

Aus der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von Patienten mit
Familiärer Hypercholesterinämie und *STAP1*-Genanalyse

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Magdalena Danyel geb. Brachaczek

aus Bielsko-Biała, Polen

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
Abstract (Englisch)	4
Abstract (Deutsch)	5
1 Einleitung	6
1.1 Familiäre Hypercholesterinämie (FH)	6
1.2 Molekulargenetische Grundlagen der FH	6
1.3 <i>STAP1</i> als FH-assoziiertes Gen	8
1.4 Ziel der Arbeit	8
2 Methodik	9
2.1 Rekrutierung der FH-Patienten	9
2.2 Sanger-Sequenzierung bei FH-Patienten	9
2.2.1 Primerdesign	9
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	10
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	11
2.2.4 Enzymatische Reinigung der PCR-Produkte	11
2.2.5 Sequenzierung aufgereinigter PCR-Produkte	12
2.3 Nutzung von Daten der CHRIS-Studie	13
2.4 Untersuchung der Assoziation von <i>STAP1</i> -Varianten und Dyslipidämie	14
3 Ergebnisse	15
3.1 Klinische Charakterisierung der FH-Patienten	15
3.2 Identifizierte <i>STAP1</i> -Varianten	16
3.3 Charakterisierung von Daten der CHRIS-Kohorte und weiteren identifizierten <i>STAP1</i> -Varianten	17
3.4 Statistische Analyse von Daten der Berliner FH-Kohorte und Evaluierung der Rolle von <i>STAP1</i> bei Varianten-Trägern aus der CHRIS-Studie	19
4 Diskussion	20
5 Literaturverzeichnis	23
6 Eidesstattliche Versicherung	26
7 Auszug der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)	27
8 Druckexemplar der ausgewählten Publikation	28
9 Lebenslauf	36

10	Publikationsliste	37
11	Danksagung.....	38

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ANOVA	Analysis of Variance
APOB	Apolipoprotein B
APOE	Apolipoprotein E
ARH	Autosomal-rezessive Hypercholesterinämie
BASE-II	Berliner Altersstudie II
BRDG1	BCR downstream signaling-1
C	Cytosin
CHRIS	Cooperative Health Research in South Tyrol
CUPSAT	Cologne University Protein Stability Analysis Tool
DLCN	Dutch Lipid Clinic Networks
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
G	Guanin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HDL	High Density Lipoproteine
HDL-C	HDL-Cholesterin
HGMD	The Human Gene Mutation Database
IQR	Interquartile Range
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low Density Lipoproteine
LDL-C	LDL-Cholesterin
LDLRAP1	Low Density Lipoprotein Rezeptor Adapter Protein 1
LIPA	Lysosomal Acid Lipase
Lp(a)	Lipoprotein a
MAF	Minor Allele Frequency
MI	Myokardinfarkt
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like Protein 1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin
PNPLA5	Patatin-like Phospholipase-Domain-Containing family
PolyPhen	Polymorphism Phenotyping
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
SD	Standard Deviation
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
STAP1	Signal Transducing Adaptor Family Member 1
SIFT	Sorting Intolerant from Tolerant
Ref.	Referenzwert
T	Thymin
TC	Gesamtcholesterin
TG	Triglyceride
VUS	Variante unklarer Signifikanz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: LDL-C-Wert und Mutationsstatus der Gene <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> und <i>PCSK9</i>	15
Abbildung 2: Verteilung des errechneten DLCN-Score in der Berliner FH Kohorte.....	16
Abbildung 3: Darstellung eines <i>STAP1</i> -Sequenzabschnitts mit der heterozygoten Variante rs199787258 (c.526C>T, p.(Pro176Ser), Exon 5).....	17

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Primerverzeichnis.	10
Tabelle 2. Zusammensetzung des PCR-Mastermix.	11
Tabelle 3. PCR-Programm für alle 9 Exons des <i>STAP1</i> -und <i>LDLRAP1</i> -Gens.....	11
Tabelle 4. Reaktionsansatz der enzymatischen Reinigung.	12
Tabelle 5. Thermocycler-Programm der enzymatischen Reinigung.	12
Tabelle 6. Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion.	12
Tabelle 7. Thermocycler-Programm der Sequenzierreaktion.	12
Tabelle 8. Charakteristika der untersuchten FH-Kohorte.....	16
Tabelle 9. Zusammenfassung der <i>STAP1</i> -Varianten in der FH-Patientenkohorte.....	17
Tabelle 10. Seltene <i>STAP1</i> -Varianten in der CHRIS-Kohorte.	18
Tabelle 11. Lipidwerte der CHRIS-Kohorte in Abhängigkeit vom Trägerstatus.	18

Abstract (English)

Background:

Autosomal-dominant familial hypercholesterolemia (FH) leads to increased serum levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). FH patients have therefore a substantial risk of developing cardiovascular disease (CVD). Disease causing mutations are found in three major genes: *LDLR* (low density lipoprotein receptor), *APOB* (apolipoprotein B), and *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin). However, the absence of the mutation in one of these genes, does not exclude the diagnosis of FH. Recently, *STAP1* (signal transducing adaptor family member 1) has been suggested as a fourth causative gene.

Methods:

STAP1 was analyzed in 75 hypercholesterolemic patients from Berlin, Germany, in whom the clinical diagnosis of FH could not be confirmed by molecular genetic testing of the three canonical genes. Additionally, ten patients with negative family history were screened for pathogenic variants in *LDLRAP1* (low density lipoprotein receptor adaptor protein 1), associated with autosomal-recessive hypercholesterolemia. The association of serum lipid levels according to *STAP1* carrier status was evaluated. For this purpose, data from a population-based cohort, the Cooperative Health Research in South Tyrol (CHRIS), were included.

Results:

In the Berlin FH cohort one rare *STAP1* variant, c.526C>T,p.(Pro176Ser), predicted to be disease causing utilizing bioinformatic tools, was identified. In the CHRIS cohort further three variants were detected: (c.619G>A,p.(Asp207Asn) [n=3]; c.35G>A,p.(Arg12His) [n=14]; c.414G>C, p.(Leu138Leu) [n=2]). One further individual carried also the previously determined variant c.526C>T,p.(Pro176Ser). One hundred non-carriers from the CHRIS cohort were randomly selected as controls. There was no statistically significant difference between carriers and non-carriers of *STAP1* variants with respect to lipid traits.

Conclusion/discussion:

According to the data, rare *STAP1* variants seem not to be associated with familial hypercholesterolemia. Comprehensive genetic analysis, such as Whole Exome or Whole Genome Sequencing in order to identify further genes for FH is recommended.

Abstract (Deutsch)

Hintergrund: Die familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine angeborene Lipidstoffwechselstörung, welche klinisch durch einen erhöhten LDL-Cholesterinspiegel, sowie ein erhebliches Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen gekennzeichnet ist. Diese FH unterliegt einem autosomal-dominanten Vererbungsmechanismus und wird hauptsächlich durch Mutationen im *LDLR* (Low Density Lipoprotein Rezeptor), *APOB* (Apolipoprotein B) und *PCSK9* (Proprotein Conversionase Subtilisin/kexin) verursacht. Kürzlich wurde *STAP1* als viertes verursachendes Gen vorgeschlagen.

Methoden: Es wurde eine Sequenzierung aller 9 Exons des *STAP1* Gens bei insgesamt 75 Berliner Patienten mit Hypercholesterinämie, die keine pathogene Mutation in einem der drei Hauptgene *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* aufwiesen, durchgeführt. Bei 10 dieser Patienten mit negativer Familienanamnese wurde zudem das Gen *LDLRAP1* (Low Density Lipoprotein Rezeptor Adapter Protein 1) untersucht. Zur Evaluierung potentieller Auswirkungen von *STAP1*-Varianten auf den Serumlipidspiegel wurden zusätzlich Daten aus der populationsbasierten Kohortenstudie Cooperative Health Research in South Tyrol (CHRIS) hinzugezogen. Aus derselben Kohorte erfolgte die randomisierte Bildung einer Kontrollgruppe von 100 Nicht-Trägern für die statistische Analyse.

Ergebnisse: Es konnte eine seltene *STAP1*-Variante c.526C>T,p.(Pro176Ser), jedoch keine potentiell pathogene Variante im *LDLRAP1* Gen der Berliner FH-Kohorte nachgewiesen werden. Über die CHRIS-Kohorte wurden neben der oben Genannten [n=1] drei weitere *STAP1*-Varianten identifiziert (c.619G>A,p.(Asp207Asn) [n=3]; c.35G>A,p.(Arg12His) [n= 14]; c.414G>C,p.(Leu138Leu) [n=2]). Es zeigte sich keine statistisch relevante Erhöhung der Serumlipidwerte in Abhängigkeit vom *STAP1*-Trägerstatus.

Fazit/Diskussion: Es konnte keine Assoziation zwischen Varianten im *STAP1*-Gen und dem Auftreten einer Hypercholesterinämie gezeigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen gegen *STAP1* als ein kausales FH-Gen. Aufgrund der weltweit hohen Anzahl klinischer FH-Diagnosen ohne molekulargenetische Bestätigung ist eine Suche nach weiteren Kandidatgenen mittels Exom- bzw. Genomsequenzierung erstrebenswert.

1 Einleitung

1.1 Familiäre Hypercholesterinämie (FH)

Die Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine genetisch bedingte Krankheit mit autosomal-dominantem Erbgang, die durch eine Erhöhung des Serumcholesterins, insbesondere des LDL-Cholesterins (LDL-C), gekennzeichnet ist. Die FH ist mit einer geschätzten Prävalenz zwischen 1:250 und 1:500 weit verbreitet.^{2,24} Patienten mit FH neigen zur Bildung atherosklerotischer Plaques mit dem Risiko früher Herz- und Kreislauferkrankungen, wie z. B. der koronaren Herzerkrankung (KHK) und Myokardinfarkten (MI).¹¹ Zur medikamentösen Therapie der FH stehen u. a. die „klassische“ Wirkstoffgruppe der Statine und der NPC1L1-Inhibitor Ezetimib zur Verfügung.¹⁷ Als Reservetherapeutika haben sich die LDL-Apherese und PCSK9-Inhibition etabliert.¹²

Klinisch suggestiv für eine FH sind sichtbare Cholesterinablagerung im Gewebe, wie z. B. kutane oder tendinöse Xanthome, die bevorzugt an der Achillessehne und den Strecksehnen der Fingergelenke auftreten. Als weitere Manifestationsformen sind das Xanthelasma palpebrarum (Ablagerung von Cholesterin um das Auge), sowie der Arcus corneae (Ablagerung von Cholesterin im Bereich der Hornhaut des Auges) zu nennen. Zur Identifizierung von FH-Patienten wurden klinische und laborchemische Kriterienkataloge, wie beispielsweise der des *Dutch Lipid Clinic Networks*, entwickelt.⁷ Zentrale Bedeutung hat hierbei die Bestimmung des Nüchtern-LDL-Cholesterins im Serum, welcher ab 190 mg/dl (4,9 mmol/L) als erhöht definiert wird.

Der frühen Diagnosestellung kommt hinsichtlich der Prävention kardiovaskulärer Komplikationen eine besondere Bedeutung zu. In diesem Sinne sollte bei Erstdiagnose eine zusätzliche Testung der erstgradigen Verwandten, sowie der weiteren Folgegenerationen durchgeführt werden (Kaskaden-Screening).⁸ Die Effizienz dieser Strategie basiert letztlich auf dem dominanten Vererbungsmuster der Erkrankung.

1.2 Molekulargenetische Grundlagen der FH

In den meisten Fällen der autosomal-dominanten FH kann eine krankheitsrelevante Mutation im *LDLR*-Gen (low density lipoprotein receptor, OMIM 606945) nachgewiesen werden.^{5,18} Funktionseinschränkungen dieses Rezeptors führen zur Störung der LDL-

Aufnahme in die Zelle und des LDLR-Abbaus in Hepatozyten mit konsekutiver Erhöhung des LDL-Cholesterin Spiegels im Blut.⁶ Weiterhin findet man heterozygote Mutationen in den Genen *APOB* (apolipoprotein B, OMIM 107730) und *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/ kexin, OMIM 607786).^{1,30} Die zugehörigen Genprodukte befinden sich in der direkten Interaktion mit dem LDLR: APOB als Ligand und PCSK9 als katabolischer Regulator. Klinisch werden keine Unterschiede in der Ausprägung der Erkrankung in Abhängigkeit von dem betroffenen Gen beobachtet. In einigen Fällen können Homozygotie, zusammengesetzte Heterozygotie innerhalb desselben Gens und Doppelheterozygotie für Mutationen in zwei dieser Gene beobachtet werden.²⁹ Homozygote Mutationsträger fallen durch besonders stark erhöhte LDL-C Serumwerte von 400 mg/dl (10,3 mmol/L) bis >1000 mg/dl auf und können bereits im Kindesalter kardiovaskuläre Ereignisse erleiden.

Darüber hinaus wurden Mutationen in *LDLRAP1* (low density lipoprotein receptor adaptor protein, OMIM 605747) mit einer seltenen Form der familiären Hypercholesterinämie assoziiert, die autosomal-rezessiv vererbt wird (ARH, OMIM 603813).¹⁶ Hierbei ist das Kriterium der familiären Häufung meist nicht vorhanden, da die Erkrankung erst dann auftritt, wenn beide Allele betroffen sind. Bei einer heterozygoten Mutation handelt es sich am ehesten um eine Anlageträgerschaft, die in der Regel nicht zum Phänotyp führt. Bei ca. 60% der Patienten mit einer klinischen Diagnose einer FH wird keine pathogene Mutation in einem der drei Hauptgene identifiziert.³² Mit der Etablierung der Hochdurchsatzsequenzierungstechnik (Next generation sequencing; NGS), war es möglich weitere Kandidatengene zu identifizieren. Dazu gehören *STAP1* (signal transducing adaptor family member 1, OMIM 604298)¹³, *APOE* (apolipoprotein E, OMIM 617347)¹⁶, *LIPA* (lysosomal acid lipase, OMIM 613497) und *PNPLA5* (patatin-like phospholipase-domain-containing family, OMIM 611589).²²

Neben den genannten monogenen Ursachen wurden auch polygenetische Grundlagen der Hypercholesterinämie identifiziert. Im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) wurden insgesamt 95 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) mit erhöhten Lipidwerten assoziiert.³³ Einige dieser SNPs wurden zur Etablierung polygener Scores verwendet.^{14,31}

1.3 *STAP1* als FH-assoziiertes Gen

Im Rahmen einer familienbasierten Kopplungsanalyse in Kombination mit Exomsequenzierungen bei FH-Patienten aus den Niederlanden wurde *STAP1* (signal transducing adaptor family member 1, OMIM 604298) als viertes FH-Gen vorgeschlagen.¹³

STAP1, auch bekannt als *BRDG1* (BCR downstream signaling-1), kodiert ein Andockprotein, welches eine prolinreiche Region, eine *Pleckstrin homology domain*, PH, sowie einen carboxyterminalen Abschnitt mit Ähnlichkeit zur *Src-homology 2*-Domäne SH2 enthält. Es wurde gezeigt, dass *STAP1* phosphorylierungsabhängig als Substrat der Tyrosinkinase *Tec* agiert und der Signalkaskade von Tyrosinkinase *c-kit* nachgeschaltet ist.²⁵ Der spezifische Mechanismus, den *STAP1* in der Cholesterin-Homöostase spielt, ist derzeit nicht abschließend geklärt. In tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass *c-kit* defiziente Mäuse eine Hypercholesterinämie entwickeln. In diesem Sinne finden sich erniedrigte Cholesterinwerte bei Leukämiepatienten im Rahmen einer Gain-of-function-Mutation im *c-kit*-Gen. Interessanterweise führt eine therapeutische Tyrosinkinase-Inhibition regelhaft zur Steigerung der Lipidwerte im Blut.

Bisher wurden mehrere genetische Varianten in *STAP1* bei FH-Patienten identifiziert. Die Pathogenität dieser Varianten wurde jedoch nach heutigem Wissenstand nicht eindeutig belegt.

1.4 Ziel der Arbeit

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein Folgeprojekt unserer Arbeitsgruppe.¹⁹ Initial wurden 206 FH Patienten für das Vorliegen einer ursächlichen Mutation in einem der Hauptgene *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* untersucht. Insgesamt konnten 90 Varianten in *LDLR* sowie 8 Varianten in *APOB* nachgewiesen werden. Für *PCSK9* konnte in dem Patientenkollektiv keine pathogene Variante gefunden werden. Die Mutationsanalyse war jedoch insgesamt in etwa 60% der Fälle negativ, trotz der klinischen Diagnose einer FH. Das Ziel dieser Arbeit war nun, all die Patienten ohne Mutationsnachweis in einem der bekannten FH-Gene auf das Vorliegen einer pathogenen Variante im FH-Kandidatgen *STAP1* zu untersuchen. Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen der Dyslipidämie und dem Trägerstatus verschiedener *STAP1*-Varianten statistisch untersucht. Hier wurden Daten der populationsbasierten Kohorte der Cooperative Health Research in South Tyrol (CHRIS-Studie) miteinbezogen.^{9,27}

2 Methodik

2.1 Rekrutierung der FH-Patienten

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte über die Lipidambulanz des Interdisziplinären Stoffwechsellabors der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Berücksichtigt wurden Patienten mit einer klinischen FH-Diagnose in den Jahren 2012 bis 2017, welche jedoch im Rahmen einer *LDLR*, *APOB*- und *PCSK9*-Analyse nicht molekulargenetisch bestätigt werden konnte.¹⁹ Die Diagnosestellung erfolgte unter Berücksichtigung von laborchemischen Lipidparametern (Gesamtcholesterin (TC), LDL-Cholesterin (LDL-C), HDL-Cholesterin (HDL-C), Triglyceride (TG) und Lipoprotein a (Lp(a))), der Eigen- sowie Familienanamnese und des klinischen Befundes aus der körperlichen Untersuchung. Unter Verwendung des DLCN-Scores (Dutch Lipid Clinic Network criteria) wurden die Patienten nach FH-Diagnosewahrscheinlichkeit schließlich in vier Kategorien eingeordnet (über 8 Punkte: „sicher“; 6-8 Punkte: „wahrscheinlich“, 3-5 Punkte: „möglich“, unter 3 Punkte: „unwahrscheinlich“). Die Berechnung des DLCN-Scores war jedoch keine Voraussetzung für die Durchführung der molekulargenetischen Diagnostik.

Das Forschungsvorhaben wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Zulassungsnummer EA2/089/14 und EA2/029/09).

2.2 Sanger-Sequenzierung bei FH-Patienten

2.2.1 Primerdesign

Mittels *Primer3* wurden für *STAP1* (NM_012108) und *LDLRAP1* (NM_015627) Primer bestimmt (Tabelle 1). Sequenziert wurden ausschließlich die protein-kodierenden Exons der oben genannten Gene, einschließlich von mindestens 30 Basenpaaren flankierender intronischer Sequenz. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass die Anlagerungstemperatur beider Primer nicht zu stark divergierte und der CG-Gehalt zwischen 40 und 60 % lag. Bei jedem Vorwärtsprimer wurde zudem eine gemeinsame Sequenz (M13 Primer) integriert, was für den Sequenzierungsschritt relevant war.

Tabelle 1. Primerverzeichnis.

<i>STAP1</i>	Sequenz (5'->3')	<i>LDLRAP1</i>	Sequenz (5'->3')
Exon 1_F	CCAGAGATTGCCCTCTGAAA	Exon 1_F	GAAACTCTTGGTGCCTGGAC
Exon 1_R	TTTCAACAGAAACAAGGAGGTC	Exon 1_R	CCTCTTCTCCCAACCTGCAC
Exon 2_F	CCTGGGGGACATATTGAGAC	Exon 2_F	GAAGGCTGGTGAAGAGCTGTT
Exon 2_R	TCTTGGATGGCAGAAAATCC	Exon 2_R	AATGGTTCCCCTCTGCCAAG
Exon 3_F	AATTGGCTTTTGCAAACCTG	Exon 3_F	TGCCTGACAGATAGCTGGTG
Exon 3_R	TTCAGCCACTGGATGTGAAG	Exon 3_R	TCATCATGAGCCAGGTGC
Exon 4_F	TTACAGCTAAGAATTGGAAGTTTCTAC	Exon 4_F	TTACCCCATTCCTTCCTTCC
Exon 4_R	ACCACCCGTTACTCCCTAGC	Exon 4_R	AGCTACTGCCACACAAAGC
Exon 5_F	CTCTGTCAGGTAAGTGTAGCCC	Exon 5_F	GGGATGGAGCTGCAGAAG
Exon 5_R	CCTGGCTTAACAAGAGCAAG	Exon 5_R	TTTCAGATGGGAAAACCGAG
Exon 6_F	CAGGCTTGTAATAATAGAGCATTG	Exon 6_F	GGCTGGAAACCTGAAACTGC
Exon 6_R	AGCCCCAACGAAACACATAG	Exon 6_R	CTGCCACAGAGTGAGAACC
Exon 7_F	TCATGACAACATAGGTTGATTATACAG	Exon 7_F	TTTTCTTCTAGATATGTCCCTATGC
Exon 7_R	ATATCTGCCACATTCAGGGC	Exon 7_R	CTGCCACACCAAGAACAAGG
Exon 8_F	CATTGAAGTGAAGTAATGACAGTAATC	Exon 8_F	GTCTCCAGCTTTGGGTCCTT
Exon 8_R	GCCTGGCTGGTACTATCAATC	Exon 8_R	CGGAGGAAATCAACTTGAGC
Exon 9_F	ACCAGCAATGTTCCACACAC	Exon 9_F	GGAGGTGCTTTGATCTGAGG
Exon 9_R	CCATCTTTGTAAGGAAATAATGGG	Exon 9_R	CAGGCTGACAATGCTGAGG

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Sequenzierung nach Sanger basiert auf amplifizierten spezifischen DNA-Sequenzen. Um diese zu erhalten, führt man eine PCR durch. Diese umfasst in der Regel mehrere Zyklen, wobei jeder Zyklus aus jeweils drei Schritten besteht. Zunächst wird die DNA-Polymerase bei ca. 95 °C aktiviert und die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Anschließend erfolgt bei einer spezifischen Temperatur (im Fall der vorliegenden Arbeit 60 °C) die Hybridisierung der Primer, d.h. Bindung der Primer an den komplementären Bereich des DNA-Einzelstrangs (Annealing). Abschließend, in der Elongationsphase, wird an den freien 3'OH-Gruppen durch die hitzestabile Taq-Polymerase aus 2-Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) DNA synthetisiert. Da die Primerpaare nicht zu einem etablierten diagnostischen Set gehören, wurde von vornherein eine Touch-down PCR durchgeführt, um möglichst spezifische Amplifikation sicherzustellen. Die Annealingtemperatur wurde so pro Zyklus um 1 °C reduziert.

Tabelle 2. Zusammensetzung des PCR-Mastermix.

Substanz	Zugesetztes Volumen/Probe
HPLC H ₂ O	17,8 µl
10x PCR Puffer +MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs, 10 mM	2,0 µl
Primer Mix (F+R), 5 µM	1,5 µl
Taq (FirePol), 5 U/µl	0,2 µl
DNA des Patienten, ~50 ng/µl	1 µl

Tabelle 3. PCR-Programm für alle 9 Exons des *STAP1*-und *LDLRAP1*-Gens.

Temperatur	Zeit	Zykluszahl
95 °C	5 min	1
95 °C	10 s	10
TD 65 °C-55 °C	30 s	
72 °C	50 s	
95 °C	10 s	30
55 °C	30 s	
72 °C	50 s	
72 °C	7 min	1
12 °C	∞	1

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde während der Etablierung mit Referenz-DNA anhand der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Mit Hilfe dieser Methode werden DNA-Fragmente bedingt durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Es wurden 2%-ige Agarosegele verwendet. Die Laufzeit betrug 25 min bei ca. 200 V im 1x TAE-Puffer. Es wurden jeweils 5 µl des PCR-Produkts mit 5 µl Laufpuffer (6x Loading Dye Blue/Orange G190A, Promega GmbH) versetzt und in die Taschen des Agaroseseigels aufgetragen. Damit die Größe der PCR-Produkte bestimmt und zugeordnet werden konnte, wurde parallel zu den Proben ein Größenstandard (Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) aufgetrennt.

2.2.4 Enzymatische Reinigung der PCR-Produkte

Für dieses Verfahren kommen die Enzyme Exonuclease I und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) zum Einsatz. Die Exonuclease dient der Verdauung der Einzelstrang-DNA, sowie der nicht eingebauten Primer, während SAP zur Hydrolyse der überzähligen dNTPs genutzt wird.

Tabelle 4. Reaktionsansatz der enzymatischen Reinigung.

Substanz	Zugesetztes Volumen/Probe
HPLC H ₂ O	3,85 µl
10x Exonuclease Reaktion	0,5 µl
10x Antarctic Buffer	0,5 µl
Exonuclease I, 20 U/µl	0,05 µl
Antarctic Phosphatase U/µl	0,1 µl
PCR-Produkt	5 µl

Tabelle 5. Thermocycler-Programm der enzymatischen Reinigung.

Temperatur	Zeit
37 °C	30 min
80 °C	15 min
12 °C	∞

2.2.5 Sequenzierung aufgereinigter PCR-Produkte

2.2.5.1 Sequenzreaktion nach Sanger

In diesem methodischen Schritt erfolgte erneut eine DNA-Synthese. Hier wurde das Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet, welches unter anderem fluoreszenz-markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) enthält. Für diese Reaktion wurde für alle Proben ein M13-Primer verwendet, da dessen Sequenz im Rahmen des Primerdesigns bei jedem Vorwärtsprimer integriert wurde.

Tabelle 6. Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion.

Substanz	Zugesetztes Volumen/Probe
HPLC H ₂ O	6,2 µl
5x Sequenzierpuffer (ABI) für Big Dye 3.1	2,0 µl
M13 Primer	0,5 µl
Big Dye V3.1	0,3 µl
Enzymatisch gereinigte PCR Produkte	1 µl

Tabelle 7. Thermocycler-Programm der Sequenzierreaktion.

Temperatur	Zeit	Zyklus
96 °C	2 min	1
96 °C	10 s	25
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
12 °C	∞	

2.2.5.2 SPRI-Bead-Fällung

In dieser Reaktion werden die Sequenzierungsprodukte aufgereinigt. Dies fand im DNA-Fällungsautomat: Biomek® NXP Workstation der Firma Beckman Coulter GmbH statt. Hierfür wurde eine 85%-ige Ethanollösung und das Reagenz Agencourt Clean SEQ, welches zahlreiche magnetische Partikel (magnetic beads) enthält, verwendet. Eine 96-well-Platte mit den Produkten der Sequenzierreaktionen wurde auf die magnetische 96-Wellplatte (Magnetic Ring Stand) gestellt, um eine Haftung der magnetischen Beads (und der daran gebundenen DNA) während der folgenden Waschrinne zu gewährleisten und so, einem DNA-Verlust vorzubeugen.

2.2.5.3 Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese und Sequenzanalyse

Anschließend wurden die Sequenzierungsprodukte in einem 3730 DNA Analyser elektrophoretisch in einer Polymermatrix der Größe nach aufgetrennt und am Ende der Kapillare mit einem Laser bestrahlt. Das detektierte, spezifische Fluoreszenzmuster wurde dann in die Basenabfolge übersetzt. Die Basenabfolge wurde als .ab1-Datei gespeichert und unter Zuhilfenahme des Programms Genious 9.1 mit dem Transkript NM_012108 für *STAP1* und Transkript NM_015627 für *LDLRAP1* als Referenz abgeglichen. Für die Beurteilung der Krankheitsrelevanz der identifizierten Sequenzveränderungen wurden die bioinformatischen Vorhersageprogramme PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) und MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>) sowie die Datenbanken HGMD (The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) und ExAC (Exome Aggregation Consortium, <http://exac.broadinstitute.org/>) verwendet.

2.3 Nutzung von Daten der CHRIS-Studie

Die Probanden der populationsbasierten CHRIS-Studie (Cooperative Health Research in South Tyrol) erhielten im Vorfeld eine Genotypisierung mittels Illumina HumanOmniExpressExome Bead Chip.²⁷ So war es möglich weitere Träger der seltenen *STAP1*-Varianten zu identifizieren. Varianten mit Minor Allele Frequency (MAF) unter 0,002 (gemäß ExAC) wurden als „selten“ definiert. Des Weiteren wurden 100 Probanden, bei denen keine seltene *STAP1*-Variante identifiziert wurde, ausgewählt. Dieses Kollektiv wurde als repräsentative Kontrollkohorte für die statistische Analyse verwendet.

Die CHRIS-Studie wurde von der Ethikkommission des Gesundheitswesens der Autonomen Provinz Bozen (Südtiroler Sanitätsbetrieb/Azienda Sanitaria dell'Alto Adige), Protokoll Nr. 21/2011 genehmigt.

2.4 Untersuchung der Assoziation von *STAP1*-Varianten und Dyslipidämie

Die statistische Analyse wurde mit dem IBM Statistical Package for the Social Sciences Version 22.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp. USA) durchgeführt. Die Grafiken wurden mit GraphPad Prism 6 erstellt. Die Daten der CHRIS-Studienteilnehmer wurden zusätzlich mit Hilfe des Programms R analysiert. Für die Analysen wurden folgende Referenzwerte der Lipidparameter verwendet: Gesamtcholesterin <200mg/dl, LDL-Cholesterin <115mg/dl, HDL-Cholesterin >45 mg/dl für Frauen, 55 mg/dl für Männer sowie 30-150 mg/dl für Triglyceride. Mittels One-way ANOVA und Post-Hoc Tukey-Test wurden die LDL-C Werte der drei Kohorten (FH-Patienten mit Mutationsnachweis, FH-Patienten ohne Mutationsnachweis, Kontroll-Kohorte/ Berliner Altersstudie II) verglichen. Zur statistischen Analyse der Assoziation von erhöhten Lipidwerten und dem Trägerstatus der seltenen *STAP1*-Varianten wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Weiterhin wurde der Effekt des Geschlechts und des Alters auf die Erhöhung der Lipidwerte untersucht. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde die Häufung abnormer Lipidwerte in beiden Gruppen (Träger und Nicht-Träger der *STAP1* Varianten) überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Charakterisierung der FH-Patienten

Insgesamt wurden Daten und DNA-Proben von 75 FH-Patienten (48 Frauen und 27 Männer; mittleres Alter 53 ± 13 Jahre) der Lipidambulanz des Interdisziplinären Stoffwechszentrums der Charité-Universitätsmedizin Berlin analysiert. Abbildung 1 zeigt die mittleren LDL-C-Serumwerte der Patientenkohorte in Relation zu den mutationspositiven FH Patienten und der populationsbasierten Kohorte aus der Berliner Altersstudie II (BASE-II).^{3,10} In Tabelle 8 findet sich eine Übersicht zur klinischen Charakterisierung der FH-Patientenkohorte.

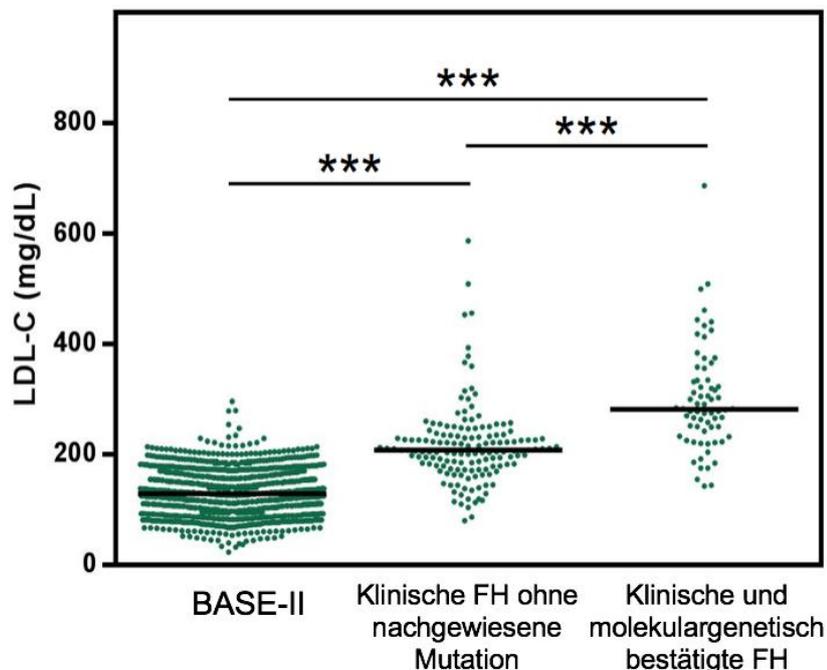


Abbildung 1: LDL-C-Wert und Mutationsstatus der Gene *LDLR*, *APOB* und *PCSK9*. LDL-C-Einzelwerte (grüne Punkte) und Mediane (schwarze Balken) für die drei Gruppen sind angegeben. Die Abbildung zeigt den Vergleich der LDL-C-Werte zwischen mutationspositiven Patienten (N=68) und FH-Patienten ohne nachgewiesene Mutation (mutations-negative, N=75). Die Werte wurden in Relation zu LDL-C-Werten aus der populationsbasierten Berliner Altersstudie II (BASE-II, N=1631, Altersgruppe ≥ 60 Jahre) dargestellt. Die statistische Analyse mittels One-way ANOVA ergab signifikante Unterschiede der Serum-LDL-C-Werte zwischen den Gruppen (***) $p < 0.001$). Zusätzlich wurde ein Post-Hoc Tukey-Test durchgeführt, welcher ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied zwischen allen möglichen Paaren ergab (***) $p < 0,001$). Diese Abbildung wurde bereits in dem publizierten Artikel Danyel et al. 2019 verwendet und für die vorliegende deutsche Version angepasst.⁹

Tabelle 8. Charakteristika der untersuchten FH-Kohorte. Übersetzte und editierte Tabelle aus Danyel et al. 2019.⁹

Variable	Berliner FH-Kohorte (n=75)
Geschlecht	
Weiblich (%)	64
Männlich (%)	36
Alter	
Mittelwert ± SD	53±13
Grenzwerte	25-81
TC in mg/dl	
Median (IQR)	313 (272-344)
Grenzwerte	190-677
LDL-C in mg/dl	
Median (IQR)	223 (199-247)
Grenzwerte	88-456
HDL-C in mg/dl	
Median (IQR)	58 (51-69)
Grenzwerte	30-117
TG in mg/dl	
Median (IQR)	175 (125-261)
Grenzwerte	45-1127

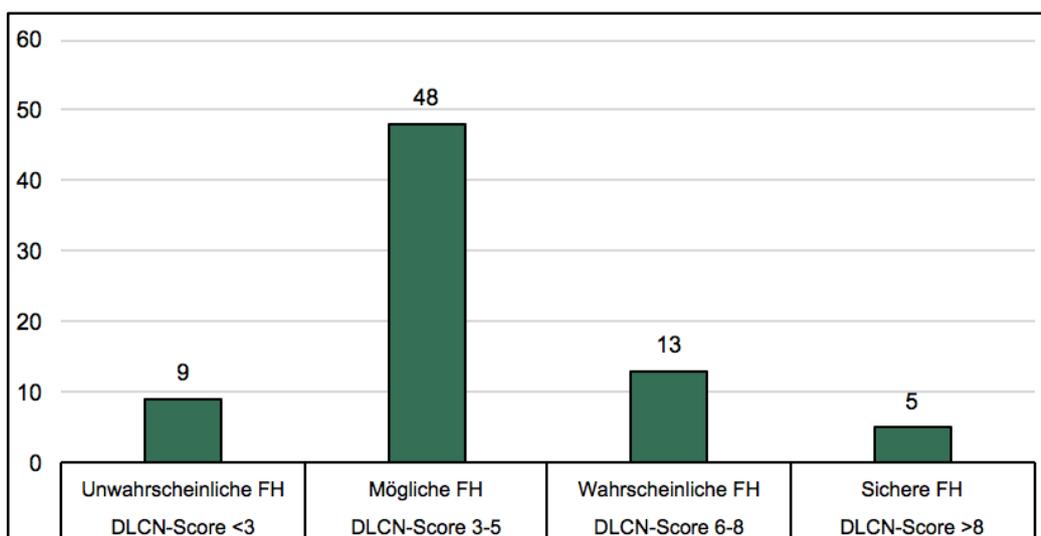


Abbildung 2. Verteilung des errechneten DLCN-Scores in der Berliner FH Kohorte. Dargestellt werden die publizierten Daten von Danyel et al. 2019.⁹

3.2 Identifizierte *STAP1*-Varianten

Im Rahmen der Sequenzierungsanalysen wurden zwei bekannte Polymorphismen (rs11556614 und rs11556615), sowie bei einem Patienten, eine seltene *STAP1*-Variante rs199787258 (c.526C>T, p.(Pro176Ser)) identifiziert. Diese seltene Variante (MAF=0,0003) wurde in der Literatur bereits mit der Familiären Hypercholesterinämie in Verbindung gebracht.¹³ Der 78-jährige Patient, bei dem diese heterozygote Variante nachgewiesen wurde, zeigte folgende Lipidwerte: Gesamtcholesterin 450 mg/dl (Ref.

<200 mg/dl), LDL-C 360 mg/dl (Ref. <130 mg/dl), HDL-C 68 mg/dl (Ref. >55 mg/dl), TG 222 mg/dl (Ref. <200 mg/dl), und Lp(a) 190 mg/l (Ref. <300 mg/l). Im nächsten Schritt wurde der 49-jährigen Sohn des Indexpatienten untersucht. Dieser war ebenfalls Träger der seltenen Variante (c.526C>T, p.(Pro176Ser)) und zeigte ebenfalls teilweise erhöhte Lipidwerte: Gesamtcholesterin 270 mg/dl, LDL-C 159 mg/dl, HDL-C 26 mg/dl und TG 498 mg/dl.

Die Sequenzierung des *LDLRAP1* bei Patienten mit negativer Familienanamnese zeigte keine Auffälligkeiten. Somit konnte eine autosomal-rezessive Hypercholesterinämie bei diesen Patienten ausgeschlossen werden.

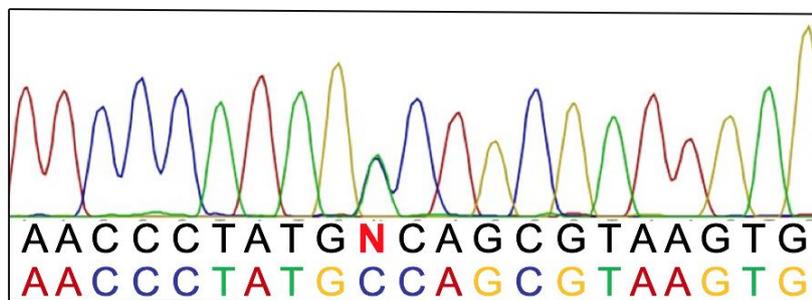


Abbildung 3: Darstellung eines *STAP1*-Sequenzabschnitts mit der heterozygoten Variante rs199787258 (c.526C>T, p.(Pro176Ser), Exon 5). Die Sequenzdaten wurden mit dem Referenztranskript NM_012108 (untere Sequenz) verglichen.

Tabelle 9. Zusammenfassung der *STAP1*-Varianten in der FH-Patientenkohorte. Aufgeführt sind die dbSNP Bezeichnung der Varianten, deren genomische Position (laut hg19), die Häufigkeit und die genaue Beschreibung der Veränderung auf der cDNA- und Proteinebene, sowie die Pathogenitätsbeurteilung der Vorhersageprogramme MutationTaster und PolyPhen. Übersetzte und editierte Tabelle aus Danyel et al. 2019.⁹ MAF: minor allele frequency.

<i>STAP1</i> Variante	Lokalisation (hg19)	MAF	Veränderung der DNA Basen	Veränderung der Aminosäuren	Mutation Taster	PolyPhen
rs11556614	4:68442968	0.5180	c.354A>G	p.Thr118Thr	“polymorphism”	“benign”
rs11556615	4:68447040	0.1923	c.381C>T	p.Asn127Asn	“polymorphism”	“benign”
rs199787258	4:68447185	0.0003	c.526C>T	p.Pro176Ser	“disease causing”	“probably damaging”

3.3 Charakterisierung von Daten der CHRIS-Kohorte und weiteren identifizierten *STAP1*-Varianten

Basierend auf den vorhandenen Sequenzierungsdaten der CHRIS-Studie wurden 20 Träger einer seltenen *STAP1*-Variante identifiziert. Die bereits oben beschriebene Variante rs199787258 wurde bei einem weiteren Probanden festgestellt. Zudem wurden noch drei weitere seltene Varianten gefunden. Alle vier Varianten wurden von dem

Prädiktionsprogramm MutationTaster als ursächlich (“disease causing”) eingestuft und sind in der Tabelle 10 detailliert dargestellt.

Tabelle 10. Seltene STAP1-Varianten in der CHRIS-Kohorte. Übersetzte und editierte Tabelle aus Danyel et al. 2019.⁹ MAF: minor allele frequency

STAP1 Variante	Genomische Lokalisation (hg19)	MAF	Veränderung der DNA Basen	Veränderung der Aminosäuren	Mutation-Taster	PolyPhen	Anzahl der Träger (n=20)
rs146545610	4:68449380	0.0001	c.619G>A	p.Asp207Asn	“disease causing”	“benign”	3
rs141647540	4:68424562	0.0002	c.35G>A	p.Arg12His	“disease causing”	“probably damaging”	14
rs149803575	4:68447073	0.0017	c.414G>C	p.Leu138Leu	“disease causing”	“benign”	2
rs199787258	4:68447185	0.0003	c.526C>T	p.Pro176Ser	“disease causing”	“probably damaging”	1

Aus dem Probandenkollektiv der CHRIS-Studie wurden randomisiert 100 Nicht-Träger der STAP1-Varianten als Kontrollgruppe ausgewählt. Die Lipidwerte für beide Gruppen sind detailliert in der Tabelle 11 dargestellt. Die Durchführung des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Tests zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 11).

Tabelle 11. Lipidwerte der CHRIS-Kohorte in Abhängigkeit vom Trägerstatus. Verglichen werden die durchschnittlichen Werte des Gesamtcholesterins (TC), LDL-Cholesterins, HDL-Cholesterins, sowie der Triglyceride zwischen den Trägern und Nicht-Trägern der STAP1-Varianten. In der letzten Spalte wird der p-Wert aufgeführt, der mit dem Mann-Whitney U Test berechnet wurde. Übersetzte und editierte Tabelle aus Danyel et al. 2019.⁹

Parameter	Träger (n=20)	Kontrollgruppe (n=100)	p-Wert (Mann-Whitney U Test)
TC in mg/dl			$p = 0,706$
Median (IQR)	225 (182-243)	206 (185-233)	
Grenzwerte	136-334	110-328	
LDL-C in mg/dl			$p = 0,503$
Median (IQR)	120 (105-156)	130 (109-153)	
Grenzwerte	70-261	37-247	
TG in mg/dl			$p = 0,432$
Median (IQR)	83 (69-150)	83 (65-118)	
Grenzwerte	29-585	32-556	
HDL-C in mg/dl			$p = 0,893$
Median (IQR)	66 (57-72)	62 (53-76)	
Grenzwerte	32-93	29-123	

3.4 Statistische Analyse von Daten der Berliner FH-Kohorte und Evaluierung der Rolle von *STAP1* bei Varianten-Trägern aus der CHRIS-Studie

Mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Tests wurde der Zusammenhang zwischen Geschlecht und erhöhten Lipidwerten untersucht. Für die Werte des Gesamtcholesterins, LDL-Cholesterins und der Triglyceride wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen gefunden. Die Werte des HDL-Cholesterins hingegen waren signifikant höher bei Frauen ($p=0,021$). Weiterhin wurde mit dem gleichen Testverfahren der Zusammenhang zwischen Alter und erhöhten Lipidwerten untersucht. Hier fand sich eine positive Assoziation hinsichtlich einer Erhöhung des Gesamtcholesterins ($p=0,047$) und LDL-Cholesterins ($p=0,015$) mit steigendem Alter.

In der Analyse der Daten aus der CHRIS-Kohorte konnten mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test keine signifikanten Unterschiede in Lipidwerten zwischen Trägern und Nicht-Trägern der seltenen *STAP1*-Varianten gezeigt werden. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde die Häufung abnormer Lipidwerte in beiden Gruppen überprüft. Hierbei konnte keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden. Abschließend wurde der Zusammenhang von Geschlecht und erhöhten Lipidwerten analysiert. Hier konnte ebenfalls, wie bei der Berliner FH-Kohorte, gezeigt werden, dass die HDL-Cholesterinwerte bei Frauen signifikant höher als bei Männern waren ($p<0,0001$). Zuletzt wurde der Zusammenhang zwischen dem Alter und der Höhe der Lipidparameter ebenfalls in der CHRIS-Kohorte analysiert. Gesamtcholesterin ($p=0,0001$), LDL-Cholesterin ($p=0,0003$) und Triglyceride ($p=0,049$) zeigten hier eine Assoziation mit dem Alter. Dies konnte für die Werte des HDL-Cholesterins nicht bestätigt werden. Die entsprechenden Diagramme der statistischen Analysen sind im Supplement des publizierten Artikels einsehbar.⁹

4 Diskussion

Die Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Eine ursächliche Mutation in einem der drei Gene, *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* kann bei ca. 60-80% der Patienten mit einer definitiven sowie bei ca. 25-30% mit einer möglichen klinischen Diagnose einer FH identifiziert werden.³² Dieses Mutationsscreening bleibt daher bei vielen Patienten unauffällig. Die Erforschung weiterer genetischer Ursachen der Familiären Hypercholesterinämie (FH) war daher bereits die Absicht zahlreicher wissenschaftlicher Studien.^{16,22}

STAP1 wurde im Rahmen einer familiären Kopplungsanalyse mit Exomsequenzierung bei FH Patienten identifiziert und als viertes FH Gen vorgeschlagen. Mehrere seltene Varianten dieses Gens wurden mit einer Erhöhung von Lipidparametern in Verbindung gebracht.¹³

Segregationsanalysen innerhalb von Familien mit FH zeigten gleichsam Variantenträger mit und ohne Cholesterinerhöhung im Blut. Auch bei Personen mit auffälligen Werten zwischen der 75-95. Perzentile, die als „möglicherweise betroffen“ kategorisiert wurden, konnten die *STAP1*-Varianten nachgewiesen werden.¹³ Allerdings fanden sich auch Personen mit unauffälligen Lipidparametern, die die Variante trugen. Um die Segregation statistisch zu belegen, wurde ein paarweiser Vergleich zwischen Trägern und Nicht-Trägern der *STAP1*-Varianten durchgeführt. Dieser zeigte eine statistische Signifikanz für Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den anhand exemplarischer Familien dargestellten Zusammenhang von *STAP1*-Varianten mit FH anhand einer unabhängigen Kohorte zu überprüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 75 Patienten mit einer klinischen Diagnose einer FH molekulargenetisch auf Vorliegen einer *STAP1*-Mutation untersucht. Die bei diesem Kollektiv im Vorfeld durchgeführte Sequenzierung der drei Hauptgene (*LDLR*, *APOB* und *PCSK9*) war unauffällig verblieben.⁹ Es konnte bei einem Patienten eine seltene Variante im *STAP1*-Gen, c.526C>T, p.(Pro176Ser), nachgewiesen werden. Die Variante wurde ebenfalls beim Sohn des Indexpatienten nachgewiesen, der grenzwertig erhöhte Lipidwerte aufwies.

Die Häufigkeit des Auftretens seltener, möglicherweise krankheitsrelevanter Varianten im *STAP1*-Gen in unserer Arbeit deckt sich mit den Ergebnissen der Erstbeschreibung durch Fouchier und Kollegen (1,3%; 5 von 400 Patienten).¹³

Nach Fertigstellung der vorliegenden Analyse, wurde ein weiteres Fallbeispiel in der Literatur veröffentlicht.⁴ Interessanterweise beschäftigt sich die Arbeit von Blanco-Vaca und Kollegen mit exakt derselben *STAP1*-Variante, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde. Die Segregationsanalyse ergab, dass die Variante bei der nicht-betroffenen Tochter des Indexpatienten nachgewiesen wurde, jedoch nicht bei dem von einer Hypercholesterinämie betroffenen Sohn. Die Tatsache, dass die bei Blanco-Vaca und Kollegen berichtete Tochter des Betroffenen nicht die Hypercholesterinämie aufwies, kann wiederum durch das junge Alter erklärt werden. Es ist bekannt und wurde auch in der vorliegenden Arbeit anhand der Berliner FH-Kohorte bestätigt, dass das Alter mit einigen Lipidwerten korreliert. Zusammenfassend, kann die *STAP1*-Variante c.526C>T, p.(Pro176Ser) trotz der pathogenen Beurteilung mehrerer bioinformatischer Vorhersageprogramme (MutationTaster, PolyPhen, PROVEAN, SIFT und CUPSAT) nicht eindeutig als direkte Ursache der FH definiert werden. Wenn man diese Variante nach den aktuell geltenden ACMG Kriterien bewertet, resultiert ebenfalls eine Einstufung als „Variante unklarer klinischer Signifikanz (VUS Klasse III)“.²⁸

Neben den beschriebenen monogenen Ursachen, wird die Bedeutung der polygenen Vererbung der Hypercholesterinämie zunehmend deutlich. Im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien wurden insgesamt über 100 Genloci identifiziert, die mit erhöhten Lipidwerten korrelieren.²⁶ Futema et al. stellten die Hypothese auf, dass bei dem Großteil der Patienten, ohne abgrenzbare, monogene Ursache der FH, eine überdurchschnittliche hohe Anzahl von Polymorphismen vorliegen müsse, die mit einer Erhöhung des LDL-Cholesterins und Gesamtcholesterins assoziiert sind.¹⁴ Zur Überprüfung wurden 6 Polymorphismen ausgewählt, um einen Score zu generieren (SNP-Score).¹⁵ In diesem wird die Trägerschaft einer Variante mit dem errechneten Effekt auf LDL-Cholesterin vermessen. Es konnte gezeigt werden, dass der Score bei FH-Patienten ohne Mutationsnachweis im Vergleich zu einer repräsentativen populationsbasierten Kohorte signifikant höher ist.¹⁴ Futema und Kollegen schätzen, dass bei ca. 80 % der Patienten mit einer klinischen Diagnose einer FH ohne Mutationsnachweis, die Hypercholesterinämie am ehesten polygen bedingt sei. Die Autoren schlagen daher vor, dass die Diagnose einer Familiären Hypercholesterinämie erst nach Identifizierung einer monogenen Ursache vergeben werden sollte. Bei fehlendem Nachweis, sollte der Begriff einer *Polygenen Hypercholesterinämie* verwendet werden.¹⁴ Die Daten von Futema und Kollegen deuten darauf hin, dass auch bei den Patienten mit einer nachgewiesenen monogenen Mutation ein polygener Effekt zur Ausprägung des Phänotyps wirkt.²⁶ So

könnten möglicherweise auch unterschiedliche LDL-Konzentrationen unter den ebenfalls betroffenen Familienangehörigen eines FH-Patienten erklärt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen verdeutlichen, dass *STAP1* als kausales FH Kandidatengen unwahrscheinlich ist. Die *STAP1*-Mutationsanalyse daher nicht als Routinediagnostik zu empfehlen. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand sollte standardmäßig eine NGS-Paneluntersuchung inklusive der SNP-Score Berechnung veranlasst werden.

Die spezifische Rolle des *STAP1*-Proteins in der Cholesterin-Homöostase ist derzeit ungeklärt. Aktuell wurden einige weitere Arbeiten publiziert, die Varianten in *STAP1* ebenfalls als kausale Ursache für die FH ausschließen.^{23,21} Loaiza und Kollegen konnten zudem zeigen, dass im Gegensatz zu den etablierten Hypercholesterinämie-Genen, die Expression von *STAP1* in der Leber nicht nachweisbar ist. Weiterhin wurden in einem *Stap1-Knockout*-Mausmodell keine Lipidveränderungen im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt.²³ Zusammenfassend, ist das *STAP1* nach heutigem Wissenstand weitgehend als FH-Gen widerlegt worden.²⁰

Eine sinnvolle, moderne Methode zur Kandidatengen-Analyse in einer großen Kohorte ist die Exom-Diagnostik. Im Rahmen einer solchen Untersuchung werden die proteinkodierenden Bereiche (Exons) aller menschlichen Gene sequenziert. Sollte sich anhand der Ergebnisse der Phänotyp weder durch eine monogene Variante, noch durch polygene Veränderungen erklären lassen, so ist eine weitere Genomsequenzierung, bei der auch die nicht-kodierenden Bereiche berücksichtigt werden, möglicherweise aufschlussreich. So können diagnostische Lücken, im Sinne einer tief-intronischen Variante in bekannten Genen oder genomische Rearrangements abgeklärt werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-6.
2. Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur Heart J* 2016;37:1384-94.
3. Bertram L, Bockenhoff A, Demuth I, Duzel S, Eckardt R, Li SC, Lindenberger U, Pawelec G, Siedler T, Wagner GG, Steinhagen-Thiessen E. Cohort profile: The Berlin Aging Study II (BASE-II). *Int J Epidemiol* 2014;43:703-12.
4. Blanco-Vaca F, Martin-Campos JM, Perez A, Fuentes-Prior P. A rare STAP1 mutation incompletely associated with familial hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta* 2018;487:270-4.
5. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974;185:61-3.
6. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
7. Civeira F, International Panel on Management of Familial H. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;173:55-68.
8. Damgaard D, Larsen ML, Nissen PH, Jensen JM, Jensen HK, Soerensen VR, Jensen LG, Faergeman O. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis* 2005;180:155-60.
9. Danyel M, Ott CE, Grenkowitz T, Salewsky B, Hicks AA, Fuchsberger C, Steinhagen-Thiessen E, Bobbert T, Kassner U, Demuth I. Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia. *Sci Rep* 2019;9:11995.
10. Demuth I, Bertram L, Drewelies J, Düzel S, Lill CM, Lindenberger U, Pawelec G, Spira D, Wagner GG, Gerstorf D. Berlin Aging Study II (BASE-II). In: Gu D, Dupre ME, eds. *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*. Cham: Springer International Publishing; 2019:1-8.
11. Do R, Stitzel NO, Won HH, Jorgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, Kiezun A, Farrall M, Goel A, Zuk O, Guella I, Asselta R, Lange LA, Peloso GM, Auer PL, Project NES, Girelli D, Martinelli N, Farlow DN, DePristo MA, Roberts R, Stewart AF, Saleheen D, Danesh J, Epstein SE, Sivapalaratnam S, Hovingh GK, Kastelein JJ, Samani NJ, Schunkert H, Erdmann J, Shah SH, Kraus WE, Davies R, Nikpay M, Johansen CT, Wang J, Hegele RA, Hechter E, Marz W, Kleber ME, Huang J, Johnson AD, Li M, Burke GL, Gross M, Liu Y, Assimes TL, Heiss G, Lange EM, Folsom AR, Taylor HA, Olivieri O, Hamsten A, Clarke R, Reilly DF, Yin W, Rivas MA, Donnelly P, Rossouw JE, Psaty BM, Herrington DM, Wilson JG, Rich SS, Bamshad MJ, Tracy RP, Cupples LA, Rader DJ, Reilly MP, Spertus JA, Cresci S, Hartiala J, Tang WH, Hazen SL, Allayee H, Reiner AP, Carlson CS, Kooperberg C, Jackson RD, Boerwinkle E, Lander ES, Schwartz SM, Siscovick DS, McPherson R, Tybjaerg-Hansen A, Abecasis GR, Watkins H, Nickerson DA, Ardissino D, Sunyaev SR, O'Donnell CJ, Altshuler D, Gabriel S, Kathiresan S. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature* 2015;518:102-6.
12. Fahy EF, McCarthy E, Steinhagen-Thiessen E, Vaughan CJ. A case of autosomal recessive hypercholesterolemia responsive to proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibition. *J Clin Lipidol* 2017;11:287-8.
13. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JC, Zelcer N, Kastelein JJ, Defesche JC, Hovingh GK. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res* 2014;115:552-5.
14. Futema M, Bourbon M, Williams M, Humphries SE. Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2018;277:457-63.
15. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, Goldberg O, Drogari E, Mollaki V, Wiegman A, Defesche J, D'Agostino MN, D'Angelo A, Rubba P, Fortunato G, Walus-Miarka M, Hegele RA, Aderayo Bamimore M, Durst R, Leitersdorf E, Mulder MT, Roeters van Lennep JE, Sijbrands EJ, Whittaker JC, Talmud PJ, Humphries SE. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem* 2015;61:231-8.

16. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 2001;292:1394-8.
17. Genest J. Combination of statin and ezetimibe for the treatment of dyslipidemias and the prevention of coronary artery disease. *Can J Cardiol* 2006;22:863-8.
18. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1974;249:5153-62.
19. Grenkowitz T, Kassner U, Wuhle-Demuth M, Salewsky B, Rosada A, Zemojtel T, Hopfenmuller W, Isermann B, Borucki K, Heigl F, Laufs U, Wagner S, Kleber ME, Binner P, Marz W, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016;253:88-93.
20. Hegele RA, Knowles JW, Horton JD. Delisting STAP1: The Rise and Fall of a Putative Hypercholesterolemia Gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40:847-9.
21. Lamiquiz-Moneo I, Restrepo-Cordoba MA, Mateo-Gallego R, Bea AM, Del Pino Alberiche-Ruano M, Garcia-Pavia P, Cenarro A, Martin C, Civeira F, Sanchez-Hernandez RM. Predicted pathogenic mutations in STAP1 are not associated with clinically defined familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2020;292:143-51.
22. Lange LA, Hu Y, Zhang H, Xue C, Schmidt EM, Tang ZZ, Bizon C, Lange EM, Smith JD, Turner EH, Jun G, Kang HM, Peloso G, Auer P, Li KP, Flannick J, Zhang J, Fuchsberger C, Gaulton K, Lindgren C, Locke A, Manning A, Sim X, Rivas MA, Holmen OL, Gottesman O, Lu Y, Ruderfer D, Stahl EA, Duan Q, Li Y, Durda P, Jiao S, Isaacs A, Hofman A, Bis JC, Correa A, Griswold ME, Jakobsdottir J, Smith AV, Schreiner PJ, Feitosa MF, Zhang Q, Huffman JE, Crosby J, Wassel CL, Do R, Franceschini N, Martin LW, Robinson JG, Assimes TL, Crosslin DR, Rosenthal EA, Tsai M, Rieder MJ, Farlow DN, Folsom AR, Lumley T, Fox ER, Carlson CS, Peters U, Jackson RD, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Levy D, Rotter JI, Taylor HA, Gudnason V, Jr., Siscovick DS, Fornage M, Borecki IB, Hayward C, Rudan I, Chen YE, Bottinger EP, Loos RJ, Saetrom P, Hveem K, Boehnke M, Groop L, McCarthy M, Meitinger T, Ballantyne CM, Gabriel SB, O'Donnell CJ, Post WS, North KE, Reiner AP, Boerwinkle E, Psaty BM, Altshuler D, Kathiresan S, Lin DY, Jarvik GP, Cupples LA, Kooperberg C, Wilson JG, Nickerson DA, Abecasis GR, Rich SS, Tracy RP, Willer CJ, Project GOES. Whole-exome sequencing identifies rare and low-frequency coding variants associated with LDL cholesterol. *Am J Hum Genet* 2014;94:233-45.
23. Loaiza N, Hartgers ML, Reeskamp LF, Balder JW, Rimbart A, Bazioti V, Wolters JC, Winkelmeijer M, Jansen HPG, Dallinga-Thie GM, Volta A, Huijkman N, Smit M, Kloosterhuis N, Koster M, Svendsen AF, van de Sluis B, Hovingh GK, Grefhorst A, Kuivenhoven JA. Taking One Step Back in Familial Hypercholesterolemia: STAP1 Does Not Alter Plasma LDL (Low-Density Lipoprotein) Cholesterol in Mice and Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40:973-85.
24. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, Hegele RA, Raal FJ, Defesche JC, Wiegman A, Santos RD, Watts GF, Parhofer KG, Hovingh GK, Kovanen PT, Boileau C, Aversa M, Boren J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskiran MR, Tybjaerg-Hansen A, European Atherosclerosis Society Consensus P. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013;34:3478-90a.
25. Ohya K, Kajigaya S, Kitanaka A, Yoshida K, Miyazato A, Yamashita Y, Yamanaka T, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K, Mano H. Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11976-81.
26. Paquette M, Chong M, Theriault S, Dufour R, Pare G, Baass A. Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2017;11:725-32 e5.
27. Pattaro C, Gogele M, Mascalzoni D, Melotti R, Schwienbacher C, De Grandi A, Foco L, D'Elia Y, Linder B, Fuchsberger C, Minelli C, Egger C, Kofink LS, Zanigni S, Schafer T, Facheris MF, Smarason SV, Rossini A, Hicks AA, Weiss H, Pramstaller PP. The Cooperative Health Research in South Tyrol (CHRIS) study: rationale, objectives, and preliminary results. *J Transl Med* 2015;13:348.
28. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.
29. Sjouke B, Defesche JC, Hartgers ML, Wiegman A, Roeters van Lennep JE, Kastelein JJ, Hovingh GK. Double-heterozygous autosomal dominant hypercholesterolemia: Clinical characterization of an underreported disease. *J Clin Lipidol* 2016;10:1462-9.

30. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:587-91.
31. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, Harrison SC, Li K, Drenos F, Karpe F, Neil HA, Descamps OS, Langenberg C, Lench N, Kivimaki M, Whittaker J, Hingorani AD, Kumari M, Humphries SE. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet* 2013;381:1293-301.
32. Taylor A, Wang D, Patel K, Whittall R, Wood G, Farrer M, Neely RD, Fairgrieve S, Nair D, Barbir M, Jones JL, Egan S, Everdale R, Lolin Y, Hughes E, Cooper JA, Hadfield SG, Norbury G, Humphries SE. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet* 2010;77:572-80.
33. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, Pirruccello JP, Ripatti S, Chasman DI, Willer CJ, Johansen CT, Fouchier SW, Isaacs A, Peloso GM, Barbalic M, Ricketts SL, Bis JC, Aulchenko YS, Thorleifsson G, Feitosa MF, Chambers J, Orho-Melander M, Melander O, Johnson T, Li X, Guo X, Li M, Shin Cho Y, Jin Go M, Jin Kim Y, Lee JY, Park T, Kim K, Sim X, Twee-Hee Ong R, Croteau-Chonka DC, Lange LA, Smith JD, Song K, Hua Zhao J, Yuan X, Luan J, Lamina C, Ziegler A, Zhang W, Zee RY, Wright AF, Witteman JC, Wilson JF, Willemsen G, Wichmann HE, Whitfield JB, Waterworth DM, Wareham NJ, Waeber G, Vollenweider P, Voight BF, Vitart V, Uitterlinden AG, Uda M, Tuomilehto J, Thompson JR, Tanaka T, Surakka I, Stringham HM, Spector TD, Soranzo N, Smit JH, Sinisalo J, Silander K, Sijbrands EJ, Scuteri A, Scott J, Schlessinger D, Sanna S, Salomaa V, Saharinen J, Sabatti C, Ruukonen A, Rudan I, Rose LM, Roberts R, Rieder M, Psaty BM, Pramstaller PP, Pichler I, Perola M, Penninx BW, Pedersen NL, Pattaro C, Parker AN, Pare G, Oostra BA, O'Donnell CJ, Nieminen MS, Nickerson DA, Montgomery GW, Meitinger T, McPherson R, McCarthy MI, McArdle W, Masson D, Martin NG, Marroni F, Mangino M, Magnusson PK, Lucas G, Luben R, Loos RJ, Lokki ML, Lettre G, Langenberg C, Launer LJ, Lakatta EG, Laaksonen R, Kyvik KO, Kronenberg F, Konig IR, Khaw KT, Kaprio J, Kaplan LM, Johansson A, Jarvelin MR, Janssens AC, Ingelsson E, Igl W, Kees Hovingh G, Hottenga JJ, Hofman A, Hicks AA, Hengstenberg C, Heid IM, Hayward C, Havulinna AS, Hastie ND, Harris TB, Haritunians T, Hall AS, Gyllensten U, Guiducci C, Groop LC, Gonzalez E, Gieger C, Freimer NB, Ferrucci L, Erdmann J, Elliott P, Ejebe KG, Doring A, Dominiczak AF, Demissie S, Deloukas P, de Geus EJ, de Faire U, Crawford G, Collins FS, Chen YD, Caulfield MJ, Campbell H, Burt NP, Bonnycastle LL, Boomsma DI, Boehholdt SM, Bergman RN, Barroso I, Bandinelli S, Ballantyne CM, Assimes TL, Quertermous T, Altshuler D, Seielstad M, Wong TY, Tai ES, Feranil AB, Kuzawa CW, Adair LS, Taylor HA, Jr., Borecki IB, Gabriel SB, Wilson JG, Holm H, Thorsteinsdottir U, Gudnason V, Krauss RM, Mohlke KL, Ordovas JM, Munroe PB, Kooner JS, Tall AR, Hegele RA, Kastelein JJ, Schadt EE, Rotter JI, Boerwinkle E, Strachan DP, Mooser V, Stefansson K, Reilly MP, Samani NJ, Schunkert H, Cupples LA, Sandhu MS, Ridker PM, Rader DJ, van Duijn CM, Peltonen L, Abecasis GR, Boehnke M, Kathiresan S. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010;466:707-13.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Magdalena Danyel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie und *STAP1* Genanalyse“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen der Promotionsverfahren zum PhD bzw. MD/PhD

Magdalena Danyel hat für die Publikation „*Danyel M, Ott CE, Grenkowitz T, Salewsky B, Hicks AA, Fuchsberger C, Steinhagen-Thiessen E, Bobbert T, Kassner U, Demuth I., Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia. Scientific Reports, 2019*“ selbstständig alle Sequenzierungsanalysen in den Genen *STAP1* und *LDLRAP1* sowie die Auswertung der molekulargenetischen Befunde (Sequenzierdaten) der Berliner FH Kohorte durchgeführt. Die im Zuge der vorausgehenden Publikation von Dr. Grenkowitz erstellte klinische Datenbank wurde übernommen und von Frau Danyel für die vorliegende Arbeit umfassend ergänzt. Frau Danyel führte die statistische Auswertung der Daten der CHRIS-Studie durch und wurde hier fachlich vom Dr. Claus-Eric Ott unterstützt. Die Abbildungen (Figure 2) und Tabellen (Tabelle 1 und 2) wurden durch Magdalena Danyel selbstständig erstellt. Der erste Manuskriptentwurf wurde von Magdalena Danyel geschrieben. Herr Dr. Claus-Eric Ott und Prof. Ilja Demuth waren an der folgenden Überarbeitung des Manuskriptes beteiligt, bevor das Manuskript dann allen Ko-Autoren zur finalen Abstimmung übermittelt wurde. Auch die Revision des Manuskriptes nach Begutachtung durch die Reviewer/ Scientific Reports wurde zum überwiegenden Teil von Frau Danyel bearbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

7 Auszug der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 64 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	710,766	41.577	1.355810
2	SCIENCE	645,132	41.058	1.127160
3	Nature Communications	178,348	12.353	0.926560
4	Science Advances	10,194	11.511	0.057080
5	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	637,268	9.504	1.108220
6	National Science Review	952	9.408	0.004340
7	GigaScience	1,694	7.267	0.011030
8	Scientific Data	1,567	5.305	0.008550
9	Journal of Advanced Research	1,843	4.327	0.003820
10	Annals of the New York Academy of Sciences	46,160	4.277	0.033270
11	Science Bulletin	1,952	4.136	0.005900
12	Scientific Reports	192,841	4.122	0.718960
13	Journal of the Royal Society Interface	11,357	3.355	0.030960
14	Research Synthesis Methods	1,374	3.218	0.006030
15	PLoS One	582,877	2.766	1.862350
16	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	17,807	2.746	0.028220
17	Royal Society Open Science	2,145	2.504	0.009260
18	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	17,157	2.410	0.018270
19	PeerJ	7,377	2.118	0.031600
20	NPJ Microgravity	94	2.000	0.000350
21	SCIENCE AND ENGINEERING ETHICS	1,496	1.859	0.002520
22	COMPLEXITY	1,369	1.829	0.002380
23	Science of Nature	324	1.789	0.001260

8 Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Danyel M, Ott CE, Grenkowitz T, Salewsky B, Hicks AA, Fuchsberger C, Steinhagen-Thiessen E, Bobbert T, Kassner U, Demuth I., Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia. Scientific Reports, 2019

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Publikationsliste

1. **Danyel M**, Ott CE, Grenkowitz T, Salewsky B, Hicks AA, Fuchsberger C, Steinhagen-Thiessen E, Bobbert T, Kassner U, Demuth I., Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia. *Sci Rep* 2019; 9:11995, **IF: 4.011**
2. **Danyel M**, Cheng Z, Jung C, Boschann F, Pantel JT, Hajjir N, Flöttmann R, Schulz S, Demuth I, Sheridan E, Mundlos S, Horn D, Mensah MA., Differentiation of MISSLA and Fanconi anaemia by computer-aided image analysis and presentation of two novel MISSLA siblings. *Eur J Hum Genet* 2019; 27:1827-35, **IF: 4.349**.
3. Hsieh TC, Mensah MA, Pantel JT, Aguilar D, Bar O, Bayat A, Becerra-Solano L, Bentzen HB, Biskup S, Borisov O, Braaten O, Ciaccio C, Coutelier M, Cremer K, **Danyel M**, Daschkey S, Eden HD, Devriendt K, Wilson S, Douzgou S, Đukić D, Ehmke N, Fauth C, Fischer-Zirnsak B, Fleischer N, Gabriel H, Graul-Neumann L, Gripp KW, Gurovich Y, Gusina A, Haddad N, Hajjir N, Hanani Y, Hertzberg J, Hoertnagel K, Howell J, Ivanovski I, Kaindl A, Kamphans T, Kamphausen S, Karimov C, Kathom H, Keryan A, Knaus A, Köhler S, Kornak U, Lavrov A, Leitheiser M, Lyon GJ, Mangold E, Reina PM, Carrascal AM, Mitter D, Herrador LM, Nadav G, Nöthen M, Orrico A, Ott CE, Park K, Peterlin B, Pölsler L, Raas-Rothschild A, Randolph L, Revencu N, Fagerberg CR, Robinson PN, Rosnev S, Rudnik S, Rudolf G, Schatz U, Schossig A, Schubach M, Shanoon O, Sheridan E, Smirin-Yosef P, Spielmann M, Suk EK, Sznajer Y, Thiel CT, Thiel G, Verloes A, Vreacar I, Wahl D, Weber I, Winter K, Wiśniewska M, Wollnik B, Yeung MW, Zhao M, Zhu N, Zschocke J, Mundlos S, Horn D, Krawitz PM., PEDIA: prioritization of exome data by image analysis., *Genet Med* 2019; 21:2807-14, **IF: 8.683**.
4. **Danyel M**, Suk EK, Raile V, Gellermann J, Knaus A, Horn D., Familial Xp11.22 microdeletion including SHROOM4 and CLCN5 is associated with intellectual disability, short stature, microcephaly and Dent disease: a case report. *BMC Med Genomics* 2019;12:6, **IF: 3.062**.
5. **Danyel M**, Kortüm F, Dathe K, Kutsche K, Horn D., Autosomal dominant Robinow syndrome associated with a novel DVL3 splice mutation. *Am J Med Genet A*. 2018;176:992-6, **IF: 2.197**.
6. Krull C, Schoepke N, Ohanyan T, **Brachaczek M**, Maurer M, Lange-Asschenfeldt B, Metz M., Increased angiogenesis and VEGF expression correlates with disease severity in prurigo patients, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:1357-61, **IF: 5.113**

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ilja Demuth für die hervorragende Betreuung meiner Promotion und das anhaltende Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit bedanken.

Für die herzliche Begleitung und Beratung im Labor danke ich meiner Arbeitsgruppe *Biologie des Alterns*, insbesondere Herrn Dipl.-Ing. Bastian Salewsky.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Claus-Eric Ott, der durch seine konstruktive Kritik und fachliche Expertise maßgeblich zur Publikation unseres Artikels beigetragen hat.

Abschließend möchte ich ganz besonders meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann, Dr. med. Leon A. Danyel danken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben und mir stets mit Verständnis und gutem Rat zur Seite stehen.