen in der einfachen und kostengünstigen Anwendung, verglichen mit der aufwändigen Messung der Knochendichte mittels DXA. So kann die Risikoanalyse vor allem in der hausärztlichen Versorgung in peripheren Gebieten mit Hilfe einfacher Blutentnahmen erfolgen, da miRNA sich als stabile Blutparameter erwiesen haben.

Ein möglicher weiterer, wichtiger Vorteil bei der Nutzung von miRNAs als Frakturprädiktoren ist das Potential, Kosten bei der Risikoabschätzung für Frakturen einzusparen und gleichzeitig die Qualität der Risikoberechnung zu heben. So untersuchte eine österreichische Studiengruppe um Walter et al. die bereits bestehende Screening-Methode OsteomiR-Test (8). Der OsteomiR-Test der TAmiRNA GmbH aus Wien besteht aus einem Panel mit 19 miRNAs, mittels dem aus Blutserum die Knochenqualität evaluiert und die Berechnung eines Frakturrisiko-Scores möglich ist. Der Frakturrisiko-Score basiert auf einem multivariaten miRNA-Modell (65). Die AutorInnen der Studie verglichen die folgenden Endpunkte bei postmenopausalen Frauen über 50 Lebensjahren in Österreich: die Kosteneffektivität des Screeningtools; die Qualität der Frakturüberwachung und die daraus resultierenden Behandlungsentscheidungen mittels DXA und der Risikoberechnungen mittels FRAX. Sie schlussfolgerten, dass bezogen auf die Bewertung und Überwachung des Frakturrisikos durch die Nutzung des OsteomiR-Tests die Frakturhäufigkeit im Vergleich zur alleinigen Nutzung von DXA oder der Risikoberechnungen mittels FRAX reduzieren

werden konnte. Hinsichtlich der Kosten stellte der OsteomiR-Test eine kosteneffiziente Alternative zu FRAX dar (8).

In einer prospektiven Pilotstudie der AutorInnen Ladang et al. wurde die Leistungsfähigkeit des OsteomiR-Tests untersucht. Hier wurden 17 Personen mit Frakturen im Beobachtungszeitraum von drei Jahren mit 16 Personen ohne Frakturen im selben Beobachtungszeitraum verglichen. Die AutorInnen fanden, dass der OsteomiR-Test mehr Frakturereignisse prognostizieren konnte als FRAX mit dem empfohlenen "Need-to-treat"-Schwellenwert. Dementsprechend resümierten die AutorInnen, dass das miRNA panel im Vergleich zu FRAX einen zusätzlichen Nutzen für die Risikovorhersage von Frakturen haben kann (157).

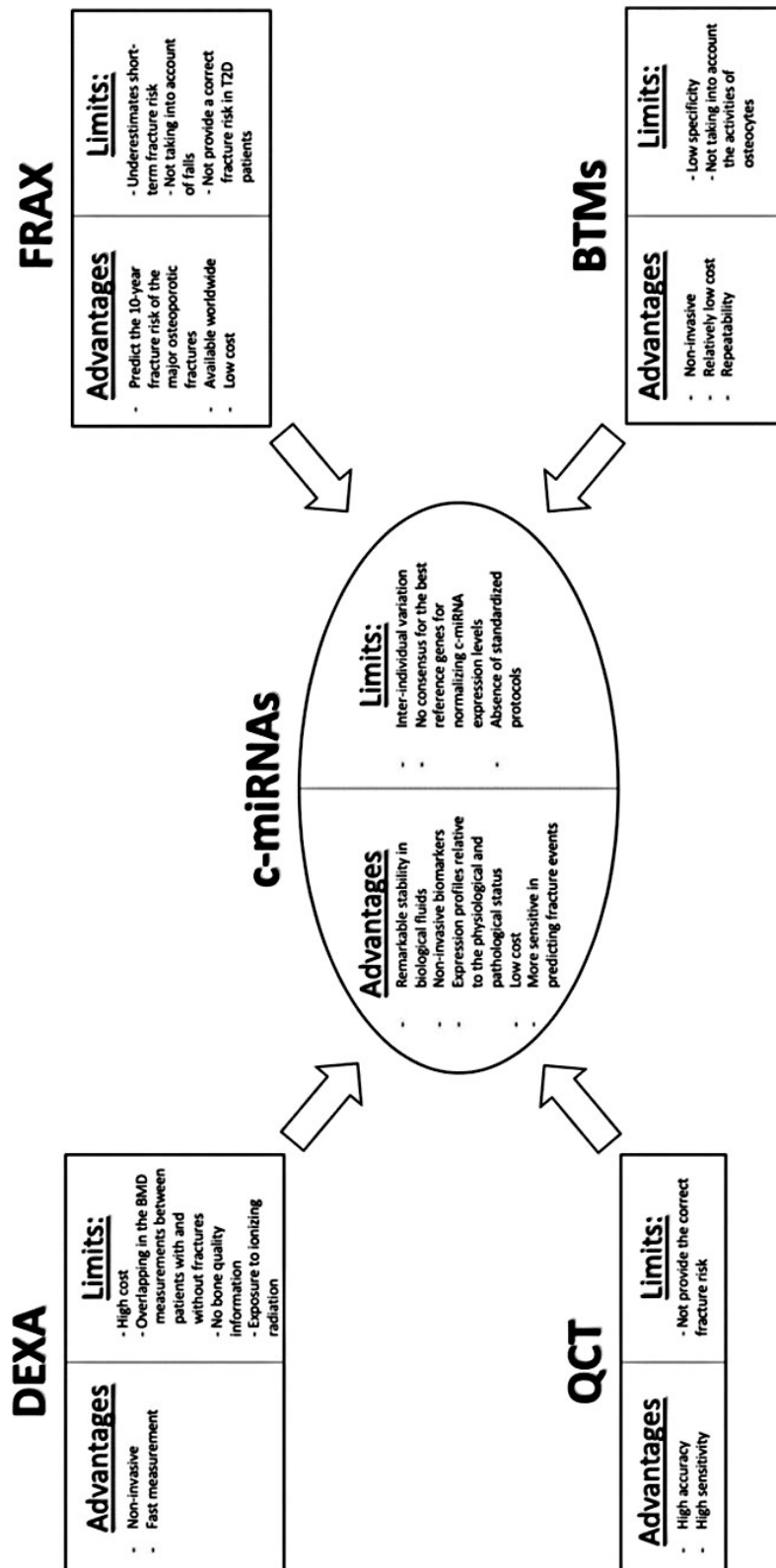


Abbildung 10 Clinical utility of c-miRNAs as biomarkers for bone fragility and its benefits compared with the classical fragility fracture risk assessment tools.
 Anmerkung: Knochendichtemessung (DEXA = DXA), Fracture Risk Assessment Tool (FRAX), Quantitative CT-Osteodensitometrie (QCT), Knochenbaumarker (BTM; z.B. mit dem CTXA-Verfahren (Computed Tomography X-Ray Absorptiometry))

Quelle: Donati, S., Ciuffi, S., Palmi, G., & Brandi, M. L., 2020

7 Konklusion und Ausblick

Der Einsatz von miRNA panels als Screening-Methode für die Frakturprädiktion ist nützlich, um die Lebensqualität von Personen mit Frakturrisiken anzuheben, die Kosten der Frakturbehandlung und dessen Nachbetreuung für das Gesundheitswesen zu reduzieren und eine kosteneffiziente Alternative oder zumindest Erweiterung zu algorithmusbasierten Risikoberechnungen wie FRAX zu schaffen (8). Bei anderen Erkrankungen werden miRNAs bereits für die Diagnose und Prognose von Erkrankungen eingesetzt (9). Die einzelnen miRNAs besitzen für sich genommen allerdings eine geringe diagnostische Spezifität (9). Deshalb ist es wichtig, mehrere miRNAs zu kombinieren und so miRNA panels individuell angepasst an die Patientinnen und Patienten für die Berechnung des Frakturrisikos zusammenzustellen. Um hier einen Beitrag in der Erforschung von aussagekräftigen miRNAs als Frakturprädiktoren zu leisten, wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht, ob vor Frakturereignissen die miRNAs bereits differentiell exprimiert waren. Alle Probandinnen besaßen eine diabetische Stoffwechsellage und waren überwiegend vergleichbar hinsichtlich ihrer Merkmale.

Es können folgende Ergebnisse und Schlussfolgerungen resümiert werden: Bis auf die beiden miRNAs miR-141-3p und miR-3168 waren bei allen übrigen 12 untersuchten miRNAs die Expression statistisch signifikant unterschiedlich – selbst nach Adjustierung des α -Niveaus mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur. Eine Unterscheidung der Probandinnen hinsichtlich eines erhöhten Frakturrisikos ist somit für einen Mindestzeitraum von zwei Jahren mit den 12 untersuchten miRNAs möglich. In der Betrachtung der diagnostischen Güte zeigten bis auf miR-141-3p alle auswertbaren miRNAs akzeptable bis exzellente AUC- und pAUC-Werte in der ROC-Analyse und sind damit diagnostisch verwendbar.

Limitiert wird die Aussagekraft der mittels RT-qPCR durchgeführten Expressionsanalyse durch die Wahl der Kontrollmethode. Eine weitere Limitation erfährt die Aussagekraft der erarbeiteten Resultate durch den geringen Stichprobenumfang von insgesamt 46 Probandinnen. Demgegenüber kann die Aussagekraft dieser Arbeit durch die homogene Merkmalsverteilung mittels einer entsprechenden Auswahl der Probenseren aus einer prospektiven Kohortenstudie erhöht und präzisiert werden.

Für eine Absicherung der gefundenen Resultate und eine Erweiterung der Aussagekraft bei den hier untersuchten miRNAs müssen allerdings weiterführende Studien im Rahmen

zukünftiger Forschungsarbeiten durchgeführt und u.a. nachfolgende Aspekte berücksichtigt werden.

Sind die Expressionsunterschiede der untersuchten miRNAs statistisch signifikant, wenn:

- auf eine größere Studienpopulation zugegriffen wird (die Testpower also erhöht wird; siehe Unterkapitel 5.3.1)?
- männliche Probanden einbezogen werden?
- weitere Studienmerkmale berücksichtigt werden (ProbandInnen ohne T2DM, andere Vorerkrankungen, Medikationen, Laborwerte etc.)?
- eine Studienpopulation mit einer anderen „ethnicity“ betrachtet wird?

8 Literaturverzeichnis

1. Brozek W, Reichardt B, Kimberger O, Zwerina J, Dimai HP, Kritsch D, et al. Mortality After Hip Fracture in Austria 2008–2011. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2014 Sep 3;95(3):257–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00223-014-9889-9>
2. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos* [Internet]. 2021 Dec 2;16(1):82. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11657-020-00871-9>
3. 2017 et al HA. HHS Public Access. *Physiol Behav* [Internet]. 2017;176(10):139–48. Available from: <file:///C:/Users/Carla%0ACarolina/Desktop/Artigos%0Apara%0Aacrescentar%0Ana%0Aqualifica%C3%A7%C3%A3o/The%0Aimpact%0Aof%0Abirth%0Aweight%0Aon%0Acardiovascular%0Adisease%0Arisk%0Ain>
4. STATISTICS AUSTRIA. Austria. Data. Figures. Facts [Internet]. statistik.at. 2022 [cited 2022 Apr 3]. Available from: http://www.statistik.at/web_en/publications_services/austria_data_figures_facts/index.html
5. Zauner G, Glock B, Wilbacher I. Evaluation von Frakturen Älterer und Potentialanalyse für Präventivmaßnahmen. :1–36.
6. Hauptverband der österreichischen Sozialversicherungsträger E. Frakturbericht Epidemiologie [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.sozialversicherung.at/cdscontent/?contentid=10007.844093&portal=svportal>
7. Donati S, Ciuffi S, Palmi G, Brandi ML. Circulating miRNAs: A new opportunity in bone fragility. *Biomolecules*. 2020;10(6):1–23.
8. Walter E, Dellago H, Grillari J, Dimai HP, Hackl M. Cost-utility analysis of fracture risk assessment using microRNAs compared with standard tools and no monitoring in the Austrian female population. *Bone* [Internet]. 2018 Mar;108:44–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328217304738>
9. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 23;9(2):276. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/276>
10. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*. 2003;4(7):1–20.
11. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007;23(5):243–9.
12. Monaghan M, Pandit A, Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;116(4):197–208.
13. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “ walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform* [Internet]. 2011;44(5):839–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.002>
14. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):22–32.
15. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation.

- Blood [Internet]. 2006 Dec 1;108(12):3646–53. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/108/12/3646/22676/MicroRNAs-regulators-of-gene-expression-and-cell>
16. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* [Internet]. 2005 Jan;120(1):15–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404012607>
 17. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415–9.
 18. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011–6.
 19. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* (80-). 2002;297(5589):2056–60.
 20. Baev V, Milev I, Naydenov M, Vachev T, Apostolova E, Mehterov N, et al. Insight into small RNA abundance and expression in high- and low-temperature stress response using deep sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2014;84(September 2019):105–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.007>
 21. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. 2003;277–9.
 22. Budak H, Bulut R, Kantar M, Alptekin B. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Brief Funct Genomics*. 2016;15(1):65–71.
 23. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* [Internet]. 2016 Feb 23;7(2):100–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-015-0212-y>
 24. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901–6.
 25. miRBase [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: <https://www.mirbase.org/>
 26. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):0404–18.
 27. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev Life Sci* [Internet]. 2016;10(2):175–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007>
 28. Szpunar MJ, Parry BL. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2016;176(1):139–48.
 29. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5003–8.
 30. Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011 Sep;39(16):7223–33. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr254>
 31. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2011 Apr 20;13(4):423–33. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb2210>
 32. Köberle V, Pleli T, Schmithals C, Augusto Alonso E, Hauptenthal J, Bönig H, et al. Differential Stability of Cell-Free Circulating microRNAs: Implications for Their Utilization as Biomarkers. Veedu RN, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep

- 20;8(9):e75184. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0075184>
33. Farina N, E Wood M, D Perrapato S, Francklyn C, Stein G, L Stein J, et al. Standardizing Analysis of Circulating MicroRNA: Clinical and Biological Relevance. Vol. 115, *Journal of cellular biochemistry*. 2014.
 34. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2011 Dec;717(1–2):85–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510711000546>
 35. Owen R, Reilly GC. In vitro models of bone remodelling and associated disorders. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6(OCT):1–22.
 36. Wang N, Liu X, Tang Z, Wei X, Dong H, Liu Y, et al. Increased BMSC exosomal miR-140-3p alleviates bone degradation and promotes bone restoration by targeting *Plxnb1* in diabetic rats. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2022;20(1):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01267-2>
 37. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* [Internet]. 2011;17(11):1473–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2489>
 38. Wa Q, Li L, Lin H, Peng X, Ren D, Huang Y, et al. Downregulation of MIR-19a-3p promotes invasion, migration and bone metastasis via activating TGF- β signaling in prostate cancer. *Oncol Rep*. 2018;39(1):81–90.
 39. Crane JL, Xian L, Cao X. Role of TGF- β Signaling in Coupling Bone Remodeling. In 2016. p. 287–300. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2966-5_18
 40. Muschitz C, Zwick RH, Haschka J, Dimai HP, Rauner M, Amrein K, et al. Osteoporose bei pneumologischen Erkrankungen. *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. 2021 Jun 16;133(S4):155–73. Available from: <https://www.oegkm.at/publikationen/>
 41. Dachverband Osteologie e.V. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. *Z Allgemeinmed*. 2017;82(2):221.
 42. Herold, Gerd et. al. *Innere Medizin 2021*. In: Herold D med. G, editor. *Innere Medizin 2021*. Köln; p. 1000 Seiten.
 43. Benzinger P, Becker C, Todd C, Bleibler F, Rothenbacher D, König HH, et al. The impact of preventive measures on the burden of femoral fractures - a modelling approach to estimating the impact of fall prevention exercises and oral bisphosphonate treatment for the years 2014 and 2025. *BMC Geriatr* [Internet]. 2016;16:75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12877-016-0247-9>
 44. Grisso JA, Kelsey JL, Strom BL, Ghiu GY, Maislin G, O'Brien LA, et al. Risk Factors for Falls as a Cause of Hip Fracture in Women. *N Engl J Med* [Internet]. 1991 May 9;324(19):1326–31. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199105093241905>
 45. Leitlinie Osteoporose. *Arznei Vernunft – Osteoporose* [Internet]. 2017;24. Available from: www.arzneiundvernunft.at
 46. Centre for Metabolic Bone Diseases U of S. FRAX[®] Rechner zur Bestimmung des Frakturrisikos [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from: <https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/tool.aspx?country=16>
 47. Muschitz C, Kautzky-Willer A, Rauner M, Winhöfer-Stöckl Y, Haschka J. Diagnosis and management of patients with diabetes and co-existing osteoporosis (Update 2019): Common guideline of the Austrian Society for Bone and Mineral Research and the Austrian Diabetes Society. *Wien Klin Wochenschr*.

- 2019;131:174–85.
48. Obermayer-Pietsch B, Fössl I, Dimai HP. Langfristige Therapiekonzepte bei Osteoporose. *Internist (Berl)*. 2021;62(5):474–85.
 49. Ferrari S. Diabetes and Bone. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2017 Feb 8;100(2):107–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00223-017-0234-y>
 50. Dobnig H, Piswanger-so JC, Roth M, Obermayer-pietsch B, Tiran A, Strele A, et al. Type 2 Diabetes Mellitus in Nursing Home Patients : Effects on Bone Turnover , Bone Mass , and Fracture Risk. 2006;91(9):3355–63. Available from: https://watermark.silverchair.com/jcem3355.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9k khW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAlowggJWBgkqhkiG9w0BBwagggJH MIICQwIBADCCAjwGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMqNu WsRs67QITvr52AgEQgIICDandmwBcTiyKNLWx9bxputnODBpXHZk911UCWor b8TdIX8
 51. Thermo Fisher Scientific Inc, editor. Real-time PCR Handbook [Internet]. 2016. 70 p. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/global/forms/life-science/digital-experience.html>
 52. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010;50(4):244–9.
 53. Hadji P, Bock K, Wüster C, Emons G, Gottschalk M, Schulz KD. Osteodensitometrie: Quo vadis? Möglichkeiten und grenzen der modernen osteoporosediagnostik. *Reproduktionsmedizin*. 2001;17(5):261–70.
 54. P B. Kurze Historie der Knochendichtemessung. *J für Miner , Zeitschrift für Knochen- und Gelenk*. 2013;
 55. Mohr, A., Genant H.K., Guermazi, A., Njeh CF. Quantitativer Ultraschall. *J für Miner Muskuloskelettale Erkrankungen* [Internet]. 2009;9:32–5. Available from: www.kup.at/%0Amineralstoffwechsel
 56. Achilles EXP II Affordable and convenient fracture risk assessment using quantitative ultrasound. 2017; Available from: gehealthcare.com
 57. Krieg MA, Barkmann R, Gonnelli S, Stewart A, Bauer DC, Del Rio Barquero L, et al. Quantitative Ultrasound in the Management of Osteoporosis: The 2007 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom*. 2008;11(1):163–87.
 58. Reiser M, Kuhn F-P, Debus J, editors. *Radiologie* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-004-132212>
 59. Adult Positions - ISCD [Internet]. [cited 2022 Jun 5]. Available from: <https://iscd.org/learn/official-positions/adult-positions/>
 60. World Health Organization. WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis At Primary Health. *World Heal Summ Meet Rep Brussels, Belgium, 2004* [Internet]. 2007;May(May 2004):1–13. Available from: <http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>
 61. Kim KM, Lim S-K. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2014 Jun;16:133–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489214000423>
 62. Gao Y, Patil S, Qian A. The role of micromnas in bone metabolism and disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1–23.
 63. Heilmeier U, Hackl M, Skalicky S, Weilner S, Schroeder F, Vierlinger K, et al. Serum miRNA Signatures Are Indicative of Skeletal Fractures in Postmenopausal Women With and Without Type 2 Diabetes and Influence Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *J Bone Miner Res*. 2016;31(12):2173–92.
 64. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, et al.

- Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* [Internet]. 2015;79:43–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.027>
65. TAmiRNA. OsteomiR - microRNA Biomarkers of Bone Quality [Internet]. 2020 [cited 2022 May 30]. Available from: <https://www.tamirna.com/microna-biomarkers-of-bone-quality/>
 66. Dobnig H, Piswanger-Sölkner JC, Obermayer-Pietsch B, Tiran A, Strele A, Maier E, et al. Hip and nonvertebral fracture prediction in nursing home patients: Role of bone ultrasound and bone marker measurements. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(5):1678–86.
 67. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513–8.
 68. Farina NH, Wood ME, Perrapato SD, Francklyn CS, Stein GS, Stein JL, et al. Standardizing Analysis of Circulating MicroRNA: Clinical and Biological Relevance. *J Cell Biochem* [Internet]. 2014 May;115(5):805–11. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.24745>
 69. Pcr RNA. October 2017 RNA Spike-in Kit , for RT. 2017;(October).
 70. Shaffer J, Schlumpberger M, Lader E. miRNA profiling from blood — challenges and recommendations. Qiagen [Internet]. 2012;1–10. Available from: http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDYQFjAA&url=http://www.sabiosciences.com/manuals/Whitepaper_Serumplasma.pdf&ei=4PtHU5SPGunX0QXOwYGgCA&usq=AFQjCNGX4_YVQ_SavPcRTqNabE_x_g1ZKEA&sig2=uv8YLVpz8MkL7Fc2CGL-HQ&bvm=bv.6
 71. Protocol Q. miRNeasy Serum / Plasma Advanced Kit. 2017;(217204):2–3.
 72. Qiagen. miRNA PCR Handbook. Qiagen [Internet]. 2017;(October). Available from: <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1bJ1Z0CEwuuEppOhegWhx1j-h9lodez4s>
 73. Amplification of the No Template Control (NTC) | Thermo Fisher Scientific - DK [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/amplification-no-template-control.html>
 74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 75. Pfaffl MW. Methoden & anwendungen · marktübersicht. *Biospektrum*. 2004;01/04:92–5.
 76. Partial area under ROC curve [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 7]. Available from: <https://www.medcalc.org/manual/roc-curve-partial-area.php>
 77. Wei J, Li H, Wang S, Li T, Fan J, Liang X, et al. Let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2. *Stem Cells Dev*. 2014;23(13):1452–63.
 78. Zhang Y, Cheng W, Han B, Guo Y, Wei S, Yu L, et al. Let-7i-5p functions as a putative osteogenic differentiation promoter by targeting CKIP-1. *Cytotechnology*. 2021;73(1):79–90.
 79. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, et al. Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4125–34.
 80. Sun M, Hu L, Wang S, Huang T, Zhang M, Yang M, et al. Circulating MicroRNA-

- 19b Identified From Osteoporotic Vertebral Compression Fracture Patients Increases Bone Formation. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2020 Feb 22;35(2):306–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.3892>
81. Zarecki P, Hackl M, Grillari J, Debono M, Eastell R. Serum microRNAs as novel biomarkers for osteoporotic vertebral fractures. *Bone* [Internet]. 2020 Jan;130:115105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328219303989>
 82. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2014 Aug;29(8):1718–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.2175>
 83. Jiang Y, Zhang J, Li Z, Jia G. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal miR-25 Regulates the Ubiquitination and Degradation of Runx2 by SMURF1 to Promote Fracture Healing in Mice. *Front Med*. 2020;7(December):1–14.
 84. Komori T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. In 2009. p. 43–9. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1050-9_5
 85. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* [Internet]. 2011 Feb 24;22(2):391–420. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-010-1501-1>
 86. Feichtinger X, Muschitz C, Heimpl P, Baierl A, Fahrleitner-Pammer A, Redl H, et al. Bone-related Circulating MicroRNAs miR-29b-3p, miR-550a-3p, and miR-324-3p and their Association to Bone Microstructure and Histomorphometry. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 20;8(1):4867. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-22844-2>
 87. Dolan E, Dumas A, Keane KM, Bestetti G, Freitas LHM, Gualano B, et al. The influence of acute exercise on bone biomarkers: protocol for a systematic review with meta-analysis. *Syst Rev*. 2020;9(1):1–10.
 88. Zhang L, Li G, Wang K, Wang Y, Dong J, Wang H, et al. MiR-30 family members inhibit osteoblast differentiation by suppressing Runx2 under unloading conditions in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020 Jan;522(1):164–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19321771>
 89. Kelch S, Balmayor ER, Seeliger C, Vester H, Kirschke JS, Van Griensven M. MiRNAs in bone tissue correlate to bone mineral density and circulating miRNAs are gender independent in osteoporotic patients. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16113-x>
 90. Ramírez-Salazar EG, Carrillo-Patiño S, Hidalgo-Bravo A, Rivera-Paredes B, Quiterio M, Ramírez-Palacios P, et al. Serum miRNAs miR-140-3p and miR-23b-3p as potential biomarkers for osteoporosis and osteoporotic fracture in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Gene* [Internet]. 2018 Dec;679:19–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111918309363>
 91. Wang D, Wang H, Liu C, Mu X, Cheng S. Hyperglycemia inhibition of endothelial miR-140-3p mediates angiogenic dysfunction in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2019 May;33(5):374–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872718309620>
 92. Ye Y, Li SL, Ma YY, Diao YJ, Yang L, Su MQ, et al. Exosomal miR-141-3p regulates osteoblast activity to promote the osteoblastic metastasis of prostate

- cancer. *Oncotarget*. 2017;8(55):94834–49.
93. Tu M, Tang J, He H, Cheng P, Chen C. MiR-142-5p promotes bone repair by maintaining osteoblast activity. *J Bone Miner Metab*. 2017;35(3):255–64.
 94. Li M, Luo R, Yang W, Zhou Z, Li C. miR-363-3p is activated by MYB and regulates osteoporosis pathogenesis via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* [Internet]. 2019 May 25;55(5):376–86. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11626-019-00344-5>
 95. Bravo Vázquez LA, Moreno Becerril MY, Mora Hernández EO, León Carmona GG de, Aguirre Padilla ME, Chakraborty S, et al. The Emerging Role of MicroRNAs in Bone Diseases and Their Therapeutic Potential. *Molecules* [Internet]. 2021 Dec 30;27(1):211. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/1/211>
 96. Mollazadeh S, Fazly Bazzaz BS, Neshati V, De Vries AAF, Naderi-Meshkin H, Mojarad M, et al. Overexpression of MicroRNA-148b-3p stimulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: The role of MicroRNA-148b-3p in osteogenesis. *BMC Med Genet*. 2019;20(1):1–11.
 97. Kaestner KH, Knöchel W, Martínez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 2000;14(2):142–6.
 98. Xu J, Wang K, Zhang Z, Xue D, Li W, Pan Z. The Role of Forkhead Box Family in Bone Metabolism and Diseases. *Front Pharmacol*. 2022;12(January):1–14.
 99. Zeng H-C, Bae Y, Dawson BC, Chen Y, Bertin T, Munivez E, et al. MicroRNA miR-23a cluster promotes osteocyte differentiation by regulating TGF- β signalling in osteoblasts. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Apr 11;8(1):15000. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms15000>
 100. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharya S, Skinner RA, et al. Tumor-Derived Interleukin-8 Stimulates Osteolysis Independent of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Pathway. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Dec 1;65(23):11001–9. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-2630>
 101. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* [Internet]. 2003 Jul;33(1):28–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328203000863>
 102. Sahin G, Ozturk C, Bagis S, Cimen OB, Erdogan C. Correlation of serum cytokine levels with axial bone mineral density. *Singapore Med J* [Internet]. 2002 Nov;43(11):576–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680527>
 103. Fabbri E, Brognara E, Montagner G, Ghimenton C, Eccher A, Cantù C, et al. Regulation of IL-8 gene expression in gliomas by microRNA miR-93. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Dec 8;15(1):661. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1659-1>
 104. FABBRI E, MONTAGNER G, BIANCHI N, FINOTTI A, BORGATTI M, LAMPRONTI I, et al. MicroRNA miR-93-5p regulates expression of IL-8 and VEGF in neuroblastoma SK-N-AS cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2016 May;35(5):2866–72. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2016.4676>
 105. Seguro LPC, Casella CB, Caparbo VF, Oliveira RM, Bonfa A, Bonfa E, et al. Lower P1NP serum levels: a predictive marker of bone loss after 1 year follow-up in premenopausal systemic lupus erythematosus patients. *Osteoporos Int* [Internet]. 2015 Feb 22;26(2):459–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-014-2860-9>

106. Takada J, Dinavahi R, Miyauchi A, Hamaya E, Hirama T, Libanati C, et al. Relationship between P1NP, a biochemical marker of bone turnover, and bone mineral density in patients transitioned from alendronate to romosozumab or teriparatide: a post hoc analysis of the STRUCTURE trial. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2020 May 9;38(3):310–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-019-01057-1>
107. Naik AA, Xie C, Zuscik MJ, Kingsley P, Schwarz EM, Awad H, et al. Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):251–64.
108. Wysokinski D, Pawlowska E, Blasiak J. RUNX2: A master bone growth regulator that may be involved in the DNA damage response. *DNA Cell Biol*. 2015;34(5):305–15.
109. Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force Aldred S, et al. Functional Profiling Reveals Critical Role for miRNA in Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. Lucia A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 May 19;4(5):e5605. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005605>
110. Li K-C, Lo S-C, Sung L-Y, Liao Y-H, Chang Y-H, Hu Y-C. Improved calvarial bone repair by hASCs engineered with Cre/loxP-based baculovirus conferring prolonged BMP-2 and MiR-148b co-expression. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2017 Nov;11(11):3068–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/term.2208>
111. Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocr Rev* [Internet]. 2003 Apr 1;24(2):218–35. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/24/2/218/2424337>
112. Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, et al. RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2009 Jul 28;27(4):402–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-009-0054-x>
113. Wu X-B, Li Y, Schneider A, Yu W, Rajendren G, Iqbal J, et al. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 Sep 15;112(6):924–34. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/15543>
114. McGee DL. Verstehen von Medizinischen Tests und Testergebnissen - Spezielle Fachgebiete [Internet]. 2018. [cited 2022 Apr 9]. Available from: <https://www.msmanuals.com/de/profi/spezielle-fachgebiete/klinische-entscheidungsfindung/verstehen-von-medizinischen-tests-und-testergebnissen>
115. Hermann K. Sachs, L.: Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden, 7. völlig neu bearbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-... 1992, 70 Abb., 94 Übersichten, 291 Tabellen, xxxii, 848 S., DM 98,-. *Biometrical J* [Internet]. 1993;35(2):252–252. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bimj.4710350218>
116. Kramer K. Nichtparametrische Analyse Diagnostischer Gütemaße bei Clusterdaten. 2011.
117. Agency EM. CHMP, EMEA, Diagnostic Agents 7. *Reproduction*. 2009;(July):1–19.
118. Fawcett T. ROC graphs: Notes and practical considerations for researchers. *HP Lab* [Internet]. 2005; Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:ROC+Graphs:+Notes+and+Practical+Considerations+for+Researchers#0>
119. Dr. Keller T. ROC-Kurve (receiver operating characteristics) [Internet]. [cited 2022 Apr 9]. Available from: <https://www.acomed-statistik.de/roc-kurve.html>

120. McClish DK. Analyzing a Portion of the ROC Curve. *Med Decis Mak* [Internet]. 1989 Aug 1;9(3):190–5. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0272989X8900900307>
121. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2010;5(9):1315–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>
122. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175–91.
123. Erdfelder E, FAul F, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41(4):1149–60.
124. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. New York: Lawrence Erlbaum Associates; 1988. 567 p.
125. Witwer KW. Circulating MicroRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clin Chem*. 2015;61(1):56–63.
126. Riaz N, Wolden SL, Gelblum DY, Eric J. HHS Public Access. 2016;118(24):6072–8.
127. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, Soukup D, Resnick R, Sarma K, et al. Public Access NIH Public Access. *PLoS One*. 2017;32(7):736–40.
128. Zhao Y, Wong L, Goh WW Bin. How to do quantile normalization correctly for gene expression data analyses. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72664-6>
129. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 2000;46(1–2):69–81.
130. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. β -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*. 2002;57(9):765–70.
131. LOU G, MA N, XU Y, JIANG L, YANG J, WANG C, et al. Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification. *Int J Mol Med* [Internet]. 2015 Nov;36(5):1400–8. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2015.2338>
132. Kanis JA, Johnell O, Oden A, De Laet C, Dawson A, Jonsson B. Ten Year Probabilities of Osteoporotic Fractures According to BMD and Diagnostic Thresholds. *Osteoporos Int* [Internet]. 2001 Dec 1;12(12):989–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001980170006>
133. Barker AL, Nitz JC, Low Choy NL, Haines TP. Mobility has a non-linear association with falls risk among people in residential aged care: An observational study. *J Physiother*. 2012;58(2):117–25.
134. Burger H, De Laet CEDH, Van Daele PLA, Weel AEAM, Witteman JCM, Hofman A, et al. Risk factors for increased bone loss in an elderly population: The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol*. 1998;147(9):871–9.
135. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA, Berger M. Patients with Prior Fractures Have an Increased Risk of Future Fractures: A Summary of the Literature and Statistical Synthesis. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2010 Feb 18;15(4):721–39. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.2000.15.4.721>
136. Kim EAN, Mordiffi SZ, Bee WH, Devi K, Evans D. Evaluation of three fall-risk assessment tools in an acute care setting. *J Adv Nurs* [Internet]. 2007

- Nov;60(4):427–35. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2648.2007.04419.x>
137. Spoelstra SL, Given BA, Given CW. Fall prevention in hospitals: An integrative review. *Clin Nurs Res*. 2012;21(1):92–112.
 138. Manemann SM, Chamberlain AM, Boyd CM, Miller DM, Poe KL, Cheville A, et al. Fall Risk and Outcomes Among Patients Hospitalized With Cardiovascular Disease in the Community. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* [Internet]. 2018 Aug;11(8):139–48. Available from:
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCOUTCOMES.117.004199>
 139. Roller WC, Glatt S, Vetere-Overfield B, Hassanein R. Falls and Parkinson’s Disease. *Clin Neuropharmacol* [Internet]. 1989 Apr;12(2):98–105. Available from:
<http://journals.lww.com/00002826-198904000-00003>
 140. Williams LJ, Pasco JA, Jackson H, Kiropoulos L, Stuart AL, Jacka FN, et al. Depression as a risk factor for fracture in women: A 10 year longitudinal study. *J Affect Disord* [Internet]. 2016 Mar;192:34–40. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165032715306728>
 141. Vestergaard P. Drugs Causing Bone Loss. In 2019. p. 475–97. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/164_2019_340
 142. Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T, Yasuda H, Nakamura M, et al. Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. *PLoS One*. 2017;12(9):1–17.
 143. Peng Y, Sheng X, Xue F, Qian Y. The genetic association between osteoprotegerin (OPG) gene polymorphisms and bone mineral density (BMD) in postmenopausal women: A meta-analysis. *Med (United States)*. 2018;97(51).
 144. Iwasaki Y, Kazama JJ, Fukagawa M. Molecular Abnormalities Underlying Bone Fragility in Chronic Kidney Disease. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017;2017:1–11. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/3485785/>
 145. Ensrud KE. Renal Function and Risk of Hip and Vertebral Fractures in Older Women. *Arch Intern Med* [Internet]. 2007 Jan 22;167(2):133. Available from:
<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.167.2.133>
 146. Nickolas TL, McMahon DJ, Shane E. Relationship between Moderate to Severe Kidney Disease and Hip Fracture in the United States. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006 Nov;17(11):3223–32. Available from:
<https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2005111194>
 147. Joined PL, Herald TM, Globe TB, Guardian T. Print Document. *Foundations*. 2010;1–13.
 148. LESLIE W. AGA technical review on osteoporosis in hepatic disorders. *Gastroenterology* [Internet]. 2003 Sep;125(3):941–66. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850301062X>
 149. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX™ and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int* [Internet]. 2008 Apr 22;19(4):385–97. Available from:
<https://link.springer.com/10.1007/s00198-007-0543-5>
 150. Kanis JA, Harvey NC, Johansson H, Liu E, Vandenput L, Lorentzon M, et al. A decade of FRAX: how has it changed the management of osteoporosis? *Aging Clin Exp Res* [Internet]. 2020 Feb 11;32(2):187–96. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s40520-019-01432-y>
 151. Fuggle NR, Curtis EM, Ward KA, Harvey NC, Dennison EM, Cooper C. Fracture prediction, imaging and screening in osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol* [Internet].

- 2019 Sep 12;15(9):535–47. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41574-019-0220-8>
152. ClinRisk Ltd. QFracture-2016 [Internet]. 2016 [cited 2022 Apr 4]. Available from: <https://qfracture.org/>
 153. Middleton RG, Shabani F, Uzoigwe CE, Moqsith M, Venkatesan M. FRAX and the assessment of the risk of developing a fragility fracture. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 2012 Oct;94-B(10):1313–20. Available from: <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/10.1302/0301-620X.94B10.28889>
 154. Paul Man SF, Sin DD. Thinning bone and inhaled corticosteroid in COPD: What to do until there is definitive proof? *Chest* [Internet]. 2009;136(6):1448–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.09-1787>
 155. Leslie WD, Rubin MR, Schwartz A V, Kanis JA. Type 2 diabetes and bone. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2012 Nov;27(11):2231–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.1759>
 156. Pathways N, Pathways N, Pathway N. Osteoporosis : assessing the risk of fr fragility agility fr fracture acture. 2018;(February):1–10. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg146/resources/osteoporosis-assessing-the-risk-of-fragility-fracture-pdf-35109574194373>
 157. Ladang A, Beudart C, Locquet M, Reginster J-Y, Bruyère O, Cavalier E. Evaluation of a Panel of MicroRNAs that Predicts Fragility Fracture Risk: A Pilot Study. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2020 Mar 15;106(3):239–47. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00223-019-00628-8>