

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

DISSERTATION

Clinical and molecular genetic characterization of patients with
familial hypercholesterolemia

Klinische und molekulargenetische Charakterisierung von
Patient*innen mit Familiärer Hypercholesterinämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lorenz Rieck

aus Baden-Baden

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhalt

1. Abstrakt Deutsch	2
2. Abstrakt Englisch	3
3. Manteltext	5
3.1. Einführung	5
3.2. Methoden	10
3.2.1. Patient*innen und Rekrutierung	10
3.2.2. Datenaufbereitung und Datenanalyse	10
3.2.3. SNP-Genotypisierung	11
3.2.4. Klinische Diagnostik	14
3.2.5. Mutationsscreening	14
3.2.6. Lp(a)-Anpassung	15
3.3. Ergebnisse	15
3.3.1. Mutationsspektrum	15
3.3.2. Neue Sequenzvarianten	16
3.3.3. Klinische und genetische Diagnostik	16
3.3.4. 6-SNP polygener Score	17
3.3.5. Lp(a)-Anpassung Überblick	19
3.3.6. FH-Diagnostik unter Lp(a)-Anpassung	21
3.4. Weiterführende Fragestellung und klinische Anwendung	25
3.5. Literaturverzeichnis	34
3.6. Abbildungsverzeichnis	40
4. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung	40
5. Auszug aus der Journal Summary List	43
6. Druckexemplar Publikation: Rieck et al. Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia. Clin Genet, 2020. p. 457-467	45
7. Lebenslauf	56
8. Komplette Publikationsliste	58

1. Abstrakt Deutsch

Hintergrund und Ziele

Die Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine genetisch bedingte Krankheit mit autosomal-dominantem Vererbungsmodus, welche durch erhöhte Serumspiegel von Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL-C) und ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (CVD) gekennzeichnet ist. Mutationen in drei Hauptgenen wurden mit FH in Verbindung gebracht: das *LDL-Rezeptor* Gen (*LDLR*), das *Apolipoprotein-B* Gen (*APOB*) und das *Proprotein-Convertase-Subtilisin / Kexin-9* Gen (*PCSK9*). Darüber hinaus beschreiben aktuelle Forschungsergebnisse eine polygene Ätiologie der Erkrankung, welche mithilfe von sechs Einzelnukleotid-Polymorphismen erfasst werden kann. Ein weiterer unabhängiger genetisch bedingter CVD-Risikofaktor ist das erhöhte Lipoprotein(a) [Lp(a)]. Neue Studienergebnisse zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen zu hoch gemessenen LDL-C-Werten und erhöhten Lp(a)-Werten besteht. In der vorliegenden Arbeit wird das Spektrum von FH-verursachenden Mutationen, sowie die mögliche polygene Ätiologie dieser Erkrankung in Deutschland untersucht. Außerdem wird der Einfluss des Lp(a) in der Diagnostik der FH dargestellt.

Methoden

Es wurden die molekulargenetischen Daten von 336 FH-Patient*innen auf Mutationen in der kodierenden Region der Gene *LDLR*, *PCSK9* und *APOB* untersucht. Darüber hinaus wurden die Patient*innen nach dem Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) Score kategorisiert. Außerdem wurde bei den Patient*innen mit Hypercholesterinämie und 1985 nicht betroffenen Proband*innen der Berliner Altersstudie II (BASE-II) der polygene Risiko-Score errechnet. Für die Lp(a)-Anpassung der LDL-C-Werte wurde die geschätzte Masse des im Lp(a) gebundenen Cholesterins vom nativen LDL-C-Messwert der Patient*innen abgezogen.

Ergebnisse

117 der 336 Patient*innen mit Hypercholesterinämie hatten eine krankheitsverursachende Veränderung in einem der oben genannten Gene. Die meisten Sequenzvarianten waren vom Missense-Typ (44,4%) und wurden wie erwartet im *LDLR*-Gen entdeckt (84,9%). Außerdem wurden elf vorher noch nicht bekannte Mutationen detektiert, ebenfalls im *LDLR*-Gen.

Der polygene Risiko-Score konnte für die 336 Patient*innen und 1985 BASE-II-Teilnehmer*innen berechnet werden. In einer linearen Regressionsanalyse konnte festgestellt werden, dass nur ca. 3% der Varianz der LDL-C-Werte durch den polygenen Score erklärt werden kann.

Ca. 8% der Patient*innen haben nach der Lp(a)-Anpassung der LDL-C-Werte keine nach dem DLCN-Score klassifizierte FH mehr. Bei 7% der Patient*innen ohne krankheitsverursachende Mutation mit LDL-C-Werten unter 190 mg/dl stellt ein erhöhtes Lp(a) (>50 mg/dl) die Ursache für die hohen LDL-C-Werte dar.

Schlussfolgerungen

Diese Studie bestätigt die klinische und genetische Heterogenität der FH in deutschen Patient*innen und legt nahe, dass der hier untersuchte polygene Score kein verlässliches Werkzeug für die FH-Diagnostik ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Lp(a)-Anpassung der LDL-C-Werte eine wichtige Rolle in der FH-Diagnostik spielt.

2. Abstrakt Englisch

Background and aims

Autosomal-dominant familial hypercholesterolemia (FH) is a common genetic disorder which is characterized by high serum concentrations of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and a substantially elevated risk to develop cardiovascular disease (CVD). Mutations in three major genes are known to cause

FH: the *LDL receptor* gene (*LDLR*), the *apolipoprotein B* gene (*APOB*) and the *proprotein convertase subtilisin/kexin 9* gene (*PCSK9*). Recent studies discuss a possible polygenic aetiology of the disease which can be assessed by six single nucleotide polymorphisms. Also of interest is the adjustment of the LDL-C values for the cholesterol content of Lipoprotein(a) (Lp(a)), which is a genetically determined risk factor for CVD. The aim of the current study is to analyze the mutation spectrum, determine the polygenic risk score proposed by Futema et al. (Clin. Chem., 2015) and to evaluate the impact of Lp(a)-adjustment on the FH-Diagnosis in a cohort of phenotypically well characterized hypercholesterolemic patients.

Methods

In this study we screened 336 patients who were clinically suspected to have FH using the Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCN score) for mutations in the coding region of *LDLR*, *APOB* and *PCSK9*. In addition, we genotyped the six single nucleotide polymorphisms (SNPs) highlighted by Futema et al. (Clin. Chem., 2015) to calculate the polygenic risk score for the 336 FH patients and a control group of 1985 predominantly healthy participants recruited from the Berlin Aging Study (BASE-II). For Lp(a)-adjustment the estimated Lp(a)-Cholesterol was subtracted from the baseline LDL-C values of the patients.

Results

One hundred seventeen of the 336 patients from the FH cohort had a causative variant in one of the analyzed genes. As expected, most sequence variants were found in the *LDLR* gene (84.9%) out of which 44.4% were of the missense type. In addition, we detected 11 novel sequence variants in this gene.

We obtained the polygenic risk score for 336 patients of the FH cohort and 1985 BASE-II participants used as controls. In accordance with previous studies, FH mutation positive patients ($p < .05$) and healthy controls ($p < .001$) had a significantly lower score than FH mutation negative patients. In a linear regression analysis, the 6-SNP polygenic score only explains about 3% of LDL-C variation in our patients. After Lp(a)-adjustment about 8% of the patients originally classified to have FH based on the DLCN score were not classified as such any longer. In 7% of the

mutation negative patients with adjusted LDL-C values below 190 mg/dl high Lp(a) values (>50 mg/dl) could be the cause for their hypercholesterolemia.

Conclusions

This study further verifies the clinical and genetic heterogeneity of FH in German patients and shows that the 6-SNP polygenic risk score has little diagnostic value for the individual patient. Furthermore Lp(a)-adjustment substantially impacts the FH-Diagnosis.

3. Manteltext

3.1. Einführung

Die Familiäre Hypercholesterinämie (FH, OMIM 143890) ist eine genetisch bedingte Krankheit mit autosomal-dominantem Erbgang und einer Prävalenz von 1:250 unter weißen Nordeuropäer*innen. Höhere Prävalenzen können in isolierten Regionen mit Founder-Effekt auftreten. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch lebenslang erhöhte Serum-Werte von Low-Density Lipoprotein Cholesterin (LDL-C) durch einen gestörten hepatischen Umsatz und einem daraus resultierenden substanziiell erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD). Durch eine frühzeitige Diagnose kann dieses Risiko jedoch mit adäquater Lipid-senkender Therapie reduziert werden [1, 2]. Allgemeine Richtwerte für die Einleitung einer Diagnostik und den Start einer Therapie sind stark erhöhte LDL-C-Werte von über 190 mg/dl (Kinder >150 mg/dl), aufgetretene kardiovaskuläre Komplikationen vor dem 55. Lebensjahr bei Männern und vor dem 60. Lebensjahr bei Frauen, Verwandte mit Sehnenxanthomen, Verwandte ersten Grades mit vorzeitiger tödlicher oder nicht-tödlicher CVD-Anamnese und Verwandte mit einer schon diagnostizierten FH [3]. Für die klinische Diagnose sind einige Scores entwickelt worden, welche die genauere Einordnung des Phänotyps ermöglichen. In Europa weit verbreitet ist der Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) Score. Dieses, auf einem Punktesystem basierende Rating, umfasst die klinische Familiengeschichte, die Patient*innenanamnese, körperliche Untersuchungsbefunde wie Sehnenxanthome oder einen kornealen Arcus lipoides, Serum-LDL-C-Werte und die Ergebnisse einer molekulargenetischen Untersuchung. Bei Patient*innen mit einem Score <3 und 3-5 ist das Vorliegen einer FH

unwahrscheinlich beziehungsweise *möglich*. Punktwerte von 6-8 und >8 bedeuten eine *wahrscheinliche* beziehungsweise *definitive* FH-Diagnose [2]. Mutationen in drei Genen sind ursächlich für die Familiäre Hypercholesterinämie: das *Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Gen (LDLR)*, welches die Aufnahme des LDL-C in die Hepatozyten vermittelt, das *Apolipoprotein-B-Gen (APOB)*, ein Ligand des LDL-C und das *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 Gen (PCSK9)*, welches den Umsatz des LDL-Rezeptors kontrolliert [4-6]. Darüber hinaus verursachen Sequenzvarianten im *LDL-Rezeptor Adapter Protein 1 Gen (LDLRAP1)*, die sehr seltene Form der Hypercholesterinämie mit autosomal-rezessivem Vererbungsmodus, kurz AR-Hypercholesterinämie, mit einem der FH ähnlichen Phänotyp [7]. Mit fast 2000 bekannten Sequenzvarianten befinden sich die meisten FH-verursachenden Veränderungen im *LDL-Rezeptor-Gen* (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/LDLR>) [8]. Dies entspricht auch den Ergebnissen in der deutschen Population, mit den meisten Varianten im *LDLR-Gen* und vom Missense-Typ [9]. Aktuell stehen zur Therapie der FH neben Lebensstil-Änderungen, wie mehr Bewegung und einer Ernährungsanpassung hin zu einer mediterranen Diät, einige medikamentöse Möglichkeiten zur Verfügung. Grundpfeiler der medikamentösen Therapie sind HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine), welche zum Beispiel mit Cholesterinresorptionshemmern wie Ezetimib und Bempedoinsäure kombiniert werden können. Des Weiteren gibt es Therapieoptionen mittels Ionen-Austauscherharzen und als letzte Wahl bei simultan erhöhten Triglyzerid-Werten, Fibrate [9]. Seit einiger Zeit sind auch PCSK9-Inhibitoren etablierter Teil der Therapie, welche als Reaktion auf die Entdeckung der Sequenzvarianten im *PCSK9-Gen* entwickelt wurden [3].

Nachdem bei Patient*innen mit erhöhten LDL-C-Werten durch den DLCN-Score ein erhöhtes Risiko für das Vorliegen der Familiären Hypercholesterinämie erkannt wird, erfolgt in aller Regel eine molekulargenetische Untersuchung zur Sicherung der Diagnose. Nun gibt es zwei mögliche offensichtliche Ergebnisse dieser Untersuchung: entweder hat der*die Patient*in eine Mutation in einem der drei oben genannten FH-verursachenden Gene oder es ist nach den aktuellen Untersuchungsstandards keine Sequenzvariation zu finden, welche die erhöhten LDL-C-Werte plausibel erklären kann (vorausgesetzt alle Ursachen, die für eine sekundäre Hypercholesterinämie sprechen, wurden im Vorfeld ausgeschlossen). Für den Fall, dass der*die Patient*in positiv auf eine genetische Variante getestet wurde,

ist es erforderlich diese bezüglich ihrer Auswirkung einzuordnen. Eine gute Möglichkeit bietet hier die Klassifikation des American College of Medical Genetics (ACMG), welche die Sequenzvarianten nach bestimmten Kriterien entweder als *pathogen*, *benigne* oder als *Varianten von unsicherer Signifikanz* (VUS) einordnen [10]. Einige Varianten sind mittlerweile gut erforscht und kommen durch Founder-Effekte in hohen Fallzahlen in bestimmten Populationen vor, wodurch es möglich ist eine sichere Diagnose zu stellen. Trotzdem sind aktuell nur ca. 10 % der Varianten, welche in den drei kanonischen Genen liegen, sicher durch funktionelle Studien als *pathogen* eingeordnet worden [11]. Auch werden mit jeder Studie neue Sequenzvarianten entdeckt, was die Bedeutung und den Nutzen der fortlaufenden Analyse des Mutationsspektrums unterstreicht.

Die korrekte Klassifizierung und Analyse dieser neu entdeckten Varianten und auch der schon bestehenden, wie in der vorliegenden Dissertation, ist somit die Grundlage für eine adäquate Therapie und Risikostratifizierung bei Patient*innen mit Familiärer Hypercholesterinämie. Bei einem negativen Ergebnis der genetischen Testung, i.e. keiner als *pathogen* klassifizierten Sequenzvariation in den FH-verursachenden Genen, gibt es somit derzeit keine sichere Erklärung für die erhöhten LDL-C-Werte. Ein aktuelles Problem besteht darin, dass zwar bei ca. 60-80% der mit dem DLCN-Score als *definitive* FH-Patient*innen eingestuft eine genetische Ursache gefunden wird, dies aber nur bei 20-30% der *möglichen* FH-Patient*innen möglich ist [12, 13]. Somit bleiben fast 60% der klinisch erfassten Patient*innen ohne sichere genetische Diagnose, was in der täglichen Patient*innenversorgung einige Probleme bereitet. Ein Beispiel wären die möglicherweise adäquateren Therapieoptionen, wenn man eine sichere Ursache für die erhöhten LDL-C-Werte findet. Mögliche Ursachen für diese diagnostische Lücke sind: aktuell noch nicht identifizierte FH-verursachende Sequenzvarianten, multifaktorielle polygene Ursachen und epigenetische Modifikationen. In dieser Hinsicht wurde bereits die Variante *APOE* c.500_502delTCC (p.Leu167del) als eine potenzielle vierte FH-verursachende Mutation identifiziert [14]. Des Weiteren wurde die Variante *STAP1* als FH-verursachende Mutation gehandelt, was allerdings in einer aktuellen Studie an 75, in den bekannten Genen mutationsnegativen, Patient*innen mit Hypercholesterinämie aus Berlin in unserem Labor nicht bestätigt werden konnte [15, 16]. Darüber hinaus wurde *STAP1* kürzlich auch durch eine Studie an Mausmodellen und *STAP1*-Mutationsträger*innen als FH-Gen weitgehend ausgeschlossen [17]. Nach Abschluss

groß ausgelegter Sequenzierungsprojekte in den letzten Jahren ist es allerdings sehr unwahrscheinlich, dass noch weitere Varianten gefunden werden, welche den FH-Phänotyp einer großen Population von Patient*innen erklären. Im Jahr 2010 wurden die Daten einer Metanalyse von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) veröffentlicht, welche 95 Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) identifizierte, die mit erhöhten LDL-C-Werten assoziiert waren [18]. Diese Daten legten nahe, dass es eine mögliche polygene Ätiologie der erhöhten LDL-C-Werte in den mutationsnegativen FH-Patient*innen geben könnte. Talmud et al. entwickelten aufgrund dessen einen Score, der auf den zwölf am stärksten mit erhöhten LDL-C assoziierten SNPs basiert [13]. Dieser 12-SNP polygene Score war signifikant höher in Patient*innen ohne eine FH-verursachende Mutation als in mutationspositiven Patient*innen und der Kontrollkohorte Whitehall II. Futema et al. überarbeiteten diesen Score und reduzierten die Anzahl der berücksichtigten SNPs auf sechs (6-SNP polygener Score). Dieser Score konnte die vorherigen Ergebnisse von Talmud et al. anhand von Datensätzen aus sechs verschiedenen Ländern reproduzieren. Die Autor*innen kamen zu der Annahme, dass bei ca. 90% der mutationsnegativen Patient*innen eine polygene Ätiologie der Erkrankung zu Grunde liegt [19]. Inwiefern der Score eine genaue Vorhersage beziehungsweise Rückschlüsse über das LDL-C und damit die Risikostratifizierung des*der einzelnen Patient*innen zulässt, wurde in diesen Studien nicht genauer analysiert. Somit bleibt weiterhin ungeklärt, ob eine auf den 6-SNP polygenen Score aufbauende polygene Ätiologie für die erhöhten LDL-C-Werte der Patient*innen mit Hypercholesterinämie verantwortlich ist.

Ein weiterer schon länger bekannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist das Lipoprotein(a), welches in den meisten Fällen bei Patient*innen mit Verdacht auf eine FH mit erhoben wird [20]. In der Empfehlung der ESC-Guidelines 2019 wird eine mindestens einmalige Messung der Lp(a)-Werte im Leben eines*einer Patient*in angeraten, um Patient*innen mit extrem hohen Lp(a)-Werten zu identifizieren [3]. Lipoprotein(a) ähnelt dem LDL-C und besteht aus Lipoprotein niedriger Dichte (LDL), welches mit einem zusätzlichem Apolipoprotein(a) verbunden ist. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und die Höhe der Lp(a)-Werte sind bei Patient*innen weitgehend genetisch und überwiegend durch Polymorphismen im *LPA*-Gen determiniert [21]. Ein angestrebter Wert für eine kardiovaskuläre Risikoreduktion wäre ein Lp(a) von unter 50 mg/dl. Werte von über 50 mg/dl sind in

ca. 20% der weißen Nordeuropäer*innen vorhanden [20]. Therapeutisch bieten aktuell PCSK-9-Inhibitoren mit einer Reduktion der Lp(a)-Werte von 20-40% (entsprechend einer Netto-Absenkung im Median von 10mg/dl) eine Möglichkeit, wobei der Wirkmechanismus, über den Lp(a) gesenkt wird, noch nicht ausreichend geklärt ist und weiter fraglich bleibt, weshalb Statine, welche den LDL-Rezeptor hochregulieren keine vergleichbaren Ergebnisse erzielen [3]. Manche Studien beschreiben sogar einen Anstieg der Lp(a)-Werte unter Statintherapie [22, 23]. Des Weiteren sind RNA-basierte Therapiemöglichkeiten aktuell als Phase II-III-Studien in Untersuchung [24].

Aufgrund der Ähnlichkeit zum LDL-C ist es laborchemisch schwierig den Cholesterinanteil des Lp(a) von dem des LDL-C zu trennen. Durch Ergebnisse verschiedener biochemischer Laboranalysen wird davon ausgegangen, dass der Cholesterin-Anteil im Lp(a) ca. 30% der gesamten Lp(a)-Masse ausmacht. Menschen mit erhöhten Lp(a)-Werten hätten durch diese Überschneidung somit ein geringeres „echtes“ LDL-C [25-27]. Manche Quellen schätzen den Anteil des Lp(a)-Cholesterins sogar auf 45% der gesamten Lp(a)-Masse ein [28]. Für die Diagnose der FH hat dies eine Bedeutung, da sie neben der genetischen Testung hauptsächlich auf dem LDL-C-Wert der Patient*innen basiert. Das durch Lp(a)-Cholesterin bedingte CVD-Risiko muss aber vom separat bestehenden Risiko des Lp(a) gesehen werden. Bei der Pathogenität des Lp(a) spielen die Apolipoprotein B-100-Einheit, die thrombogen wirkende Apolipoprotein(a)-Einheit mit hoher Strukturhomologie zum Plasminogen und darin enthaltene proinflammatorische oxidierte Phospholipide eine Rolle [29]. Somit haben Patient*innen mit jeweils erhöhten Lp(a)- und LDL-C-Werten ein noch höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [30]. Die Anpassung der LDL-C-Werte an die Lp(a)-Masse ist Thema einiger aktueller Studien und wird in Zukunft wahrscheinlich in die FH-Diagnostik implementiert werden [30-33].

In der vorliegenden Dissertation wird das aktuelle Mutationsspektrums in 336 deutschen Patient*innen mit Hypercholesterinämie analysiert. Außerdem wird der vorher beschriebene 6-SNP polygene Score für diese Patient*innenkohorte reproduziert und in Kontrolle mit über 2000 nicht betroffenen Individuen der Berliner Altersstudie II (BASE-II) hinsichtlich seiner Anwendbarkeit in der klinischen Praxis getestet [34]. Des Weiteren wird der Einfluss des Lp(a)-Cholesterins bei der

Diagnostik der FH dargestellt und der Anteil der hierdurch erklärten Hypercholesterinämie bei Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation ermittelt.

3.2. Methoden

3.2.1. Patient*innen und Rekrutierung

In der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studie, wurden 336 Patient*innen mit Hypercholesterinämie der Lipidambulanz der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingeschlossen. Die Patient*innen wurden zwischen 2016 und 2019 rekrutiert und haben alle ihr schriftliches Einverständnis vor dem Studienbeginn gegeben (Zulassungsnummer EA2/089/14).

Als Vergleichskohorte wurden die Ersterhebungsdaten der Berliner Altersstudie II (BASE-II) herangezogen. Die Teilnehmer*innen dieser Längsschnittstudie (Erstuntersuchung 2009 bis 2015) kommen aus dem Großraum Berlin und waren zu Studienbeginn überdurchschnittlich gesund. Von 1946 Studienteilnehmer*innen waren die LDL-C-Werte, sowie die für den 6-SNP polygenen Score benötigten Genotypisierungsdaten vorhanden. Alle Teilnehmer*innen gaben ihr schriftliches Einverständnis und die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin geprüft und zugelassen (Zulassungsnummer EA2/029/09) [34-36].

3.2.2. Datenaufbereitung und Datenanalyse

Die Daten der anfangs über 400 Patient*innen mit Hypercholesterinämie wurden durch eine umfassende Analyse der Patient*innenakten in einer SPSS-Datei zusammengefasst, welche Labordaten, Therapiedaten, essenzielle Informationen der Familienanamnese und des klinischen Phänotyps umfasst. Hierbei handelt es sich um Patient*innenakten der Lipidambulanz der Charité, welche über einen SAP-Zugang erreichbar waren. Im Falle einer unvollständigen, beziehungsweise unzureichenden Datenlage, wurden einige Datensätze von der Datei ausgeschlossen. Für Patient*innen mit einer FH-verursachenden Sequenzvariation wurde ein separates Verzeichnis angelegt. Hierbei wurden den insgesamt 73 verschiedenen Mutationsvarianten die jeweiligen Patient*innen zugeordnet und diese wurden um die klinischen Phänotypen ergänzt.

Im Falle der BASE-II-Kontrollkohorte wurden die Daten nach Antragstellung bei der Studienleitung anhand einer SPSS-Datei zur Verfügung gestellt. Hier handelt es sich um Alter, Geschlecht, LDL-C-Wert bei Studienbeginn und die Information zu den für die Erstellung des 6-SNP polygenen Scores notwendigen Genotypen.

Für die statistische Analyse wurde die International Business Machines Corporation (IBM) SPSS Version 24.0 (IBM Statistical Product and Service Solutions (SPSS) Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.) verwendet. Die Grafiken wurden mit GraphPad Prism 7, MS Excel 2016 und SPSS Version 24.0 realisiert und für die Sequenzanalyse GeneMapper 5 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die statistische Signifikanz wurde mit $p < ,05$ definiert.

3.2.3. SNP-Genotypisierung

Der von Futema et al. (2015) beschriebene 6-SNP polygene Score berücksichtigt folgende Polymorphismen: rs1367117, rs429358, rs7412, rs629301, rs6511720 und rs6544713 (Proxy für rs4299376, $r^2 = 1,0$ in der Europäischen Population (CEU, i.e. Utah Residents with Northern and Western European Ancestry) basierend auf (<https://ldlink.nci.nih.gov/>)). Von diesen sechs SNPs lagen für 336 Patient*innen mit Hypercholesterinämie aus den Next Generation Sequencing (NGS)-Daten, die im Zusammenhang mit der molekulardiagnostischen Untersuchung durch die Labor Berlin GmbH erhoben wurden, bereits drei Genotypen zur Auswertung vor (rs1367117, rs429358, rs7412). Die fehlenden drei SNPs wurden für die Studie mittels einer SNaPshot-Analyse genotypisiert. Hierbei handelt es sich um eine Methode, um SNPs an vorher bekannten Genloci in Patient*innen-DNA zu erfassen. Hierbei verwendet man mehrere Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) mit vorher genau auf die SNPs in Frage entworfenen Primern und in vier Farben fluoreszierenden ddNTPs (Didesoxyribonukleosid-Triphosphate). Die Primer binden an ihre komplementären Stränge in der Anwesenheit der DNA-Polymerase und der fluoreszierenden ddNTPs. Die DNA-Polymerase verlängert den Primer um ein Nukleotid, nämlich das fluoreszierende ddNTP am 3'-Ende. Nun kann mittels eines DNA-Analyzers aufgrund der Höhe und Farbe des jeweiligen Peaks der SNP analysiert werden.

Dafür wurde die Patient*innen-DNA benutzt, welche vorher nach Standard-Verfahren aus EDTA-Vollblut extrahiert wurde. Die genomische DNA lag in den Proben in einer Konzentration von 50-100ng/ μ l vor. Zuerst wurden die DNA-Proben zentrifugiert und

mit 10µl Elutionspuffer (Promega) verdünnt. Für die Genotypisierung wurde das ABI Prism SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) mit einigen Modifikationen und Anpassungen verwendet. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden je nach Probenanzahl konsequent die Geräte GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) oder ProFlex PCR System (Applied Biosystems) verwendet. Das ProFlex PCR System wurde verwendet, um die PCR-Bedingungen zu optimieren und das PCR System 9700 mit seinen zweimal 96 Kavitäten, um die Analyse bei vielen Patient*innen auf einmal durchzuführen. Um die SNaPshot-Reaktion zu messen, wurde ein 3730 DNA-Analyzer XL System (Applied Biosystems, HITACHI) verwendet. Zuerst wurden hierfür die drei Oligonukleotide (zwei PCR-Primer und ein SNaPshot-Primer) für jeden SNP-Locus mittels [\(<https://www.eurofinsgenomics.eu/de>\)](https://www.eurofinsgenomics.eu/de) entworfen. Die Primer-Oligonukleotide (eurofins Genomics) wurden auf 100pmol/µl mit HPLC-gereinigtem (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) Wasser verdünnt. Genaue Daten zu den Oligonukleotid-Primer-Paaren finden sich im Supplement der Publikation [37]. Die komplette Reaktion (sowohl die PCR, als auch die SNaPshot-Reaktion) waren als Multiplex-System geplant, wobei es sich um ein effizientes Verfahren handelt, bei welchem bis zu 10 SNPs in einer einzigen Reaktion analysiert werden können. Durch unterschiedliche Annealing-Temperaturen der PCR-Primer wurde diese allerdings separat für die drei SNPs durchgeführt und nur bei der darauffolgenden SNaPshot-Reaktion ein Multiplex-Verfahren angewandt. Vorher wurden die Reaktionen mittels Kontroll-DNA bezüglich der PCR-Bedingungen optimiert.

Im Folgenden das exakte Laborprotokoll: Der PCR-Mix umfasste 14,8 µl durch HPLC gereinigtes Wasser (Acros Organics), 2,5 µl 10-fach konzentrierte Polymerase-Pufferlösung (SolisBioDyne), 1,5 µl 25mM MgCl₂ (Magnesiumchlorid) (SolisBioDyne), 2µl 10mM dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) (Bioline), 1,5µl 5µM Vorwärts-PCR-Primer, 1,5 µl 5µM Rückwärts-PCR-Primer und 0,2 µl 5U/µl thermostabile DNA-Polymerase (SolisBioDyne), welche zu 1,0 µl Patient*innen-DNA gegeben wurde (50-100ng/µl). Alle PCRs wurden mit einem Touchdown-Setting von 65-55°C mit einer Verringerung von jeweils 1°C pro Zyklus in den ersten 10 Zyklen durchgeführt, um den Prozess an die verschiedenen Primer-Annealing Temperaturen anzupassen und eine Amplifikation von nicht-spezifischen Sequenzen zu verhindern. Gestartet wurde mit einer Inkubationszeit von 5 min bei 95°C, gefolgt von 10 Zyklen mit jeweils

30 s bei 95°C, 30 s bei 65-55°C, 60 s bei 72°C und 30 Zyklen für 30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C, 60 s bei 72°C und eine finale Extension für 30 min bei 72°C.

Um ein aufbereitetes DNA-Template zu erhalten, wurden die PCR-Produkte, also die Stränge von Vorwärts- bis Rückwärts-Primer mit den in diesem Bereich liegenden SNPs (2µl rs629301, 2µl rs6511720, 4µl rs6544713), von den noch vorhandenen dNTPs und Oligonukleotiden gereinigt. Hierfür wurde ein Gemisch aus 1,62 µl durch HPLC gereinigtes Wasser (Acros Organics), 0,08 µl von 20 U/µl Exonuklease I (New England Biolabs), 0,3 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase (Applied Biosystems) bei einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 15 min bei 75°C benutzt. Der verwendete SNaPshot-Mix bestand aus 6.0µl durch HPLC gereinigtes Wasser (Acros Organics), 1.0µl SNaPshot Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), 1,0 µl 0,2 µM SNaPshot-Primer und 2,0 µl von dem gereinigtem PCR-Produkt. Für diesen Schritt wurde eine Inkubation von 25 Zyklen für 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 30 s bei 60°C verwendet. In einer finalen Reinigungsphase wurden 1.6µl durch HPLC-gereinigtes Wasser (Acros Organics), 1,4 µl 10-fach konzentrierter Shrimp-Alkaline-Phosphatase-Puffer (Applied Biosystems), 1,0 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase (Applied Biosystems) direkt mit dem Output der SNaPshot-Reaktion (10 µl) vermischt und für 60 min bei 37°C und 15 min bei 75°C inkubiert.

Für die Messung der fluoreszierenden Marker des Größenstandards im 3730 DNA-Analyser XL System (Applied Biosystems, HITACHI) wurden 9,8 µl hochdeionisiertes Formamid (Applied Biosystems), 0,2 µl GeneScan-120 LIZ Größenstandard (Applied Biosystems) und 1,0 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase gereinigtes SNaPshot-Produkt in jedes Well (96-Well Platten) gegeben. Als finaler Schritt wurde dieses Gemisch für 5 min bei 95°C denaturiert.

Das Protokoll unterschied sich in der Komposition der Primer-Vormischungen und der Temperaturen für den Thermocycler vom ABI Prism SNaPshot Multiplex Kit Protokoll (Applied Biosystems), um die Ergebnisse des DNA-Analyser-Outputs zu optimieren. Der Cut-Off für die Höhe eines Peaks im DNA-Analyser wurde mit 100 für homozygote und 150 für heterozygote Genotypen definiert. Im Falle, dass ein oder zwei Genotypen nicht vorliegen, wurde das Risiko von 0 für diesen Genotyp angenommen. Falls mehr als zwei Genotypen fehlten, wurde dieses Individuum von den statistischen Auswertungen ausgeschlossen. Nach dem Ersetzen der fehlenden Genotypen mit dem in der Population am häufigsten vorkommenden oder der kompletten Exklusion von Individuen mit fehlenden Genotypen resultierten keine

signifikanten Unterschiede. Der positiv prädiktive Wert des 6-SNP polygenen Scores wurde mit angepasster Prävalenz unter Berücksichtigung des Satz von Bayes

berechnet, i.e. $P\left(\frac{A}{B}\right) = \frac{P\left(\frac{B}{A}\right) * P(A)}{P(B)}$.

Aus den hier identifizierten und durch BASE-II (Kontrollkohorte) bereitgestellten Genotypen wurde nach den Vorgaben von Futema et al. [19] der 6-SNP polygene Score bestimmt.

3.2.4. Klinische Diagnostik

Die in 3.2.2. beschriebenen Daten umfassen alle klinischen Informationen, um den DLCN-Score jedes*jeder Patient*in zu bestimmen. Hierfür notwendig und darüber hinaus von Interesse waren unter anderem Standard-Laborparameter wie LDL-C, Gesamtcholesterin, HDL-C, Triglyzeride und Lipoprotein(a), sowie Daten der körperlichen Untersuchungsbefunde und der Patient*innenanamnese. Wie schon in der Einleitung beschrieben, handelt es sich beim DLCN-Score um ein punktebasiertes Verfahren, um die klinische Diagnose der Patient*innen mit Familiärer Hypercholesterinämie zu vereinfachen. Wenn möglich wurde der Score für jede*n Patient*in bestimmt. Um zu bestimmen, wie der Score zwischen mutationsnegativen und mutationspositiven Patient*innen unterscheidet, wurde die Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (area under the curve, AUC) evaluiert. In dem Falle, dass die nativ LDL-C-Werte nicht verfügbar waren, wurden sie unter Verwendung von Rückrechnungsfaktoren berechnet [38-46].

3.2.5. Mutationsscreening

Die Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen (NGS-Daten) von Labor Berlin GmbH wurden wie in 3.2.2. beschrieben in ein separates Verzeichnis überführt. Genauere Informationen zu den molekulargenetischen Analysen sind im Supplement der vorliegenden Arbeit in der Publikation [37] zu finden. Die bei dem verwendeten Patient*innenkollektiv vorhandenen Sequenzvarianten wurden mit Datenbanken, wie der Human Gene Mutation Database (HGMD) [47], der Leiden Open Variation Database [8] und der Clinvar Variant Database [48] abgeglichen, um neu entdeckte Varianten auffindig zu machen. Darüber hinaus wurden die Allel-Frequenzen in der europäischen Population mittels der gnomAD-Datenbank (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) evaluiert. Des Weiteren wurde eine funktionelle

Analyse mittels *in silico* Tools durchgeführt, um die möglichen Auswirkungen der sequenziellen Veränderungen zu erfassen. Hierfür wurden Polyphen-2, Mutation Taster und für Intronvarianten mit möglichem Effekt auf den Splice-Vorgang der Human Splicing Finder verwendet [49-51]. Wie schon in der Einführung beschrieben, ist es essenziell für die klinische Praxis, dass schon identifizierte, sowie neu entdeckte Mutationen durch einen Ratingsystem nach ihrer möglichen Pathogenität und der Auswirkungen für den*die Patient*innen klassifiziert werden. Hierfür wurden alle Sequenzvarianten nach den ACMG-Klassifikationen bewertet [10]. Zusätzlich wurden alle in dieser Studie neu identifizierten Varianten nach der neuesten Überarbeitung durch Nykamp et al. beurteilt [52]. Hieraus ergibt sich eine Unterteilung in *pathogen*, *benigne* oder *Variante unsicherer Signifikanz (VUS)*.

3.2.6. Lp(a)-Anpassung

Die Lp(a)-Werte waren von 274 Patient*innen vorhanden. Werte in nmol/l wurden nach der Umrechnungsformel: $\text{mg/dL} = (\text{nmol/L} + 3,83) \times 0,4587$, berechnet [53]. Falls ein Wert unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurde jeweils die Hälfte der vom jeweiligen Labor bestimmten Nachweisgrenze als Lp(a)-Wert verwendet. Der Cholesterin-Anteil im Lp(a) wurde in Übereinstimmung mit der aktuellen Studienlage auf 30% geschätzt [25-27]. Um den an das Lp(a)-Cholesterin angepassten LDL-C-Wert, im Folgenden $\text{LDL-C}_{\text{corrected30}}$, zu erhalten wurden 30% der Lp(a)-Masse von dem nativen LDL-C-Wert subtrahiert. Da der Lp(a)-Cholesterin-Wert nur geschätzt ist, wurden die Mittelwerte der angepassten LDL-C-Werte auch noch mit den geschätzten Anpassungen von 20%, 25% und 45% ($\text{LDL-C}_{\text{corrected20,-25,-45}}$) berechnet.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Mutationsspektrum

Bei den 336 Patient*innen konnten 44 mit Sequenzvarianten identifiziert werden, welche nach der ACMG-Klassifikation als *Varianten unsicherer Signifikanz (VUS)* eingestuft wurden. Diese wurden im Folgenden von den statistischen Analysen ausgeschlossen, da ohne weitere Forschung keine Aussagen über den Einfluss dieser Varianten auf den Phänotyp der Patient*innen gemacht werden können. Genauere Informationen zu den Patient*inneneigenschaften sind hier zu finden [37]. In der vorliegenden Studie kamen bei 117 Patient*innen Sequenzvarianten vor, die

eine FH verursachen. Insgesamt handelte es sich hierbei um 73 verschiedene Mutationen, die nach den ACMG-Kriterien als *pathogen* bzw. krankheitsverursachend angesehen werden. Die meisten Varianten befanden sich im *LDLR*-Gen (107 Mutationen, 84,9%), 19 (15,1%) im *APOB*-Gen und keine im *PCSK9*-Gen, respektive *LDLRAP1*-Gen. Bei den meisten Mutationen handelte es sich um Missense-Varianten. Die häufigste Missense-Variante im *LDLR*-Gen war c.789 T>A (p.Asp266Glu) und im *PCSK9*-Gen c.10580 G>A (p.Arg3527Gln). Die detektierten Sequenzvarianten und Informationen zum jeweiligen Phänotypen sind im Supplement (Tabelle S5) der Publikation zu finden [37]. Des Weiteren wurden vier möglicherweise compound heterozygote Patient*innen entdeckt, zwei doppelt heterozygote Patient*innen und ein*e sowohl doppelt als auch compound heterozygote*n Patient*in. Interessant bei diesen Patient*innen war, dass sie nicht, wie erwartet die höchsten LDL-C-Werte hatten, sondern mit $362,23 \pm 185,19$ mg/dl nur die zweithöchsten hatten, nach Patient*innen mit Sequenzvarianten, welche zu einem verkürzten Protein führten ($366,85 \pm 106,87$ mg/dl). Außerdem wurden bei vier mutmaßlich nicht verwandten Patient*innen die gleichen Sequenzvarianten für ihren compound heterozygoten Mutationsstatus gefunden. Dies weist auf eine mögliche Verbindung zwischen diesen Mutationen hin, bei denen die veränderten Allele in einem Gen immer in Kombination miteinander vorkommen. Es wurden in der vorliegenden Studie aber keine weiterführenden Analysen diesbezüglich durchgeführt.

3.3.2. Neue Sequenzvarianten

Die elf in dieser Studie neu entdeckten Mutationen befinden sich alle im *LDLR*-Gen und sind auf insgesamt 14 Patient*innen verteilt. Alle Varianten wurden basierend auf der neuesten Überarbeitung der ACMG-Klassifikation als *pathogen* eingestuft und waren weder in der HGMD Datenbank, noch der gnomAD-Datenbank vorhanden. Genaue Informationen zu den einzelnen Sequenzvarianten finden sich in Tabelle S7 [37].

3.3.3. Klinische und genetische Diagnostik

Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist es wichtig bei Patient*innen mit erhöhten LDL-C-Werten die Ursache zu ermitteln und diese dann zu therapieren. Wegweisend ist hier ein Nachweis einer Sequenzvariante, welche nach den ACMG-Kriterien als

pathogen eingestuft wird. Außerdem gibt es die Möglichkeit die Patient*innen nach einem klinischen Score, wie dem in der Einleitung beschriebenen DLCN-Score, zu klassifizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte der DLCN-Score bei 226 von den 292 Patient*innen mit Hypercholesterinämie erhoben werden. Individuen, welche vom DLCN-Score als *unwahrscheinlich* für eine FH-Erkrankung eingestuft wurden, waren zu 82.8% mutationsnegativ. Das bedeutet, dass diese Patient*innen nach klinischen Kriterien, wie den Labordaten oder der Familienanamnese, nicht die FH-spezifischen Merkmale aufweisen. Patient*innen mit einem *wahrscheinlichen* und *definitiven* Ergebnis für eine vorliegende FH im DLCN-Score, hatten hingegen zu 60.9% und 82.1% eine Sequenzvariation in einem der beschriebenen Gene. Der Score unterscheidet demnach gut zwischen Patient*innen mit und ohne Mutation. Es wurde zum Vergleich die Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve beim DLCN-Score und den nativen LDL-C-Werten kontrolliert. Erstaunlicherweise unterschieden sich die beiden nur minimal mit einer AUC = 0,76 (95% CI = 0,69-0,82, $p < ,001$) für den DLCN-Score und einer AUC = 0,77 (95% CI = 0,71-0,83, $p < ,001$) für die nativen LDL-C-Werte.

Darüber hinaus wurden die nativen LDL-C-Werte der Patient*innen abhängig vom jeweiligen Mutationsstatus verglichen. Erwartungsgemäß waren die Werte der mutationsnegativen Patient*innen signifikant ($p < ,001$) die niedrigsten im Vergleich zu allen anderen Gruppen (alle mutationspositiven Patient*innen, Patient*innen mit Missense-Mutationen, Mutationen mit verkürztem Genprodukt als Folge und Patient*innen die doppelt und / oder compound heterozygot für FH-Sequenzvarianten waren). Eine ähnliche Analyse wurde für native LDL-C-Werte von mutationsnegativen Patient*innen und nach der ACMG-Klassifikation unterschiedlich eingestuft Mutationen der Patient*innen durchgeführt. Interessant war hier, dass mutationsnegative Patient*innen und Individuen mit einer als *VUS* klassifizierten Sequenzvariation sich nicht signifikant ($p = ,981$) unterschieden.

3.3.4. 6-SNP polygener Score

Der 6-SNP LDL-C polygenen Score konnte in 336 Patient*innen aus Berlin und in 1985 Individuen der BASE-II-Kontrollkohorte bestimmt werden. Wie vorher beschrieben, wurden drei der Genotypen für die 336 Patient*innen mit Hypercholesterinämie mittels einer SNaPshot-PCR-Analyse bestimmt. Die Genotypen der Kontrollkohorte (N=1985) waren in dem zur Verfügung stehenden

Datensatz enthalten, so dass der Score für jedes Individuum berechnet werden konnte. Der 6-SNP polygene Score war in mutationsnegativen Patient*innen mit einem Mittelwert von 0,639 ($\pm 0,164$) um 0,061 (95% CI [0,035-0,088]) höher als der Wert der BASE-II-Kontrollen, $t(250,177) = 4,520$, $p < ,001$. Erstaunlicherweise lag der 6-SNP polygene Score bei den mutationspositiven Patient*innen mit 0,573 ($\pm 0,2$) darunter. Der Mittelwert bei den mutationspositiven Patient*innen unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem der nicht betroffenen Kontrollkohorte (0,578 ($\pm 0,248$)), $t(137,7) = -0,282$, $p = ,778$.

Um zu evaluieren, ob der Score gut zwischen mutationsnegativen und mutationspositiven Patient*innen unterscheiden kann, wurden alle Patient*innen (jeweils mutationsnegativ und mutationspositiv) mit einem nativ LDL-C-Wert >155 mg/dl und alle Individuen der BASE-II-Kontrollkohorte mit einem LDL-C-Wert <155 mg/dl (dies ist der Cut-Off für den DLCN-Score) in jeweils drei Gruppen eingeteilt. Nun konnte untersucht werden, ob der Score adäquat zwischen Patient*innen mit einer Hypercholesterinämie und nicht betroffenen Individuen unterscheidet. Die Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve zeigte eine mangelnde Diskriminierung zwischen mutationspositiven und mutationsnegativen Patient*innen (AUC = 0,62 [95% CI = 0,55-0,69], $p < ,001$), zwischen BASE-II und mutationspositiven Patient*innen (AUC = 0,50 [95% CI = 0,45-0,54], $p = ,897$) und zwischen BASE-II-Kontrollen und mutationsnegativen Patient*innen (AUC = 0,60 [95% CI = 0,56-0,64], $p < ,001$). Vor allem der Nutzen des Scores bei der Unterscheidung von Patient*innen ohne Sequenzvariation und mit Hypercholesterinämie und Individuen ohne erhöhten LDL-C-Werten ist hier von Interesse, da hier, wie in der Einleitung beschrieben wurde, eine diagnostische Lücke vorliegt. Mit der Grenzwertoptimierungskurve kann man nach Bestimmung des Youden-Index den Wert finden, an dem der Score am besten zwischen mutationsnegativen Patient*innen und nicht betroffenen Kontrollen der BASE-II-Kohorte unterscheidet. Mit dieser Information und nach Anpassung der Prävalenz mittels des Satzes von Bayes war es möglich die klassischen statistischen Gütekriterien des Scores für die Anwendung an diesen zwei Gruppen zu ermitteln. So ergab sich beispielsweise ein positiv prädiktiver Wert von 0,57%, was bei den 123 mutationsnegativen Patient*innen (mit LDL-C-Werten >155 mg/dl) eine richtige Diagnose in 0,70 Patient*innen (nicht einmal einem*einer Patient*in) erlauben würde. Anders gesagt, der Score könnte angewandt an dieser Gruppe nicht einmal bei

einem* einer Patient*in eine polygene Erklärung für die erhöhten LDL-C-Werte erkennen. Eine weitere Möglichkeit die Güte eines diagnostischen Scores zu überprüfen ist mit einer Regressionsanalyse die Assoziation zwischen dem Score und den erhöhten LDL-C-Werten der Kontrollgruppe und der mutationsnegativen Patient*innen zu betrachten. Hierfür wurde eine lineare Regression gewählt, welche mit $\beta=34,8$, $p<,001$, $R^2=,031$, $R_{adj}^2=,030$, nur einen kleinen Teil der Varianz der LDL-C-Werte erklärt. Nach Berücksichtigung von Geschlecht und Alter konnte zwar eine bessere Vorhersage über die LDL-C-Werte getroffen werden, mit einem standardisiertem $\beta = |0,174|$ (6-SNP polygener Score*), $\beta_{standardisiert} = |0,263|$ (Alter*) und $\beta_{standardisiert} = |0,013|$ (Geschlecht), $F [3,20] = 76,26$, $p<,001$, $R^2=,099$, $R_{adj}^2=,098$, aber auch hier konnte eine stärkere Assoziation vom Alter der Patient*innen mit den LDL-C-Werten als vom 6-SNP polygenen Score gesehen werden. Alter ($p<,001$) und Score ($p<,001$) waren statistisch signifikant in der multiplen Regression, Geschlecht hingegen nicht ($p=,542$). Mit anderen Worten erklärt das Alter der Patient*innen und der 6-SNP polygene Score zusammen knapp 10% der Varianz der LDL-C-Werte.

3.3.5. Lp(a)-Anpassung Überblick

Die Lp(a)-Werte waren bei 274 Patient*innen vorhanden. Hierunter befinden sich Patient*innen mit und ohne in der molekulargenetischen Diagnostik identifizierter FH-verursachender Mutation. Die Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation hatten signifikant ($p<,020$) höhere Lp(a)-Werte mit einem Median von 20,4 mg/dl (IQR 67,3), im Vergleich zu den Patient*innen mit FH-verursachender Mutation (12 mg/dl (IQR 24,1)). Nach Berechnung des $LDL-C_{corrected30}$ wie in 3.2.6. beschrieben, zeigte sich ein signifikanter Unterschied, sowohl im Vergleich von nativ LDL-C und $LDL-C_{corrected30}$, als auch beim DLCN-Score vor und nach der Lp(a)-Anpassung. Der Unterschied zwischen nativ LDL-C und $LDL-C_{corrected30}$ zeigte sich auch, wenn man die mutationspositiven und mutationsnegativen Patient*innen separat betrachtet. 29,2% (N=80) der 274 Patient*innen hatten ein Lp(a)-Wert von über 50 mg/dl. In einer Spearman-Korrelation korrelierten die Lp(a)-Werte und der Mutationsstatus der Patient*innen signifikant ($p<,05$) mit einem $\rho=0,14$ miteinander. Die Lp(a)-Werte und die nativen LDL-C-Werte, sowie die $LDL-C_{corrected30}$ -Werte korrelierten nicht signifikant miteinander ($p>,05$), wohingegen die Lp(a)-Werte und die angepassten $LDL-C_{corrected45}$ -Werte eine signifikante inverse Korrelation aufwiesen, $LDL-C_{corrected45}$ mit $\rho=-0,15$ ($p<,05$).

Tabelle 1. Patient*innencharakteristik der 274 Patient*innen mit Hypercholesterinämie.¹

Variable	Patient*innen mit Hypercholesterinämie		
	N (%)		
Weiblich	178 (65)		
Männlich	96 (35)		
	Mittelwert (+-SD)		
Alter (Jahre) ²	56,4 (14,2)		
Gesamtcholesterin (mg/dl) ³	210,6 (71,6)		
Lipoprotein(a) (mg/dl) ⁴	14,2 (55,6)		
LDL-C _{corrected20}	270,3 (101,8)		
LDL-C _{corrected30}	265,9 (105,5)		
LDL-C _{corrected25}	268,1 (102,9)		
LDL-C _{corrected45}	259,2 (108,8)		
	FH/M+	FH/M-	p-Wert
Lipoprotein(a) (mg/dl) ⁴	13 (24,1)	20,4 (67,3)	,020

¹ FH/M+ sind Patient*innen mit einer FH-verursachenden Mutation. FH/M- sind Patient*innen ohne eine FH-verursachende Mutation. Lp(a)-Cholesterin-Anpassung errechnet durch Subtraktion von 30% der Lipoprotein(a)-Masse vom nativen LDL-C. Die Anpassung bei LDL-C_{corrected20,-25,-45} wurde durch die Subtraktion von 20%, 25% und 45% der Lipoprotein(a)-Masse vom nativen LDL-C berechnet.

Unterschiede berechnet mit Mann-Whitney-U-Test. DLCN, Dutch Lipid Clinic Network; FH, Familiäre Hypercholesterinämie; LDL-C, Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin. Quelle: Eigene Darstellung.

² Zum Zeitpunkt der Studienrekrutierung.

³ Unter maximaler Therapie.

⁴ Median (IQR).

Tabelle 2. Überblick der Lp(a)-Anpassung der 274 Patient*innen.⁵

	Vor Lp(a)-Cholesterin-Anpassung	Nach Lp(a)-Cholesterin-Anpassung	p-Wert
Nativ LDL-C (mg/dl)	279,2 (99,5)	265,9 (105,5)	<,001
DLCN-Score	5,3 (2,9)	4,9 (3)	<,001
FH/M+ nativ LDL-C (mg/dl)	328,2 (106,2)	319,5 (103,8)	<,001
FH/M- nativ LDL-C (mg/dl)	238,5 (72)	221,3 (79,3)	<,001

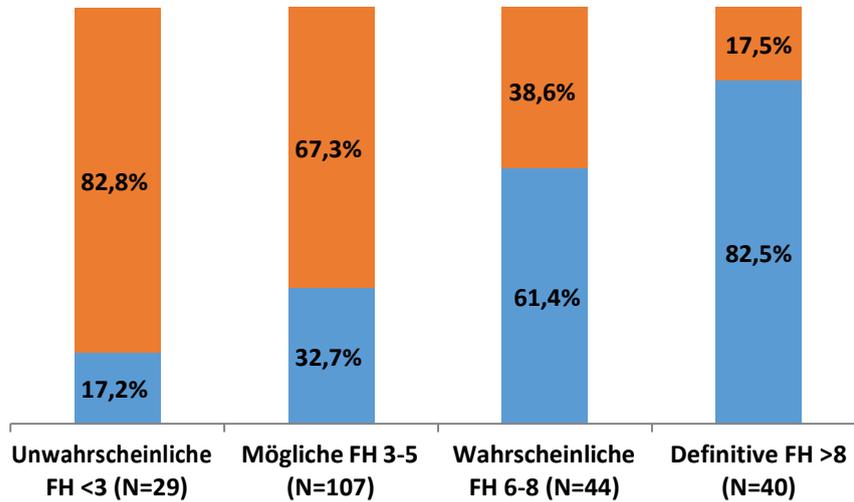
3.3.6. FH-Diagnostik unter Lp(a)-Anpassung

Die klinische Diagnostik der Familiären Hypercholesterinämie basiert, wie beschrieben, auf Score-Systemen wie dem DLCN-Score. Um zu analysieren, wie gut der Score vor der genetischen Testung (also nur basierend auf den klinischen Merkmalen des*der Patient*in) zwischen mutationsnegativen und mutationspositiven Patient*innen unterscheidet, wurden die Score-Ergebnisse den Resultaten der genetischen Analyse gegenübergestellt. Untersucht wurde dies vor und nach der Lp(a)-Anpassung, also mit nativ LDL-C-Werten und mit den LDL-C_{corrected30}-Werten (Abbildung 1 (A)/(B)). Der DLCN-Score mit Lp(a)-angepassten LDL-C-Werten war in 220 der 274 Patient*innen erhebbar.

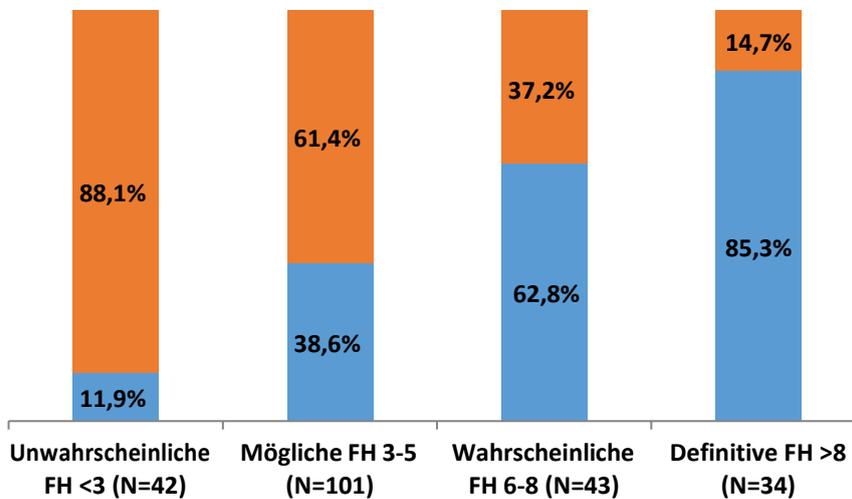
Vor der Anpassung hatten 82,5% der Patient*innen, welche nach dem DLCN-Score eine *definitive* FH-Diagnose haben, eine als *pathogen* klassifizierte Mutation. Das bedeutet, dass der Score etwa vier von fünf Patient*innen ohne genetische Testung richtig als FH-Patient*innen klassifiziert hat. Bei den Patient*innen, welche nach dem

⁵ FH/M+ sind Patient*innen mit einer FH-verursachenden Mutation. FH/M- sind Patient*innen ohne eine FH-verursachende Mutation. Lp(a)-Cholesterin-Anpassung errechnet durch Subtraktion von 30% der Lipoprotein(a)-Masse vom nativen LDL-C. Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Unterschiede berechnet durch gepaarten t-Test. DLCN, Dutch Lipid Clinic Network; FH, Familiäre Hypercholesterinämie; LDL-C, Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin. Quelle: Eigene Darstellung.

DLCN-Score *unwahrscheinlich* an FH erkrankt sind, wurde nur bei 17,2% eine als *pathogen* klassifizierte Variante gefunden. Nach Lp(a)-Anpassung der LDL-C-Werte haben 85,3% der als *definitiv* eingestuften Patient*innen eine als *pathogen* klassifizierte Mutation. Bei als *unwahrscheinlich* eingestuften Patient*innen haben nun 88,1% keine als FH-verursachend klassifizierte Mutation.



(A)



(B)

Abbildung 1. (A) Anteil der entdeckten krankheitsverursachenden Mutation nach dem DLCN-Score vor Lp(a)-Cholesterin-Anpassung. **(B)** Anteil der entdeckten krankheitsverursachenden Mutation nach dem DLCN-Score nach Lp(a)-Cholesterin-Anpassung. Der DLCN-Score war in 220 der 274 Patient*innen mit Hypercholesterinämie erhebbar. Die Abbildung zeigt den Anteil der Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation (orange Balken) verglichen mit dem Anteil der Patient*innen mit FH-verursachender Mutation (blaue Balken) in Relation zu den verschiedenen

DLCN-Score-Intervallen. FH, Familiäre Hypercholesterinämie. Quelle: Rieck, L., F. Bardey, T. Grenkowitz, L. Bertram, J. Helmuth, C. Mischung, J. Spranger, E. Steinhagen-Thiessen, T. Bobbert, U. Kassner, and I. Demuth, *Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia*. Clin Genet, 2020. **98**(5): p. 457-467.

In Tabelle 3 sind die verschiedenen Anteile von Patient*innen vor und nach Lp(a)-Anpassung jeweils für den DLCN-Score und die verschiedenen Grenzwerte der LDL-C-Werte aufgelistet. Außerdem sind die Raten der Reklassifizierung in eine tiefere DLCN-Score-Klasse oder LDL-C-Grenzwert-Klasse jeweils für mutationspositive, mutationsnegative und alle Patient*innen angegeben. Bei den als *definitiv*, *wahrscheinlich* und *möglich* eingestuften Patient*innen nach dem DLCN-Score, kam es zu einer Reduktion der Patient*innenanzahl. Die Anzahl der als *unwahrscheinlich* eingestuften Patient*innen stieg von 10,6% auf 15,3% nach der Anpassung. Alle Mittelwerte des DLCN-Scores veränderten sich signifikant ($p < ,001$) nach der Lp(a)-Anpassung. Insgesamt wurden 6,2% der Patient*innen in eine tiefere DLCN-Klasse eingestuft. Die meisten Reklassifizierungen in eine tiefere Klasse, mit 4,7%, gab es bei Patient*innen ohne eine FH-verursachende Mutation. Unter den mutationsnegativen Patient*innen gab es mit 9,3% die höchste Proportion von tiefer Klassifizierten bei den vom DLCN-Score als *möglich* an FH-erkrankt eingestuften Patient*innen.

Bei den verschiedenen LDL-C-Grenzwertklassen sind die Gruppen der Patient*innen mit LDL-C-Werten über 190 mg/dl jeweils gewachsen, wohingegen die Gruppen mit LDL-C-Werten unter 190 mg/dl jeweils kleiner geworden sind. Auch hier waren die Unterschiede der Mittelwerte vor und nach Lp(a)-Anpassung jeweils signifikant ($p < ,001$). Insgesamt 8,9% der Patient*innen wurden in einer tieferen LDL-C-Grenzwertklasse eingestuft. Wie schon beim DLCN-Score fanden hier die meisten Reklassifizierungen bei Patient*innen ohne eine FH-verursachende Mutation statt und nur 0,9% der Reklassifizierten waren mutationspositiv. Die größte Proportion von niedriger klassifizierten Patient*innen von 15,4% befand sich bei den mutationsnegativen Patient*innen mit LDL-C-Werten zwischen 155 und 190 mg/dl.

Tabelle 3. Reklassifizierung nach Lp(a)-Anpassung.⁶

		Vor Anpassung	Nach Anpassung	Rate der Niedriger- Klassifizier- ungen		
				Alle	FH/M+	FH/M-
DLCN- Score (N=274)	<i>Definitiv</i>	14,6 (40)	12,4 (34)*	15 (6)	10 (4)	5 (2)
	<i>Wahrscheinlich</i>	16,1 (44)	15,7 (43)*	2,3 (1)	0 (0)	2,3 (1)
	<i>Möglich</i>	39 (107)	36,9 (101)*	9,3 (10)	0 (0)	9,3 (10)
	<i>Unwahrscheinlich</i>	10,6 (29)	15,3 (42)*			
	kein DLCN- Score erhebbar	19,7 (54)		6,2 (17)	1,5 (4)	4,7 (13)
LDL-C (N=225)	≥251	53,3 (120)	49,3 (111)*	7,5 (9)	1,7 (2)	5,8 (7)
	191-250	32 (72)	29,3 (66)*	9,7 (7)	0 (0)	9,7 (7)
	155-190	11,6 (26)	14,7 (33)*	15,4 (4)	0 (0)	15,4 (4)
	0-154	3,1 (7)	6,7 (15)*			
				8,9 (20)	0,9 (2)	8 (18)

Insgesamte
Rate der
Niedriger-
Klassifizierun-
gen

Insgesamte
Rate der
Niedriger-
Klassifizierun-
gen

⁶ Anteil der Patient*innen mit Hypercholesterinämie nach dem DLCN-Score und den verschiedenen LDL-C-Grenzwerten vor und nach der Lp(a)-Anpassung der LDL-C-Werte, und die dazugehörigen Reklassifizierungsraten in Patient*innen mit einer FH-verursachenden Mutation (FH/M+) und Patient*innen ohne eine identifizierte Mutation (FH/M-). Werte in Prozent mit der Anzahl der Patient*innen in Klammern. * $p < 0,001$ für das Vergleichen der Mittelwerte des DLCN-Scores und der LDL-C-Werte vor und nach Lp(a)-Cholesterin-Anpassung. DLCN, Dutch Lipid Clinic Network; FH, Familiäre Hypercholesterinämie; LDL-C, Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin. Quelle: Eigene Darstellung.

Die Patient*innen des hier untersuchten Kollektivs können also nach der Lp(a)-Anpassung in die Gruppen der Patient*innen mit FH-verursachender Mutation (48%), Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation und erhöhten LDL-C_{corrected30}-Werten von über 190 mg/dl (36%), Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation, LDL-C_{corrected30}-Werten unter 190 mg/dl und Lp(a)-Werten unter 50 mg/dl (9%) und in Patient*innen ohne krankheitsverursachende Mutation, LDL-C_{corrected30}-Werten von unter 190 mg/dl und erhöhten Lp(a)-Werten von über 50 mg/dl (7%) eingeteilt werden (Abbildung 2).

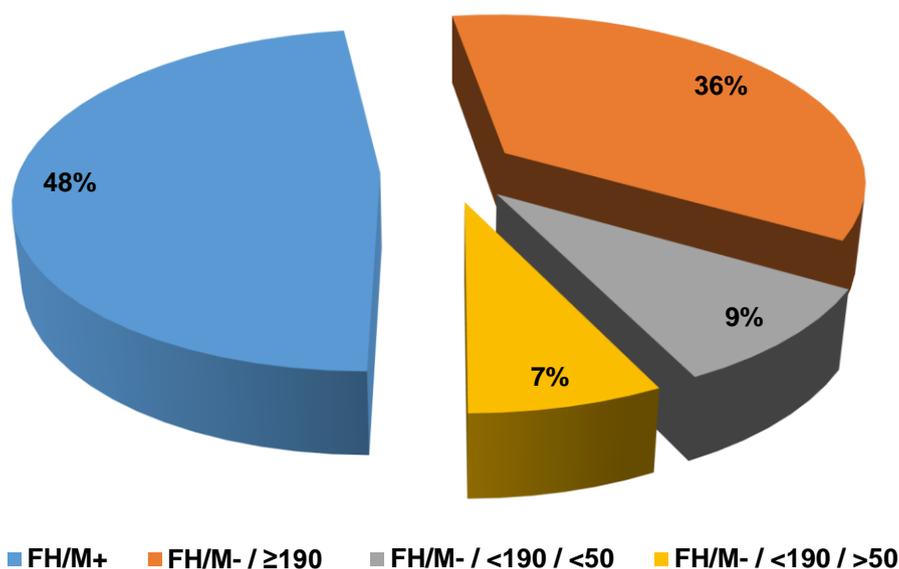


Abbildung 2. Verteilung der verschiedenen Untergruppen des Patient*innenkollektivs. FH/M+ sind Patient*innen mit FH-verursachender Mutation. FH/M- / ≥ 190 sind Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation und und nativ LDL-C-Werten über 190 mg/dl. FH/M- / $<190 / <50$ sind Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation, nativ LDL-C-Werten unter 190 mg/dl und Lp(a)-Werten unter 50 mg/dl. FH/M- / $<190 / >50$ sind Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation, nativ LDL-C-Werten unter 190 mg/dl und Lp(a)-Werten über 50 mg/dl. Lp(a), Lipoprotein (a); FH, Familiäre Hypercholesterinämie; LDL-C, Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin. Quelle: Eigene Darstellung.

3.4. Weiterführende Fragestellung und klinische Anwendung

In dieser Studie wurden 336 deutsche Patient*innen mit Hypercholesterinämie auf ihren Mutationsstatus in den Genen *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* und eine mögliche polygene Ursache ihrer Hypercholesterinämie untersucht. Außerdem wurden zum

Vergleich der Ergebnisse Daten der BASE-II-Kontrollkohorte herangezogen, welche aus N=1985 nicht betroffenen Individuen besteht.

Von den 73 Sequenzvarianten, welche in 117 Patient*innen entdeckt wurden, waren 11 noch nicht vorher beschrieben. Die meisten dieser Varianten waren im *LDLR*-Gen und vom Missense-Typ. Keine pathogenen Varianten wurden im *PCSK9*-Gen oder *LDLRAP1*-Gen entdeckt. Die häufigste Mutation wurde im *APOB* Gen c.10580 G>A (p.Arg3527Gln) gefunden. Die Ergebnisse bezüglich des Mutationsspektrums bei deutschen Patient*innen und zur klinischen Diagnostik mittels des DLCN-Scores ließen sich im Abgleich mit unseren vorherigen Untersuchungen reproduzieren [9]. Außerdem konnte vergleichbar mit anderen Untersuchungen [54] in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Varianten im *LDLR*-Gen häufig als Cluster in Exon 4 und 5 vorkommen. In dieser Region befindet sich auch die häufigste *LDLR*-Variante c.798 T>A (p.Asp266Glu). Hiermit bestätigt und erweitert die vorliegende Studie den aktuellen Stand der genetischen Heterogenität von Patient*innen mit Hypercholesterinämie in Deutschland. Sieben Patient*innen waren heterozygot für mehr als eine Sequenzvariation, entweder im gleichen Gen oder in einem anderen der drei FH-Gene. Wie schon in einer Gemeinschafts-Studie der Europäischen Gesellschaft für Atherosklerose beschrieben [55], waren die Mittelwerte der LDL-C-Werte und die dazugehörigen klinischen Phänotypen geringer ausgeprägt in Patient*innen mit zwei Varianten in zwei verschiedenen Genen, als bei compound heterozygoten Patient*innen, welche teilweise homozygoten FH-Patient*innen in ihren Phänotypen ähneln können. Bei den compound heterozygoten Patient*innen könnten die Mutationen zu einem vollständigen Ausfall des korrespondierenden Proteins führen. Für eine genauere Erklärung dieses Umstands sind weitere Untersuchungen (Stammbaumanalysen) des genauen Mutationsmusters dieser Patient*innen notwendig. Eine möglich allelische Kopplung zwischen zwei Varianten konnte somit in dieser Studie nicht weiterführend geklärt werden.

Wie zu erwarten, unterschieden sich die LDL-C-Werte von Patient*innen ohne Mutation nicht signifikant von den Werten der Patient*innen, welche eine nach den ACMG-Kriterien als *VUS* klassifizierte Variante aufzeigten. Diese Varianten sind wahrscheinlich nicht krankheitsverursachend. Wie schon in der Einführung beschrieben, ist es ein großes Problem der aktuellen FH-Diagnostik, dass nur ca. 10% der Varianten, welche bei den Patient*innen identifiziert werden, als *pathogen* bzw. krankheitsverursachend eingestuft werden [11]. Dies erschwert den alltäglichen

praktischen Umgang enorm, da auch eine mögliche Therapie der FH auf eine gesicherte klinische und genetische Diagnose aufbauen sollte. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Kircher et al. [56] versucht dieser Problematik zumindest für die Interpretation von nicht-codierenden DNA-Abschnitten zu begegnen. Die Arbeitsgruppe benutzte hierfür eine Kombination aus Sättigungsmutagenese (Künstliche Gensynthese von zu untersuchenden Mutationen in einem bestimmten Bereich eines Gens) und Reporter-gen-Assays bei über 20 krankheitsassoziierten Gen-Promotor und Gen-Enhancer-Regionen (unter anderem auch die des *LDLR*-Gens) um eine funktionelle Analyse von über 30.000 SNPs zu generieren. Hierdurch konnte die Arbeitsgruppe viele Daten zu den regulatorischen Konsequenzen von SNPs in krankheitsassoziierten Genen sammeln. Eine vergleichbare Arbeit für kodierende Regionen wäre sehr hilfreich, um z.B. die große Gruppe der als *VUS* klassifizierten Varianten genauer einteilen zu können. Bis es eine solche Studie gibt, ist die kontinuierliche Klassifikation von Sequenzvarianten nach einheitlichen Systemen wie den ACMG-Klassifikationen wichtig, um so das Spektrum der Mutationen mit denen Ärzt*innen sich in der Praxis konfrontiert sehen weiter zu analysieren.

Die Patient*innen aus der vorliegenden Untersuchung wurden, wenn möglich mithilfe des DLCN-Scores aufgrund ihrer phänotypischen Merkmale und ihrer Anamnese in verschiedenen Gruppen eingeteilt, welche unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen einer FH haben. Eine krankheitsverursachende Mutation wurde in über 70% der Fälle entdeckt, in denen eine FH-Diagnose *wahrscheinlich* oder *definitiv* nach dem DLCN-Score war. Der DLCN-Score unterschied mit einer Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve von $AUC = 0,76$ (95% CI = 0,69-0,82, $p < ,001$) ungefähr so gut zwischen mutationsnegativen und mutationspositiven Patient*innen wie die nativ LDL-C-Werte ($AUC = 0,77$ (95% CI = 0,71-0,83), $p < ,001$). Zu dieser Erkenntnis kamen auch andere Studien. In der klinischen Praxis bedeutet dies, dass für eine erste Risikostratifizierung der LDL-C-Wert allein einen hohen Stellenwert hat. [9, 57, 58].

Für Patient*innen, welche mit einer Hypercholesterinämie in einer Praxis vorstellig werden, gibt es also klassische Diagnosemethoden, wie die Anamnese und die klinische Untersuchung, welche sich im DLCN-Score zusammenfassen lassen. Des Weiteren kann bei ausreichendem Verdacht eine Genanalyse für eine Sequenzvariation in einem der drei bekannten FH-Gene durchgeführt werden. In der

vorliegenden Studie konnten keine krankheitsverursachenden Mutation in 65,2% der Fälle gefunden werden, eine Zahl die sich mit einem vor kurzem veröffentlichten Review-Artikel deckt [59]. Futema und Kolleg*innen entwarfen daraufhin einen polygenen SNP-Score, der wie in der Einführung beschrieben, die erhöhten LDL-C-Werte der Patient*innen erklären soll. Die Autor*innen gehen davon aus, dass die Hypercholesterinämie bei ca. 90% der mutationsnegativen Patient*innen auf eine polygene Ursache zurückzuführen ist [19]. Die vorliegende Arbeit kam bezüglich des 6-SNP polygenen Scores zu abweichenden Ergebnissen. Obwohl auch hier die mutationsnegativen Patient*innen die signifikant höchsten Score-Werte aufwiesen, waren die mutationspositiven Patient*innen mit dem niedrigsten Mittelwert des Scores nicht wie bei Futema et al. zwischen den Mutationsnegativen und der Kontrollgruppe wieder zu finden. Die Score-Mittelwerte zwischen Patient*innen mit einer Sequenzvariation und der Kontrollkohorte BASE-II unterschieden sich nicht signifikant. Ein weiterer Unterschied betraf die Score-Werte generell, welche bei dieser Studie im Durchschnitt niedriger waren als die von Futema und Kolleg*innen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Umstand sein, dass Futema et al. im Falle von fehlenden SNP-Genotypen teilweise den am weitesten verbreiteten Genotyp einfügte, wohingegen in der vorliegenden Studie eine Null als Wert für diesen SNP eingesetzt wurde.

Um den 6-SNP polygenen Score weiter zu prüfen, wurden für die hier beschriebene Arbeit unterschiedliche Methoden gewählt. Zuerst wurden die Patient*innen und die Kontrollkohorte, wie in 3.3.4. beschrieben in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: Eine Gruppe von mutationspositiven Individuen mit Hypercholesterinämie, eine Gruppe von mutationsnegativen Individuen mit Hypercholesterinämie und eine Gruppe von Individuen ohne Hypercholesterinämie (Kontrollkohorte), damit untersucht werden konnte, ob der 6-SNP polygenen Score adäquat zwischen „beeinträchtigten“ Patient*innen und „nicht beeinträchtigten“ Individuen unterscheiden kann. Hier wurde nur eine beschränkte Fähigkeit des Scores zwischen den mutationsnegativen Patient*innen und den BASE-II-Kontrollen zu unterscheiden detektiert, mit einer Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve $AUC = 0,60$ (95% CI=0,56-0,64, $p < ,001$). Ein weiteres statistisches Qualitätsmerkmal sind klassische Werte wie der positiv prädiktive Wert, welcher mithilfe der Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve bestimmt wurde. Dieser war mit 0,57% sehr niedrig. Zuletzt wurde die Assoziation des 6-SNP polygenen Scores mit den LDL-C-Werten

der Patient*innen anhand eines Regressionsmodells untersucht. Dieses zeigte, dass nur ca. 3% der Varianz der LDL-C-Werte der Patient*innen durch den Score erklärt werden können. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die insgesamt sechs SNPs, welche aus einer Metaanalyse von genomweiten Assoziationsstudien stammen, nicht die gesamte genetische Varianz der Hypercholesterinämie der Patient*innen abbilden können. Diese 95 SNPs, welche hier zusammen genommen nur 12,2% der Varianz des LDL-C erklären, entstammen den Daten von >100.000 Individuen europäischer Abstammung aus der Arbeit von Teslovich und Kolleg*innen [18]. Es handelt sich bei den SNPs zwar um jene, welche am stärksten mit den Serum-LDL-C-Werten assoziiert sind, doch dieser Effekt wird, wie bei uns dargestellt, minimal, wenn er auf das einzelne Individuum zurückgerechnet wird. Dass es bei der vorliegenden und auch bei vergleichbaren Studien zu erhöhten Score-Werten in der Gruppe der mutationsnegativen Patient*innen kommt, liegt vermutlich nicht an dem von Futema et al. postulierten Umstand, dass diese Patient*innen eine primär polygene Ätiologie ihrer Hypercholesterinämie haben. Es liegt wahrscheinlich vielmehr daran, dass diese selektierte Gruppe von Individuen mit erhöhten LDL-C-Werten ohne monogene Ursache einfach eine erhöhte Wahrscheinlichkeit aufweist, die besagten sechs SNPs in ihrem Genom zu tragen, da diese in der allgemeinen Bevölkerung trotz ihres geringen Effekts häufiger in Individuen mit erhöhten LDL-C-Werten vorkommen. Stattdessen könnte zum Beispiel ein noch nicht entdeckter Genort oder eine epigenetische Veränderung die Ursache für die erhöhten LDL-C-Werte dieser Patient*innen sein.

Auch andere Arbeitsgruppen haben sich mit dem Thema der polygenen Risikoscores beschäftigt. Trinder et al. entwarfen einen Score, der aus 28 LDL-C assoziierten SNPs (vier davon wurden in der vorliegenden Studie benutzt) besteht, den sie bei Patient*innen mit einer monogenen FH anwandten und feststellten, dass die Patient*innen ein signifikant erhöhtes Risiko für vorzeitige kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) haben. Dieses Risiko konnten sie jedoch nicht bei mutationsnegativen Patient*innen nachweisen [60]. In einem aktuell erschienenen Follow-Up dieser Arbeitsgruppe bestätigten sie ihre vorherige These und zeigten in drei großen Kohorten, dass Patient*innen mit einer monogenen FH-Diagnose und erhöhtem polygenen Risiko ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweisen. Erklärt wird das erhöhte CVD-Risiko durch eine mögliche Verstärkung des Effekts der monogenen Ursache der FH durch das Vorhandensein von mit erhöhten LDL-C-

Werten assoziierten SNPs. Dieses Mal konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Anstieg des SNP-Scores von 20% in zwei der drei Kohorten signifikant jeweils ca. 5% und 8% der Varianz der LDL-C-Werte beschreiben kann. Diese Werte sind zwar höher als die 3%, die in der vorliegenden Studie aufgezeigt werden konnten, jedoch wurde hier die allgemeine Korrelation aller Werte des Scores mit den LDL-C-Werten verglichen und nicht nur die mit einer Erhöhung von 20% [61]. Auch die Erkenntnis, dass Patient*innen mit einer monogenen FH und einem hohen polygenen Risiko möglicherweise ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko haben, klärt nicht die Frage der Ursache der Erkrankung in den mutationsnegativen Patient*innen. Des Weiteren entwickelten Paquette et al. einen Score, der aus 192 SNPs besteht, welche mit koronarer Herzkrankheit assoziiert sind und bei hohen Werten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen korreliert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um 725 FH-Patient*innen mit einer monogenen Ursache [62]. Diese Scores könnten ergänzend zu bestehenden Methoden zum allgemeinen kardiovaskulären Risikoscreening bei Patient*innen mit Hypercholesterinämie eingesetzt werden. Eine weitere vergleichbare Studie an spanischen Patient*innen umfasste 294 mutationsnegative Individuen. Diese wurden mithilfe des gleichen 6-SNP polygenen Scores untersucht, der auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Hier konnte der Score 3,1% der Variation der LDL-C-Werte der Patient*innen erklären. Interessanterweise war analog zu der hier diskutierten Studie das Alter der Patient*innen ein stärkerer Prädiktor für die LDL-C-Werte der Patient*innen als der polygene Score. Wichtig zu erwähnen ist, dass es sich bei den meisten Patient*innen (91,2%) um blutsverwandte Familien handelt [63]. In einer weiteren Arbeit von Wang et al. wurden mit zehn verschiedenen SNPs (davon wurden zwei auch in der vorliegenden Studie benutzt) 313 Individuen mit Hypercholesterinämie gescreent, von denen ca. die Hälfte eine monogene FH aufwiesen. Hierbei zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen den LDL-C-Werten der mutationsnegativen Patient*innen (N=145) und dem hier untersuchten polygenen Score [64]. Sowohl Wang et al. als auch der Reviewartikel von Iacocca & Hegele [65] postulierten, dass mehrere SNPs als Cluster in blutsverwandten Familienangehörigen vorkommen. Die hierfür notwendigen Segregationsanalysen waren nicht Teil der vorliegenden Studie. Es wird angenommen, dass Patient*innen mit einer FH-verursachenden Mutation durch ihren gestörten LDL-Rezeptor-Metabolismus höhere Lp(a)-Werte aufweisen, als z.B. ihre Verwandten ohne Dyslipidämie [66]. Im hier untersuchten

Patient*innenkollektiv zeigte sich, dass Patient*innen mit Hypercholesterinämie ohne FH-verursachende Mutation signifikant höhere Lp(a)-Werte aufwiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Patient*innen mit FH-verursachender Mutation eine monogene Ursache für ihre erhöhten LDL-C-Werte haben, wohingegen bei den Patient*innen ohne identifizierte Mutation möglicherweise erhöhte Lp(a)-Werte die erhöhten LDL-C-Werte verursachen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in einer Gruppe von Menschen mit Hypercholesterinämie die mutationsnegativen Patient*innen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit noch höhere Lp(a)-Werte aufweisen, als unsere Patient*innen mit einer FH-verursachenden Variante. Da das kardiovaskuläre Risikoprofil von erhöhten Lp(a)-Werten und erhöhten LDL-C-Werten ähnlich ist und sich durch eine Kombination der beiden verstärkt, ist es möglich, dass erhöhte Lp(a)-Werte die FH-Erkrankung in einem Teil der mutationsnegativen Patient*innen verursachen [30, 67]. Ca. 29% der Patient*innen hatten Lp(a)-Werte von über 50 mg/dl, was mit den Daten von weißen Nordeuropäer*innen übereinstimmt [20]. Die Lp(a)-Anpassung wurde basierend auf einer Schätzung, die 30% der Lp(a)-Masse dem Lp(a)-Cholesterin zurechnet, durchgeführt [25-27]. Dass die Lp(a)-Werte nur mit den angepassten LDL-C_{corrected45}-Werten invers korrelierten, liegt möglicherweise daran, dass Patient*innen mit hohen Lp(a)-Werten einen höheren Anteil von Lp(a)-Cholesterin aufweisen und nach der Anpassung geringere „echte“ LDL-C-Werte aufweisen. Mit anderen Worten, je höher die Lp(a)-Werte und je höher die angenommene Lp(a)-Cholesterin-Masse, i.e. 45%, desto niedriger die angepassten LDL-C-Werte. Nach Anpassung der LDL-C-Werte an das Lp(a)-Cholesterin sanken die LDL-C-Werte und der DLCN-Score signifikant bei den an der Studie teilnehmenden Patient*innen. Hierdurch wird auch die FH-Diagnostik beeinflusst. Der Anteil Patient*innen mit einer FH-verursachenden Mutation, welche durch den DLCN-Score als *definitive* FH-Patient*innen eingestuft wurden, steigt von 82,5 auf 85,3%. Gleichzeitig sinkt der Anteil der mutationsnegativen Patient*innen mit *unwahrscheinlicher* FH-Diagnose von 17,2% auf 11,9%. Es kann also aufgrund der Lp(a)-Anpassung bei mehr Patient*innen durch den DLCN-Score der Mutationsstatus korrekt vorhergesagt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ca. 6% der Patient*innen nach der Lp(a)-Anpassung in eine jeweils niedrigere DLCN-Score-Klasse eingestuft wurden. Diese Ergebnisse decken sich mit aktuellen Studien, welche teilweise signifikante Verbesserungen in der Vorhersage des Vorhandenseins von pathogenen Varianten durch den DLCN-Score aufzeigten [31,

32]. Auch bei Einteilung in die verschiedenen LDL-C-Grenzwerte kam es nach der Anpassung zu einer Reklassifizierung von ca. 9% der Patient*innen. Die höchsten Proportionen von Reklassifizierungen fanden sich bei den mutationsnegativen Patient*innen, was dadurch erklärbar ist, dass diese Patient*innen eine noch unklare Ursache für ihre erhöhten LDL-C-Werte haben und hier erhöhtes Lp(a) einen großen Anteil der ursprünglichen Klassifizierung ausmacht. Fast 10% aller Patient*innen sind nach der Lp(a)-Anpassung von der LDL-C-Grenzwertgruppe 191-250 mg/dl in die Gruppe 155-190 mg/dl reklassifiziert worden. Ein LDL-C-Wert von 190 mg/dl ist wie eingangs beschrieben ein wichtiger Grenzwert, ab welchem überhaupt erst eine FH-Diagnostik und mögliche Therapie eingeleitet wird [3]. Das bedeutet, dass diese Patient*innen bei einer korrekten Messung der angepassten LDL-C möglicherweise gar nicht als FH-Patient*innen identifiziert worden wären. Hierbei sind vor allem die mutationsnegativen Patient*innen interessant. Um diese Gruppe weiter abzugrenzen, wurden die Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation in Patient*innen mit angepassten LDL-C-Werten über und unter 190 mg/dl und Lp(a)-Werten über und unter 50 mg/dl eingeteilt. Bei den mutationsnegativen Patient*innen mit LDL-C_{corrected30}-Werten über 190 mg/dl sollte man davon ausgehen, dass eine noch nicht identifizierte FH-verursachende Sequenzvariante oder mögliche epigenetische Modifikationen die Ursache der Erkrankung sind. Bei Patient*innen mit LDL-C_{corrected30}-Werten unter 190 mg/dl mit Lp(a)-Werten über 50 mg/dl ist es hingegen wahrscheinlich, dass die erhöhten Lp(a)-Werte für ihre Einteilung als FH-Patient*innen verantwortlich waren. Bei uns handelt es sich dabei um 7% unserer Patient*innen. Diese Patient*innen haben also möglicherweise mit erhöhten Lp(a)-Werten eine andere genetische Ursache ihrer Familiären Hypercholesterinämie, eine Art kombinierter Dyslipidämie. Diese Erkenntnis ist nicht unerheblich, da diese Patient*innen eine andere medizinische Betreuung benötigen als klassische FH-Patient*innen. Eine nicht nebenwirkungsarme Statintherapie beispielsweise erhöht in manchen Fällen die Lp(a)-Werte sogar, was bei diesen Patient*innen kontraproduktiv wäre [22, 23]. Auch im Hinblick auf das CVD-Risiko wurde in einer Studie von Langsted et al. gezeigt, dass die Hazard Ratios für kardiovaskuläre Mortalität 1,18 für jede 15-mg/dl-Steigerung der Lp(a)-Cholesterin-Anteils, aber nur 1,05 je 15-mg/dl-Steigerung des Cholesterin-Anteils im LDL-C waren [53]. Dies verdeutlicht, dass das Mortalitätsrisiko des Lp(a) nicht allein durch dessen Cholesterin-Anteil ausgemacht wird. Daher sollten die Lp(a)-Bestimmung und die Lp(a)-Anpassung der LDL-C-

Werte ein fester Bestandteil in der FH-Diagnostik sein, um eine akkuratere Risikostratifizierung für die Patient*innen mit Hypercholesterinämie zu ermöglichen. Eine Limitation der vorliegenden Untersuchungen ist, dass der Anteil des Lp(a)-Cholesterins (30%) und somit des LDL-C_{corrected}³⁰ in Übereinstimmung mit aktueller Literatur geschätzt wurde, da gegenwärtig kein laborchemisches Verfahren zur genauen Bestimmung besteht.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Studie ein Überblick und eine Erweiterung des Mutationsspektrums in deutschen Patient*innen mit Hypercholesterinämie dargelegt werden. Des Weiteren konnte nicht bestätigt werden, dass der polygene Score von Futema und Kolleg*innen einen Vorteil für die Diagnostik von Patient*innen mit Hypercholesterinämie bietet. Vor allem die mutationsnegativen Patient*innen sollten im Fokus zukünftiger Forschung stehen, da ihr klinischer Phänotyp nicht allein durch eine polygene Ätiologie erklärt werden kann. Stattdessen könnten polygene Scores eine wichtige Rolle als Erweiterung in der Abschätzung des allgemeinen kardiovaskulären Risikos der Patient*innen spielen. Darüber hinaus konnte die Notwendigkeit der Einbeziehung der Lp(a)-Werte und der Lp(a)-Anpassung der LDL-C-Werte bei Patient*innen mit Hypercholesterinämie darlegt werden. Gerade bei den Patient*innen ohne FH-verursachende Mutation könnten erhöhte Lp(a)-Werte einen Großteil ihres klinischen Phänotyps bedingen.

3.5. Literaturverzeichnis

1. Ference, B.A., H.N. Ginsberg, I. Graham, K.K. Ray, C.J. Packard, E. Bruckert, R.A. Hegele, R.M. Krauss, F.J. Raal, H. Schunkert, G.F. Watts, J. Borén, S. Fazio, J.D. Horton, L. Masana, S.J. Nicholls, B.G. Nordestgaard, B. van de Sluis, M.R. Taskinen, L. Tokgözoğlu, U. Landmesser, U. Laufs, O. Wiklund, J.K. Stock, M.J. Chapman, and A.L. Catapano, *Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel*. Eur Heart J, 2017. **38**(32): p. 2459-2472.
2. Nordestgaard, B.G., M.J. Chapman, S.E. Humphries, H.N. Ginsberg, L. Masana, O.S. Descamps, O. Wiklund, R.A. Hegele, F.J. Raal, J.C. Defesche, A. Wiegman, R.D. Santos, G.F. Watts, K.G. Parhofer, G.K. Hovingh, P.T. Kovanen, C. Boileau, M. Averna, J. Borén, E. Bruckert, A.L. Catapano, J.A. Kuivenhoven, P. Pajukanta, K. Ray, A.F. Stalenhoef, E. Stroes, M.R. Taskinen, A. Tybjærg-Hansen, and E.A.S.C. Panel, *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**(45): p. 3478-90a.
3. Members, A.T.F., E.C.f.P.G. (CPG), and E.N.C. Societies, *2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk*. Atherosclerosis, 2019. **290**: p. 140-205.
4. Kassner, U., M. Wühle-Demuth, I. Missala, S.E. Humphries, E. Steinhagen-Thiessen, and I. Demuth, *Clinical utility gene card for: hyperlipoproteinemia, TYPE II*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(7).
5. Mbikay, M., J. Mayne, and M. Chrétien, *Proprotein convertases subtilisin/kexin type 9, an enzyme turned escort protein: hepatic and extra hepatic functions*. J Diabetes, 2013. **5**(4): p. 391-405.
6. Soutar, A.K. and R.P. Naoumova, *Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. **4**(4): p. 214-25.
7. Fellin, R., M. Arca, G. Zuliani, S. Calandra, and S. Bertolini, *The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification*. Gene, 2015. **555**(1): p. 23-32.
8. Leigh, S., M. Futema, R. Whittall, A. Taylor-Beadling, M. Williams, J.T. den Dunnen, and S.E. Humphries, *The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update*. J Med Genet, 2017. **54**(4): p. 217-223.
9. Grenkowitz, T., U. Kassner, M. Wühle-Demuth, B. Salewsky, A. Rosada, T. Zemojtel, W. Hopfenmüller, B. Isermann, K. Borucki, F. Heigl, U. Laufs, S. Wagner, M.E. Kleber, P. Binner, W. März, E. Steinhagen-Thiessen, and I. Demuth, *Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis, 2016. **253**: p. 88-93.
10. Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, and A.L.Q.A. Committee, *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**(5): p. 405-24.
11. Chora, J.R., A.M. Medeiros, A.C. Alves, and M. Bourbon, *Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial*

- hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis.* Genet Med, 2018. **20**(6): p. 591-598.
12. Graham, C.A., B.P. McIlhatton, C.W. Kirk, E.D. Beattie, K. Lyttle, P. Hart, R.D. Neely, I.S. Young, and D.P. Nicholls, *Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate.* Atherosclerosis, 2005. **182**(2): p. 331-40.
 13. Talmud, P.J., S. Shah, R. Whittall, M. Futema, P. Howard, J.A. Cooper, S.C. Harrison, K. Li, F. Drenos, F. Karpe, H.A. Neil, O.S. Descamps, C. Langenberg, N. Lench, M. Kivimaki, J. Whittaker, A.D. Hingorani, M. Kumari, and S.E. Humphries, *Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study.* Lancet, 2013. **381**(9874): p. 1293-301.
 14. Marduel, M., K. Ouguerram, V. Serre, D. Bonnefont-Rousselot, A. Marques-Pinheiro, K. Erik Berge, M. Devillers, G. Luc, J.M. Lecerf, L. Tosolini, D. Erlich, G.M. Peloso, N. Stitzel, P. Nitchké, J.P. Jaïs, M. Abifadel, S. Kathiresan, T.P. Leren, J.P. Rabès, C. Boileau, M. Varret, and F.R.N.o. ADH, *Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation.* Hum Mutat, 2013. **34**(1): p. 83-7.
 15. Fouchier, S.W., G.M. Dallinga-Thie, J.C. Meijers, N. Zelcer, J.J. Kastelein, J.C. Defesche, and G.K. Hovingh, *Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia.* Circ Res, 2014. **115**(6): p. 552-5.
 16. Danyel, M., C.E. Ott, T. Grenkowitz, B. Salewsky, A.A. Hicks, C. Fuchsberger, E. Steinhagen-Thiessen, T. Bobbert, U. Kassner, and I. Demuth, *Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11995.
 17. Loaiza, N., M.L. Hartgers, L.F. Reeskamp, J.W. Balder, A. Rimbart, V. Bazioti, J.C. Wolters, M. Winkelmeijer, H.P.G. Jansen, G.M. Dallinga-Thie, A. Volta, N. Huijkman, M. Smit, N. Kloosterhuis, M. Koster, A. F Svendsen, B. van de Sluis, G.K. Hovingh, A. Grefhorst, and J.A. Kuivenhoven, *Taking One Step Back in Familial Hypercholesterolemia:.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020: p. ATVBAHA119313470.
 18. Teslovich, T.M., K. Musunuru, A.V. Smith, A.C. Edmondson, I.M. Stylianou, M. Koseki, J.P. Pirruccello, S. Ripatti, D.I. Chasman, C.J. Willer, C.T. Johansen, S.W. Fouchier, A. Isaacs, G.M. Peloso, M. Barbalic, S.L. Ricketts, J.C. Bis, Y.S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M.F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J.Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Tzee-Hee Ong, D.C. Croteau-Chonka, L.A. Lange, J.D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R.Y. Zee, A.F. Wright, J.C. Witteman, J.F. Wilson, G. Willemsen, H.E. Wichmann, J.B. Whitfield, D.M. Waterworth, N.J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B.F. Voight, V. Vitart, A.G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J.R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H.M. Stringham, T.D. Spector, N. Soranzo, J.H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E.J. Sijbrands, A. Scuteri, J. Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruukonen, I. Rudan, L.M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B.M. Psaty, P.P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B.W. Penninx, N.L. Pedersen, C. Pattaro, A.N. Parker, G. Pare, B.A. Oostra, C.J. O'Donnell, M.S. Nieminen, D.A. Nickerson, G.W. Montgomery, T. Meitinger, R. McPherson, M.I. McCarthy, W. McArdle, D. Masson, N.G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P.K. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R.J. Loos, M.L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L.J. Launer, E.G. Lakatta, R. Laaksonen, K.O. Kyvik, F. Kronenberg, I.R. König, K.T. Khaw, J.

- Kaprio, L.M. Kaplan, A. Johansson, M.R. Jarvelin, A.C. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J.J. Hottenga, A. Hofman, A.A. Hicks, C. Hengstenberg, I.M. Heid, C. Hayward, A.S. Havulinna, N.D. Hastie, T.B. Harris, T. Haritunians, A.S. Hall, U. Gyllensten, C. Guiducci, L.C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N.B. Freimer, L. Ferrucci, J. Erdmann, P. Elliott, K.G. Ejebe, A. Döring, A.F. Dominiczak, S. Demissie, P. Deloukas, E.J. de Geus, U. de Faire, G. Crawford, F.S. Collins, Y.D. Chen, M.J. Caulfield, H. Campbell, N.P. Burt, L.L. Bonnycastle, D.I. Boomsma, S.M. Boekholdt, R.N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C.M. Ballantyne, T.L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T.Y. Wong, E.S. Tai, A.B. Feranil, C.W. Kuzawa, L.S. Adair, H.A. Taylor, I.B. Borecki, S.B. Gabriel, J.G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R.M. Krauss, K.L. Mohlke, J.M. Ordovas, P.B. Munroe, J.S. Kooner, A.R. Tall, R.A. Hegele, J.J. Kastelein, E.E. Schadt, J.I. Rotter, E. Boerwinkle, D.P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M.P. Reilly, N.J. Samani, H. Schunkert, L.A. Cupples, M.S. Sandhu, P.M. Ridker, D.J. Rader, C.M. van Duijn, L. Peltonen, G.R. Abecasis, M. Boehnke and S. Kathiresan, *Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids*. *Nature*, 2010. **466**(7307): p. 707-13.
19. Futema, M., S. Shah, J.A. Cooper, K. Li, R.A. Whittall, M. Sharifi, O. Goldberg, E. Drogari, V. Mollaki, A. Wiegman, J. Defesche, M.N. D'Agostino, A. D'Angelo, P. Rubba, G. Fortunato, M. Waluś-Miarka, R.A. Hegele, M. Aderayo Bamimore, R. Durst, E. Leitersdorf, M.T. Mulder, J.E. Roeters van Lennep, E.J. Sijbrands, J.C. Whittaker, P.J. Talmud, and S.E. Humphries, *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**(1): p. 231-8.
 20. Nordestgaard, B.G., M.J. Chapman, K. Ray, J. Borén, F. Andreotti, G.F. Watts, H. Ginsberg, P. Amarengo, A. Catapano, O.S. Descamps, E. Fisher, P.T. Kovanen, J.A. Kuivenhoven, P. Lesnik, L. Masana, Z. Reiner, M.R. Taskinen, L. Tokgözoğlu, A. Tybjaerg-Hansen, and E.A.S.C. Panel, *Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(23): p. 2844-53.
 21. Schmidt, K., A. Noureen, F. Kronenberg, and G. Utermann, *Structure, function, and genetics of lipoprotein (a)*. *J Lipid Res*, 2016. **57**(8): p. 1339-59.
 22. Tsimikas, S., J.L. Witztum, E.R. Miller, W.J. Sasiela, M. Szarek, A.G. Olsson, G.G. Schwartz, and M.I.R.w.A.C.L.M.S. Investigators, *High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial*. *Circulation*, 2004. **110**(11): p. 1406-12.
 23. Tsimikas, S., P.L.S.M. Gordts, C. Nora, C. Yeang, and J.L. Witztum, *Statin therapy increases lipoprotein(a) levels*. *Eur Heart J*, 2020. **41**(24): p. 2275-2284.
 24. Viney, N.J., J.C. van Capelleveen, R.S. Geary, S. Xia, J.A. Tami, R.Z. Yu, S.M. Marcovina, S.G. Hughes, M.J. Graham, R.M. Croke, S.T. Croke, J.L. Witztum, E.S. Stroes, and S. Tsimikas, *Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials*. *Lancet*, 2016. **388**(10057): p. 2239-2253.
 25. Kinpara, K., H. Okada, A. Yoneyama, M. Okubo, and T. Murase, *Lipoprotein(a)-cholesterol: a significant component of serum cholesterol*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(19-20): p. 1783-7.

26. Lamon-Fava, S., S.M. Marcovina, J.J. Albers, H. Kennedy, C. DeLuca, C.C. White, L.A. Cupples, J.R. McNamara, L.J. Seman, V. Bongard, and E.J. Schaefer, *Lipoprotein(a) levels, apo(a) isoform size, and coronary heart disease risk in the Framingham Offspring Study*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(6): p. 1181-1187.
27. Langlois, M.R., M.J. Chapman, C. Cobbaert, S. Mora, A.T. Remaley, E. Ros, G.F. Watts, J. Borén, H. Baum, E. Bruckert, A. Catapano, O.S. Descamps, A. von Eckardstein, P.R. Kamstrup, G. Kolovou, F. Kronenberg, A. Langsted, K. Pulkki, N. Rifai, G. Sypniewska, O. Wiklund, B.G. Nordestgaard, and E.A.S.E.a.t.E.F.o.C.C.a.L.M.E.J.C. Initiative, *Quantifying Atherogenic Lipoproteins: Current and Future Challenges in the Era of Personalized Medicine and Very Low Concentrations of LDL Cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM*. *Clin Chem*, 2018. **64**(7): p. 1006-1033.
28. Kronenberg, F. and G. Utermann, *Lipoprotein(a): resurrected by genetics*. *J Intern Med*, 2013. **273**(1): p. 6-30.
29. Byun, Y.S., X. Yang, W. Bao, D. DeMicco, R. Laskey, J.L. Witztum, S. Tsimikas, and S.T. Investigators, *Oxidized Phospholipids on Apolipoprotein B-100 and Recurrent Ischemic Events Following Stroke or Transient Ischemic Attack*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **69**(2): p. 147-158.
30. Langsted, A., P.R. Kamstrup, M. Benn, A. Tybjaerg-Hansen, and B.G. Nordestgaard, *High lipoprotein(a) as a possible cause of clinical familial hypercholesterolaemia: a prospective cohort study*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016. **4**(7): p. 577-87.
31. Chan, D.C., J. Pang, A.J. Hooper, D.A. Bell, J.R. Burnett, and G.F. Watts, *Effect of Lipoprotein(a) on the Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: Does It Make a Difference in the Clinic?* *Clin Chem*, 2019. **65**(10): p. 1258-1266.
32. Fatica, E.M., J.W. Meeusen, V.C. Vasile, A.S. Jaffe, and L.J. Donato, *Measuring the contribution of Lp(a) cholesterol towards LDL-C interpretation*. *Clin Biochem*, 2020. **86**: p. 45-51.
33. Willeit, P., C. Yeang, P.M. Moriarty, L. Tschiderer, S.A. Varvel, J.P. McConnell, and S. Tsimikas, *Low-Density Lipoprotein Cholesterol Corrected for Lipoprotein(a) Cholesterol, Risk Thresholds, and Cardiovascular Events*. *J Am Heart Assoc*, 2020. **9**(23): p. e016318.
34. Bertram, L., A. Böckenhoff, I. Demuth, S. Düzel, R. Eckardt, S.C. Li, U. Lindenberger, G. Pawelec, T. Siedler, G.G. Wagner, and E. Steinhagen-Thiessen, *Cohort profile: The Berlin Aging Study II (BASE-II)*. *Int J Epidemiol*, 2014. **43**(3): p. 703-12.
35. Demuth, I., V.L. Banszerus, J. Drewelies, S. Düzel, U. Seeland, D. Spira, E. Tse, J. Braun, L. Bertram, A. Thiel, U. Lindenberger, V. Regitz-Zagrosek, and D. Gerstorf, *Cohort Profile Update: GendAge and Berlin Aging Study II (BASE-II)*. *medRxiv*, 2020: p. 2020.09.05.20187898.
36. Gerstorf, D., L. Bertram, U. Lindenberger, G. Pawelec, I. Demuth, E. Steinhagen-Thiessen, and G.G. Wagner, *Editorial*. *Gerontology*, 2016. **62**(3): p. 311-5.
37. Rieck, L., F. Bardey, T. Grenkowitz, L. Bertram, J. Helmuth, C. Mischung, J. Spranger, E. Steinhagen-Thiessen, T. Bobbert, U. Kassner, and I. Demuth, *Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia*. *Clin Genet*, 2020. **98**(5): p. 457-467.
38. Adams, S.P., M. Tsang, and J.M. Wright, *Lipid lowering efficacy of atorvastatin*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. **12**: p. CD008226.
39. Ara, R., I. Tumur, A. Pandor, A. Duenas, R. Williams, A. Wilkinson, S. Paisley, and J. Chilcott, *Ezetimibe for the treatment of hypercholesterolaemia: a*

- systematic review and economic evaluation*. Health Technol Assess, 2008. **12**(21): p. iii, xi-xiii, 1-212.
40. Ballantyne, C.M., R.C. Hoogeveen, J.L. Raya, V.A. Cain, M.K. Palmer, B.W. Karlson, and G.S. Investigators, *Efficacy, safety and effect on biomarkers related to cholesterol and lipoprotein metabolism of rosuvastatin 10 or 20 mg plus ezetimibe 10 mg vs. simvastatin 40 or 80 mg plus ezetimibe 10 mg in high-risk patients: Results of the GRAVITY randomized study*. Atherosclerosis, 2014. **232**(1): p. 86-93.
 41. Ballantyne, C.M., J. Hourri, A. Notarbartolo, L. Melani, L.J. Lipka, R. Suresh, S. Sun, A.P. LeBeaut, P.T. Sager, E.P. Veltri, and E.S. Group, *Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial*. Circulation, 2003. **107**(19): p. 2409-15.
 42. Ballantyne, C.M., F. Pazzucconi, X. Pintó, J.P. Reckless, E. Stein, J. McKenney, M. Bortolini, and Y.T. Chiang, *Efficacy and tolerability of fluvastatin extended-release delivery system: a pooled analysis*. Clin Ther, 2001. **23**(2): p. 177-92.
 43. Ballantyne, C.M., R. Weiss, T. Moccetti, A. Vogt, B. Eber, F. Sosef, E. Duffield, and E.S. Investigators, *Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study)*. Am J Cardiol, 2007. **99**(5): p. 673-80.
 44. Foody, J.M., P.P. Toth, J.E. Tomassini, S. Sajjan, D.R. Ramey, D. Neff, A.M. Tershakovec, H. Hu, and K. Tunceli, *Changes in LDL-C levels and goal attainment associated with addition of ezetimibe to simvastatin, atorvastatin, or rosuvastatin compared with titrating statin monotherapy*. Vasc Health Risk Manag, 2013. **9**: p. 719-27.
 45. Jones, P., S. Kafonek, I. Laurora, and D. Hunninghake, *Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study)*. Am J Cardiol, 1998. **81**(5): p. 582-7.
 46. Law, M.R., N.J. Wald, and A.R. Rudnicka, *Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2003. **326**(7404): p. 1423.
 47. Stenson, P.D., M. Mort, E.V. Ball, K. Evans, M. Hayden, S. Heywood, M. Hussain, A.D. Phillips, and D.N. Cooper, *The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies*. Hum Genet, 2017. **136**(6): p. 665-677.
 48. Landrum, M.J., J.M. Lee, M. Benson, G.R. Brown, C. Chao, S. Chitipiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, W. Jang, K. Karapetyan, K. Katz, C. Liu, Z. Maddipatla, A. Malheiro, K. McDaniel, M. Ovetsky, G. Riley, G. Zhou, J.B. Holmes, B.L. Kattman, and D.R. Maglott, *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D1062-D1067.
 49. Adzhubei, I.A., S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, and S.R. Sunyaev, *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
 50. Schwarz, J.M., D.N. Cooper, M. Schuelke, and D. Seelow, *MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age*. Nat Methods, 2014. **11**(4): p. 361-2.

51. Desmet, F.O., D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Bérout, M. Claustres, and C. Bérout, *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(9): p. e67.
52. Nykamp, K., M. Anderson, M. Powers, J. Garcia, B. Herrera, Y.Y. Ho, Y. Kobayashi, N. Patil, J. Thusberg, M. Westbrook, S. Topper, and I.C.G. Group, *Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria*. *Genet Med*, 2017. **19**(10): p. 1105-1117.
53. Langsted, A., P.R. Kamstrup, and B.G. Nordestgaard, *High lipoprotein(a) and high risk of mortality*. *Eur Heart J*, 2019. **40**(33): p. 2760-2770.
54. Austin, M.A., C.M. Hutter, R.L. Zimmern, and S.E. Humphries, *Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review*. *Am J Epidemiol*, 2004. **160**(5): p. 407-20.
55. Cuchel, M., E. Bruckert, H.N. Ginsberg, F.J. Raal, R.D. Santos, R.A. Hegele, J.A. Kuivenhoven, B.G. Nordestgaard, O.S. Descamps, E. Steinhagen-Thiessen, A. Tybjærg-Hansen, G.F. Watts, M. Averna, C. Boileau, J. Borén, A.L. Catapano, J.C. Defesche, G.K. Hovingh, S.E. Humphries, P.T. Kovanen, L. Masana, P. Pajukanta, K.G. Parhofer, K.K. Ray, A.F. Stalenhoef, E. Stroes, M.R. Taskinen, A. Wiegman, O. Wiklund, M.J. Chapman, and E.A.S.C.P.o.F. *Hypercholesterolaemia, Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(32): p. 2146-57.
56. Kircher, M., C. Xiong, B. Martin, M. Schubach, F. Inoue, R.J.A. Bell, J.F. Costello, J. Shendure, and N. Ahituv, *Saturation mutagenesis of twenty disease-associated regulatory elements at single base-pair resolution*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3583.
57. Silva, P.R.S., C.E. Jannes, T.G.M. Oliveira, M.H. Miname, V.Z. Rocha, A.P. Chacra, M.H.C. Gurgel, R.M. Montenegro, C.R.M. Rodrigues Sobrinho, A.S. Bello Moreira, M.H.V. Assad, M.R.C. Pinto, M.T. Tada, R.D. Santos, A.C. Pereira, and J.E. Krieger, *Evaluation of clinical and laboratory parameters used in the identification of index cases for genetic screening of familial hypercholesterolemia in Brazil*. *Atherosclerosis*, 2017. **263**: p. 257-262.
58. Garg, A., V. Garg, R.A. Hegele, and G.F. Lewis, *Practical definitions of severe versus familial hypercholesterolaemia and hypertriglyceridaemia for adult clinical practice*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019. **7**(11): p. 880-886.
59. Sharifi, M., M. Futema, D. Nair, and S.E. Humphries, *Polygenic Hypercholesterolemia and Cardiovascular Disease Risk*. *Curr Cardiol Rep*, 2019. **21**(6): p. 43.
60. Trinder, M., X. Li, M.L. DeCastro, L. Cermakova, S. Sadananda, L.M. Jackson, H. Azizi, G.B.J. Mancini, G.A. Francis, J. Frohlich, and L.R. Brunham, *Risk of Premature Atherosclerotic Disease in Patients With Monogenic Versus Polygenic Familial Hypercholesterolemia*. *J Am Coll Cardiol*, 2019. **74**(4): p. 512-522.
61. Trinder, M., M. Paquette, L. Cermakova, M.R. Ban, R.A. Hegele, A. Baass, and L.R. Brunham, *Polygenic Contribution to Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Cardiovascular Risk in Monogenic Familial Hypercholesterolemia*. *Circ Genom Precis Med*, 2020. **13**(5): p. 515-523.
62. Paquette, M., M. Chong, S. Thériault, R. Dufour, G. Paré, and A. Baass, *Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia*. *J Clin Lipidol*, 2017. **11**(3): p. 725-732.e5.

63. Lamiquiz-Moneo, I., M.R. Pérez-Ruiz, E. Jarauta, M.T. Tejedor, A.M. Bea, R. Mateo-Gallego, S. Pérez-Calahorra, L. Baila-Rueda, V. Marco-Benedí, I. de Castro-Orós, A. Cenarro, and F. Civeira, *Single Nucleotide Variants Associated With Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically With Familial Hypercholesterolemia*. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2018. **71**(5): p. 351-356.
64. Wang, J., J.S. Dron, M.R. Ban, J.F. Robinson, A.D. McIntyre, M. Alazzam, P.J. Zhao, A.A. Dilliot, H. Cao, M.W. Huff, D. Rhainds, C. Low-Kam, M.P. Dubé, G. Lettre, J.C. Tardif, and R.A. Hegele, *Polygenic Versus Monogenic Causes of Hypercholesterolemia Ascertained Clinically*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(12): p. 2439-2445.
65. Iacocca, M.A. and R.A. Hegele, *Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(7): p. 641-651.
66. Alonso, R., E. Andres, N. Mata, F. Fuentes-Jiménez, L. Badimón, J. López-Miranda, T. Padró, O. Muñiz, J.L. Díaz-Díaz, M. Mauri, J.M. Ordovás, P. Mata, and S. Investigators, *Lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia: an important predictor of cardiovascular disease independent of the type of LDL receptor mutation*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(19): p. 1982-9.
67. Ellis, K.L., J. Pang, D.C. Chan, A.J. Hooper, D.A. Bell, J.R. Burnett, and G.F. Watts, *Familial combined hyperlipidemia and hyperlipoprotein(a) as phenotypic mimics of familial hypercholesterolemia: Frequencies, associations and predictions*. *J Clin Lipidol*, 2016. **10**(6): p. 1329-1337.e3.

3.6. Abbildungsverzeichnis

Rieck, L., F. Bardey, T. Grenkowitz, L. Bertram, J. Helmuth, C. Mischung, J. Spranger, E. Steinhagen-Thiessen, T. Bobbert, U. Kassner, and I. Demuth, *Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia*. *Clin Genet*, 2020. **98**(5): p. 457-467.

4. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lorenz Rieck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Clinical and molecular genetic characterization of patients with familial hypercholesterolemia*

*/ Klinische und molekulargenetische Charakterisierung von Patient*innen mit Familiärer Hypercholesterinämie* 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 Autor*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

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Lorenz Rieck hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Rieck L, Bardey F, Grenkowitz T, Bertram L, Helmuth J, Mischung C, Spranger J, Steinhagen-Thiessen E, Bobbert T, Kassner U, Demuth I. Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia. Clin Genet. 2020 Nov.

Beitrag im Einzelnen: In der vorliegenden Publikation habe ich in Zusammenarbeit mit Dr. med. U. Kassner und Prof. I. Demuth das Studiendesign entworfen. Die Rohdaten der Patient*innen und die molekulargenetischen Daten habe ich in einer Tabelle zusammengeführt, geordnet und die Klassifizierung der Sequenzvarianten durchgeführt. Die fehlenden SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms) für die Berechnung des 6-SNP polygenen Scores habe ich in Laborarbeit aus DNA-Proben der 336 Studienproband*innen mittels einer SNaP-Shot-Analyse generiert und ausgewertet. Die Lp(a)-Werte und Anpassung der LDL-C-Werte habe ich in Zusammenarbeit mit Dr. med. U. Kassner vervollständigt. Die statistischen Analysen habe ich in Rücksprache mit Prof. I. Demuth durchgeführt. Alle Abbildungen des Manteltextes und der Publikation habe ich in einem ersten Entwurf generiert und daraufhin mit meinen Kolleg*innen optimiert. Ich habe den ersten Entwurf der Publikation geschrieben und dann in Zusammenarbeit mit meinen Kolleg*innen fertiggestellt, und die Revision auf Grundlage der Gutachterkommentare vorbereitet und in Abstimmung mit den Ko-Autor*innen fertiggestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“GENETICS and HEREDITY”** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 173 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS GENETICS	36,697	43.704	0.079260
2	NATURE GENETICS	93,920	25.455	0.221380
3	TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION	36,697	15.236	0.035920
4	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION	46,915	14.797	0.092200
5	GENOME BIOLOGY	38,920	14.028	0.133310
6	Genome Medicine	5,264	10.886	0.023220
7	TRENDS IN GENETICS	11,959	10.627	0.021110
8	GENOME RESEARCH	39,240	9.944	0.079580
9	AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS	36,007	9.924	0.063650
10	Annual Review of Genetics	7,478	9.184	0.011380
11	GENES & DEVELOPMENT	54,563	8.990	0.072340
12	GENETICS IN MEDICINE	10,855	8.683	0.035800
13	MOLECULAR THERAPY	16,991	8.402	0.030050
14	Annual Review of Genomics and Human Genetics	2,537	7.914	0.006020
15	ONCOGENE	63,249	6.634	0.074600
16	GENOMICS PROTEOMICS & BIOINFORMATICS	1,612	6.597	0.004790
17	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	3,566	6.081	0.004090
18	JOURNAL OF MEDICAL GENETICS	12,417	5.899	0.016850
19	Molecular Autism	2,107	5.712	0.008000

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART C-SEMINARS IN MEDICAL GENETICS	2,139	5.683	0.004860
21	Clinical Epigenetics	2,900	5.496	0.009690
22	CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT	7,687	5.288	0.016910
23	PLoS Genetics	43,864	5.224	0.143490
24	HUMAN GENETICS	8,640	5.207	0.014490
25	Advances in Genetics	1,636	4.913	0.003180
26	Forensic Science International-Genetics	4,388	4.884	0.007040
27	Circulation-Cardiovascular Genetics	3,441	4.864	0.010500
28	Microbial Genomics	573	4.853	0.003040
29	JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM	7,195	4.746	0.010880
30	CANCER GENE THERAPY	2,842	4.681	0.003200
31	Journal of Genetics and Genomics	2,005	4.650	0.004740
32	HUMAN MOLECULAR GENETICS	39,859	4.544	0.069190
33	HUMAN MUTATION	13,037	4.453	0.024570
34	npj Genomic Medicine	305	4.422	0.001620
35	Epigenomics	2,555	4.404	0.007650
36	JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE	5,868	4.287	0.008410
37	Epigenetics & Chromatin	1,623	4.185	0.007590
38	Epigenetics	5,480	4.173	0.013400
39	CLINICAL GENETICS	7,288	4.104	0.014560
40	Plant Genome	1,425	4.042	0.003320

Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia

Lorenz Rieck¹  | Frieda Bardey¹ | Thomas Grenkowitz² | Lars Bertram^{3,4} | Johannes Helmuth⁵ | Claudia Mischung⁵ | Joachim Spranger¹ | Elisabeth Steinhagen-Thiessen¹ | Thomas Bobbert¹ | Ursula Kassner¹ | Ilja Demuth^{1,6}

¹Department of Endocrinology and Metabolism, Charité - Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

²Department of Cardiology, Charité - University Medicine Berlin (Campus Benjamin Franklin), Berlin, Germany

³Lübeck Interdisciplinary Platform for Genome Analytics, Institutes of Neurogenetics and Cardiogenetics, University of Lübeck, Lübeck, Germany

⁴Center for Lifespan Changes in Brain and Cognition (LCBC), Dept of Psychology, University of Oslo, Oslo, Norway

⁵Department Molecular Diagnostics, Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH, Berlin, Germany

⁶Charité - Universitätsmedizin Berlin, BCRT - Berlin Institute of Health Center for Regenerative Therapies, Berlin, Germany

Correspondence

Ilja Demuth PhD, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Department of Endocrinology and Metabolism, Biology of Aging Group, Augustenburger Platz 1, Berlin 13353, Germany.

Email: ilja.demuth@charite.de

Funding information

Bundesministerium für Bildung und Forschung, Grant/Award Numbers: 01GL1716A, 01GL1716B, 01UW0808, 16SV5536K, 16SV5537, 16SV5538, 16SV5837; Max-Planck-Gesellschaft; Charité Universitätsmedizin Berlin

Abstract

Autosomal-dominant familial hypercholesterolemia (FH) is characterized by increased plasma concentrations of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and a substantial risk to develop cardiovascular disease. Causative mutations in three major genes are known: the *LDL receptor* gene (*LDLR*), the *apolipoprotein B* gene (*APOB*) and the *proprotein convertase subtilisin/kexin 9* gene (*PCSK9*). We clinically characterized 336 patients suspected to have FH and screened them for disease causing mutations in *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9*. We genotyped six single nucleotide polymorphisms (SNPs) to calculate a polygenic risk score for the patients and 1985 controls. The 117 patients had a causative variant in one of the analyzed genes. Most variants were found in the *LDLR* gene (84.9%) with 11 novel mutations. The mean polygenic risk score was significantly higher in FH mutation negative subjects than in FH mutation positive patients ($P < .05$) and healthy controls ($P < .001$), whereas the score of the two latter groups did not differ significantly. However, the score explained only about 3% of the baseline LDL-C variance. We verified the previously described clinical and genetic variability of FH for German hypercholesterolemic patients. Evaluation of a six-SNP polygenic score recently proposed for clinical use suggests that it is not a reliable tool to classify hypercholesterolemic patients.

Ursula Kassner and Ilja Demuth contributed equally to this study.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2020 The Authors. *Clinical Genetics* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Autosomal-dominant familial hypercholesterolemia (FH, OMIM 143890) is a common genetic disorder with a prevalence of up to 1:250 in the European population and an even higher prevalence in some populations due to founder effects. In its typical form, FH is characterized by increased plasma concentrations of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and a high risk to develop cardiovascular disease (CVD).^{1,2} A widely used tool in Europe for the clinical diagnosis of FH is the Dutch lipid clinic network (DLCN) score which is a point-based score system to assess the patients according to their clinical phenotypes considering the plasma LDL-C concentration, the family and/or patients history of premature CVD, clinical signs like tendon xanthoma and/or premature corneal arcus, and the results of molecular genetic analysis. According to the DLCN score in patients with a score below 3 and between 3 to 5 a diagnosis of FH is either *unlikely* or *possible*, whereas those with a score of 6 to 8 and above 8 have a *probable* or *definite* FH diagnosis, respectively.² Furthermore, mutations in three genes are known to cause FH: the *LDL receptor* gene (*LDLR*), the *apolipoprotein B* gene (*APOB*) and the *proprotein convertase subtilisin/kexin 9* gene (*PCSK9*).^{3,5} Mutations in the *LDL receptor adapter protein 1* gene (*LDLRAP1*) cause a very rare autosomal-recessive (AR) form of the disease, that is, AR hypercholesterolemia with a FH-like clinical phenotype.⁶ The majority of FH causing variants have been found in the *LDLR* gene with currently over 1900 reported sequence alterations (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/LDLR>).⁷ This corresponds with findings in the German population where the most common FH causing variants are found in *LDLR*, mostly of the missense type.⁸ The independent CVD risk factor lipoprotein (a) is important to take into consideration when discussing treatments available in the near future and risk stratification for hypercholesterolemic patients.⁹

In about 60% to 80% of the definite FH cases, a causative mutation can be found in one of the three known genes, but only in about 20% to 30% of *possible* FH cases.^{10,11} Since the unequivocal diagnosis of FH is primarily based on molecular testing, this leaves medical scientists with a conundrum because up to 60% of the clinically diagnosed patients turn out to be nonmutation carriers, that is, with no identified pathogenic sequence variant in one of the above mentioned genes.¹² This diagnostic gap might be explained by several factors: additional FH causing gene loci that have yet to be identified, a multifactorial polygenic genetic cause of the disease and the presence of epigenetic modifications. To this end, recent studies have evaluated a possible fourth FH causing gene, the *APOE* variant c.500_502delTCC (p.Leu167del), and found evidence for a potential disease causing role.¹³ Furthermore *STAP1* was suggested to be associated with FH, however, we were not able to confirm this in a recent study on 75 hypercholesterolemic patients from Berlin, Germany, who were negative for mutations in canonical FH genes.^{14,15} In a recent study on mouse models and samples from *STAP1* carriers the gene was ruled out as a FH causing candidate.¹⁶ In 2010, a meta-analysis of genome-wide association studies identified multiple common single nucleotide polymorphisms (SNPs) to be strongly associated with elevated LDL-C

concentrations.¹⁷ Talmud et al hypothesized that the mutation negative FH patients might carry a greater-than-average number of these common LDL-C raising variants and assembled a 12-SNP polygenic score based on the variants with the strongest LDL-C associations. They found the score to be significantly higher when compared to the score of Whitehall II control cohort or to FH patients carrying a disease causing mutation ("mutation positive").¹¹ Futema et al successfully refined the score by selecting six SNPs from the original 12-SNP score, and were able to replicate the earlier findings, that is, the six-SNP polygenic score performed as well as the 12-SNP score suggesting that mutation negative FH patients have a significantly higher score when compared to mutation positive patients or controls. The authors concluded that hypercholesterolemia in almost 90% of the mutation negative patients has a polygenic basis.¹⁸

In the current study we analyzed the mutational spectrum and clinical phenotypes in 336 German patients with hypercholesterolemia. Furthermore, we determined the six-SNP polygenic score as proposed by Futema and colleagues¹⁸ in these subjects and compared these to a control group of almost 2000 individuals from the Berlin Aging Study II (BASE-II),¹⁹ assessed its impact on LDL-C levels, and discussed its putative clinical benefit.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subjects and recruitment

We included 336 patients ascertained between 2016 and 2019 in the specialized Lipid Clinic of the Department of Endocrinology and Metabolism, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany diagnosed with hypercholesterolemia. All participants gave written informed consent prior to participation.

As a control group, we evaluated data from the BASE-II,¹⁹ which is a multi-institutional and multidisciplinary study consisting of 2200 predominantly healthy individuals from the Berlin metropolitan area of which 1946 participants had information about both baseline LDL-C levels and genotypes necessary to calculate the individual SNP score. All participants gave written informed consent and the study was approved by the Ethics Committee of the Charité-Universitätsmedizin Berlin (approval number EA2/029/09).

2.2 | Clinical diagnostics

The hypercholesterolemic patients were assessed by a physician of the Charité Lipid Clinic. All patients underwent comprehensive patient history including family history for lipid disorders and premature CVD and physical examination. Standard laboratory parameters including LDL-C, total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG) and lipoprotein (a) (Lp [a]) were determined. When native LDL-C was not available, we calculated it as described previously.²⁰⁻²⁸ We assembled the clinical information to compute the individual DLCN score, which is a point-based tool to simplify the clinical diagnostic of

FH patients.²⁹ The score classifies each individual and proposes an FH diagnosis to be *unlikely* (score < 3), *possible* (score 3-5), *probable* (score 6-8), or *definite* (score > 8). Discriminatory power to distinguish between FH-mutation carriers and subjects without a FH causing variation was evaluated by calculating the area under the receiver operating characteristics (ROC) curve. LDL-C serum levels are provided in mg/dL (1 mmol/L = 38.66 mg/dL).

2.3 | Mutation screening

DNA from 336 Ethylenediaminetetraacetic acid blood samples was extracted from whole-blood samples using the QiaCube Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol and molecular genetic analysis were based on next generation sequencing (NGS) technology. Further information on the mutation screening procedure is displayed in the supplements (supplementary methods).

We compared all detected sequence variants with the Human gene mutation database (HGMD),³⁰ Leiden open variation database,⁷ Clinvar variant database³¹ and their frequency in the gnomAD database (<https://gnomad.broadinstitute.org>). All sequence variants were evaluated with respect to their potential molecular function using the prediction tools PolyPhen2, Mutation Taster, and Human Splicing Finder (the latter for variants with a possible effect on splicing such as intronic variants).³²⁻³⁴ We rated the mutations following the American college of medical genetics and genomics (ACMG) standards and guidelines³⁵ and all novel variants were rated according to the most recent refinement of the ACMG guidelines by Nykamp et al.³⁶ No allele specific analysis was performed in putative compound heterozygous patients.

2.4 | SNP Genotyping

The six SNPs used to calculate the SNP score are listed in Table S1 and were originally published by Futema et al (2015). The genotypes for rs1367117, rs429358 and rs7412 were available for the hypercholesterolemic patients from the NGS-based data.

The SNPs rs629301, rs6511720, and rs6544713 (proxy for rs4299376, $r^2 = 1.0$ in European populations (CEU, ie, Utah Residents with Northern and Western European Ancestry) based on (<https://ldlink.nci.nih.gov/>)) were genotyped employing the ABI Prism SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) and following the manufacturer's protocol with a few modifications. All polymerase chain reactions (PCRs) were consistently performed using either the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) or ProFlex PCR System (Applied Biosystems) depending on sample input amount. To measure the SNaPshot-Reaction a 3730 DNA Analyzer XL instrument (Applied Biosystems, HITACHI) was used. We designed three primer triplets for each SNP consisting of two PCR-Primers and a SNaPshot-Primer specific to detect the SNP in question using the tool available at <https://www.eurofinsgenomics.eu/de>. The PCR was performed separately for each SNP due to the differences in

annealing temperatures of the PCR primers; the SNaPshot-Reaction was performed as a multiplex reaction. Before carrying out the genotyping with the patient samples, we optimized all reactions using control DNA. Comprehensive primer data are given in Table S2. Experimental PCR and SNaPshot conditions used for genotyping are available upon request.

Procedures for generating SNP data in the BASE-II dataset are available in the supplementary material methods section.

2.5 | Data analysis

For the statistical analysis we used the International Business Machines Corporation (IBM) statistical package for the Social Sciences version 24.0 [IBM Statistical Product and Service Solutions (SPSS) Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.]. Graphs were designed using GraphPad Prism 7, MS Excel 2016 and SPSS version 24.0. Sequencing analysis was completed using GeneMapper 5 (ThermoFisher Scientific) software. Cutoff for peak height was defined 100 for homozygous and 150 for heterozygous peaks. Statistical significance was defined as $P < .05$.

If one or two genotypes for the SNPs were missing, we assumed a calculated risk of zero for that particular SNP. If more than two genotypes were missing in a subject, this individual was excluded. The repetition of calculations using the most common genotype or excluding the all samples with missing genotypes from the analysis did not lead to significant differences (data not shown).

3 | RESULTS

3.1 | Patient characteristics

In 44 patients of the 336 patients analyzed we detected sequence variants in the canonical FH genes, which were rated as *variants of uncertain significance* (VUS) when applying the ACMG guidelines (Table S3 showing all VUS, that is, also patients carrying pathogenic and VUS rated variants). Since there is currently no certainty to rate their effect on the corresponding protein, we excluded them from all statistical analysis (information on excluded subjects is provided in Figure S1). This resulted in a cohort of 292 hypercholesterolemic subjects of whom 273 were unrelated based on the available clinical information. The repetition of the calculations excluding related patients did not lead to significant differences in the results (data not shown). The mean age of this cohort was 56.1 ± 14.3 years with 191 (65.4%) females and 101 (34.6%) males. The mean baseline LDL-C level was 278.4 ± 99.2 mg/dL. Patients with an identified FH causing mutation are henceforth referred as FH/M+ and patients without a pathogenic FH variant are referred as FH/M-.

Our control cohort from BASE-II consisted of 2171 healthy individuals with 1127 (51.9%) females and 1044 (48.1%) males. The mean LDL-C level was 122.72 ± 36.67 mg/dL was available in 2116 cases with the median age of 67.2 years.

Variable	FH-cohort	BASE-II
	N (%)	N (%)
Female	191(65.4)	1127(51.9)
Male	101(34.6)	1044(48.1)
	Mean (+ - SD)	Mean (+ - SD)
Age (years) ^a	56.1(14.3)	59.6(17.2)
SNP-Score	0.61364(0.181669)	0.57797(0.247789)
Baseline LDL-C (mg/dl)	278.4(99.2)	122.7(36.7)
DLCN-Score	5.2(2.9)	/
Maximum TC (mg/dl) ^b	211.3(71.4)	/
LDL-C (mg/dl) ^b	140.7(68.6)	/

^aAt the time of study recruitment.

^bOn maximum therapy.

Abbreviations: DLCN, Dutch lipid clinic network; FH, familial hypercholesterolemia; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol.

TABLE 1 Baseline characteristics of the 292 FH patients and 2171 BASE-II controls

The baseline characteristics for both cohorts are shown in Table 1/S4.

3.2 | Mutation spectrum

One hundred and seventeen of all 336 patients (34.8%, 19 related) were found to carry an FH causing mutation. Overall, we identified 73 different sequence variants including the eleven novel variants all of which were rated *likely pathogenic* or *pathogenic* by ACMG Standard Guidelines (Table S5). In 44 patients, we discovered mutations that were rated VUS according to ACMG criteria (Table S3). As expected, most of the mutations were located in the *LDLR* gene (107 mutations, 84.9%). Nineteen (15.1%) of the disease causing variants were found in the *APOB* gene, and no disease causing variants were found in the *PCSK9* gene or the *LDLRAP1* gene. The highest proportion of variants (N = 56, 44.4%) were of the missense type with the most numerous sequence alteration being c.798 T > A (p.Asp266Glu) in the *LDLR* gene. The most frequent mutation, c.10580G > A (p.Arg3527Gln) was located in the *APOB* gene (18 cases, 14.3%) cases (Figure 1A). We identified 10 patients with seven different large deletions/duplications which amount to 8% of all detected variants and are shown in Table S5. The distribution of the variants in the *LDLR* gene and their relative location is presented in Figure S2.

We identified four putatively compound heterozygous, two double heterozygous and one both double and possibly compound heterozygous case in our study. With 13 out of 16 alterations, the *LDLR* mutations were the most prominent. The mean baseline LDL-C level in the double heterozygous patients was 300.53 ± 104.73 mg/dL and substantially (and significantly, see below) lower than in the compound heterozygous subjects (408.5 ± 233.7 mg/dL), which resulted in less distinct phenotypes for the double heterozygous group displayed by lower mean DLCN scores (6.3 ± 2.88 double heterozygous; 8.0 ± 6.27 compound heterozygous). Interestingly, we found four

apparently unrelated cases of compound heterozygous patients with identical mutations. In one case with an additional mutation c.10580G > A (p.Arg3527Gln) in the *APOB* gene. Also, of interest was the fact that the mean of baseline LDL-C for these double and/or compound heterozygote patients was only second highest with 362.23 ± 185.19 mg/dL after subjects with single mutations that led to a truncated protein (366.85 ± 106.87 mg/dL). That could be explained by the fact that there were only seven patients with such a condition. The variants c.1690A > C and c.2393_2401delTCCT CGTCT are present in four patients suggesting a possible linkage. However, no specific analysis such as a segregation analysis or other testing for allelic independence was conducted to explore these possibilities. In one younger patient carrying these two variants putatively in a compound heterozygous state we observed a very mild phenotype with baseline LDL-C levels around 150 mg/dL. Detailed characteristics in Table S6.

3.3 | Novel mutations

In the current study we found 11 sequence variants that were previously not described as FH causing mutations in 14 patients. All of these were located within the *LDLR* gene (Figure 1B, Table S7), and all were classified to be disease causing by the used in silico tools, except loss of function variants like nonsense and frameshift mutations which were directly considered as pathogenic variants according to the most recent refinement of ACMG guidelines.³⁵ Two of the novel disease causing variants, c.1988-50_2007del70bp (p.Gly663Aspfs*47) and c.940 + 1_940 + 4delGTGA (p.), were identified within intronic regions of the *LDLR* gene. Six variants were rated to be *likely pathogenic* and five to be *pathogenic*. All of them were absent from the gnomAD and HGMD databases. The mean baseline LDL-C level for the patients carrying the novel variants was 357.41 ± 157.88 mg/dL, that is, similar to levels in patients with established FH causing mutations.

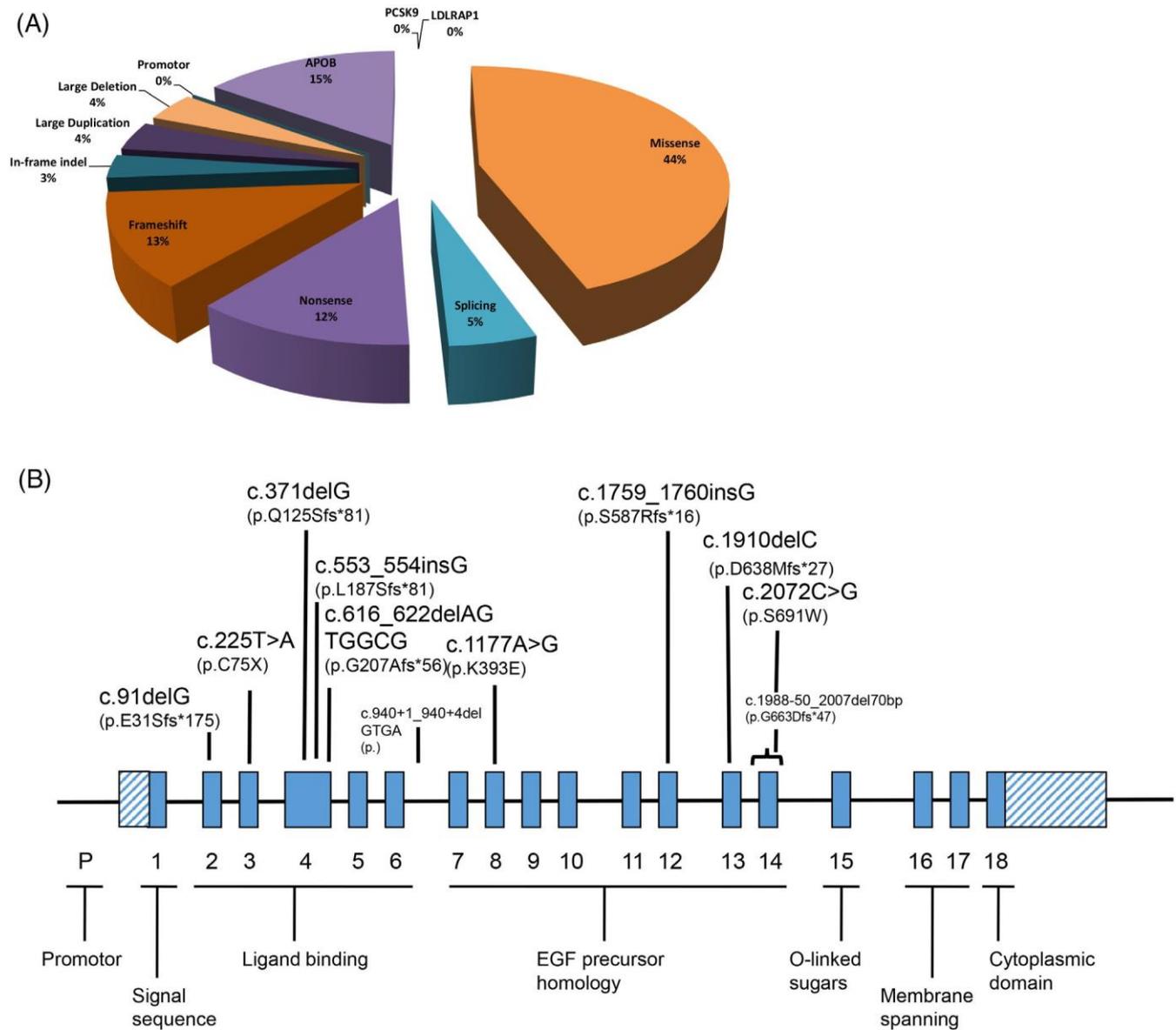


FIGURE 1 Mutation spectrum and novel sequence variants (A) Distribution of the different mutation types among the 117 FH patients. Variants c.13480_13482delCAGhet (p.Gln2294del) and c.10580G > A (p.Arg3527Gln) are located in the *APOB* gene. No pathogenic mutations were found in *PCSK9* and *LDLRAP1* gene. (B) Schematic presentation of novel sequence variants according to their relative positions in the *LDLR* gene. Blue boxes show the exonic regions and below the gene, the different functional protein domains are indicated. LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.4 | Clinical vs molecular FH diagnosis

We were able to compute the DLCN score in 226 of 292 hypercholesterolemic patients where either a FH causing mutation was found or no mutation was identified. In patients with a DLCN score below 3 or between 3 to 5, (corresponding to an *unlikely* or *possible* FH diagnosis), 81.8% and 67.6%, respectively belonged to the group where no disease causing mutation was found. As expected, the proportion of mutation negative patients was considerably lower in the groups with higher DLCN score, with 39.1% and 17.9% mutation negatives in patients with a DLCN score between 6 and 8 and > 8, respectively (Figure 2A). When calculating the ROC curve for both the DLCN score

AUC = 0.76 (95% CI = 0.69-0.82, $P < .001$) and baseline LDL-C AUC = 0.77 (95% CI = 0.71-0.83, $P < .001$) there was only a minor difference in discriminatory power. The corresponding ROC curves are shown in Figure S3. This demonstrates that both the DLCN score and the baseline LDL-C discriminate well between FH/M⁻ and FH/M⁺ patients. As expected when analyzing the discriminatory power of baseline LDL-C to distinguish between BASE-II controls and FH/M⁺ or FH/M⁻ patients the ROC curve was almost ideal with an AUC = 0.99 (95% CI = 0.98-0.99, $P < .001$) and AUC = 0.95 (95% CI = 0.93-0.97, $P < .001$), respectively. The prevalence of CVD in mutation positive patients was 78%. With respect to risk and positive family history of CVD, which is mainly portrayed by the DLCN score there is a

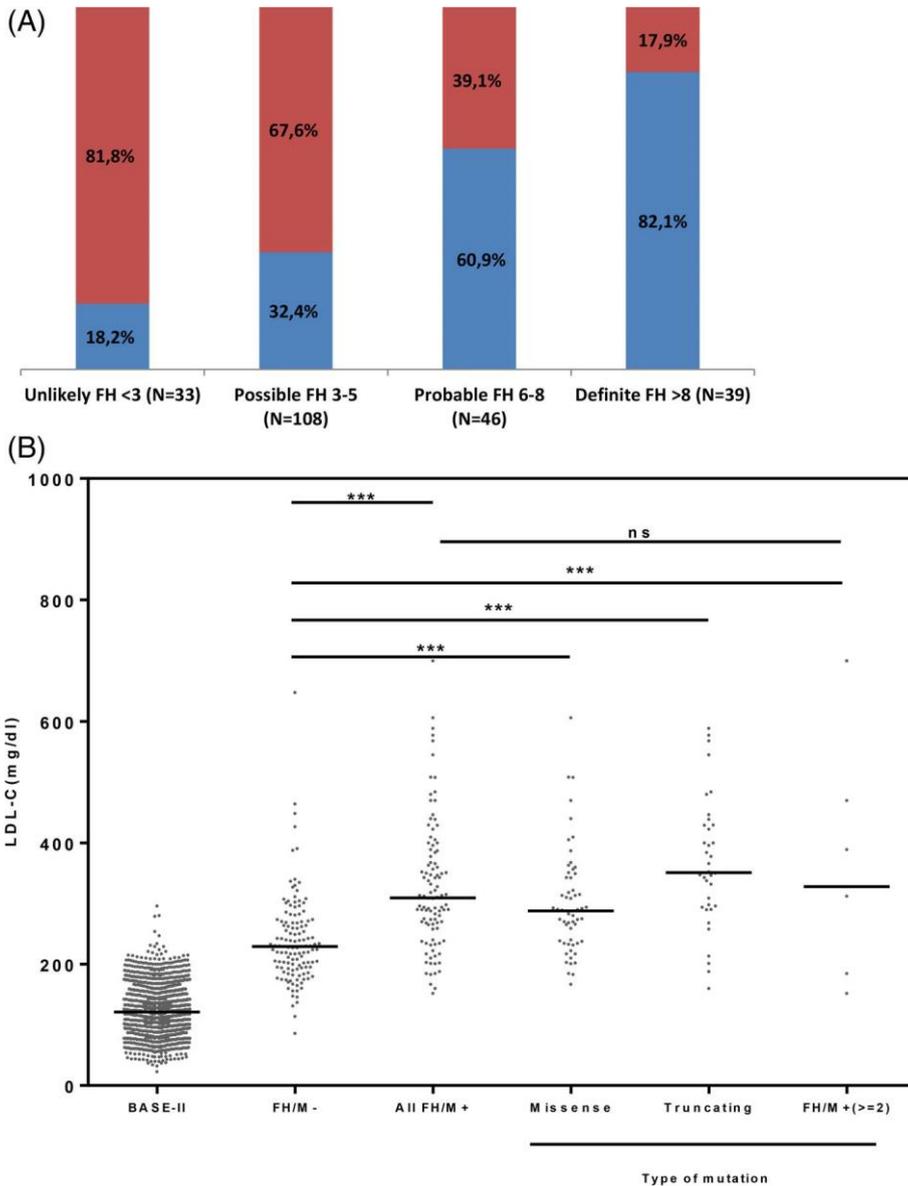


FIGURE 2 DLCN score and mutation status (A) Proportions of identified disease causing sequence variants according to DLCN score. The DLCN score was available for 226 out of 292 hypercholesterolemic patients. The graph displays the proportion of FH mutation negative patients (red column) compared to the proportion of patients with an identified FH causing mutation (blue column) in relation to the different DLCN score intervals. (B) LDL-C serum levels according to mutation status. LDL-C concentrations were compared between the BASE-II cohort (used here as controls) and different subgroups of the cohort of hypercholesterolemic patients: patients with no identified mutation (FH/M-), all different types of mutations (FH/M+), with missense variants, truncating mutations (including nonsense, and frameshift) and all patients who are compound and/or double heterozygous (or heterozygotes) with two or more sequence variations either in the same or a different gene (FH/M+ \geq 2). Medians are indicated by black lines. Statistical analysis was performed by one way ANOVA and post hoc Tukey's test: *** $P < .001$, ns = not significant. DLCN, Dutch lipid clinic network; FH, familial hypercholesterolemia; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

significant difference between mutation positive and mutation negative patients (data not shown).

In addition, we compared the baseline LDL-C of our FH/M- patients with FH/M+ patients and the different types of mutations using the ANOVA and post hoc Tukey test to identify significant differences in mean LDL-C levels. This revealed a significant difference ($P < .001$) between FH/M- patients and all other subgroups. Furthermore, there was no significant difference ($P = 0.461$) between all mutation positive patients and the double and/or compound heterozygous group (Figure 2B).

Additionally, we compared the baseline LDL-C of FH/M- patients and subjects carrying variants with the different ACMG classifications. As expected, Tukey post hoc analysis revealed a significant difference ($P < .001$) between BASE-II controls and all other groups. The test revealed a significant difference ($P < .001$) between the FH/M- subgroup and group 5 which represented the patients with ACMG rated *pathogenic / likely pathogenic*

mutations. Between FH/M- patients and the subjects with VUS (III) there was no significant difference ($P = .981$) (Figure S4). However, three patients carrying VUS (III) had a baseline LDL-C > 400 mg/dL (Table S3).

3.5 | Six-SNP LDL-C polygenic score

The LDL-C polygenic score was calculated from 336 hypercholesterolemic patients and from 1985 individuals of the BASE-II cohort. When comparing the mean SNP score of BASE-II controls with FH/M+ and FH/M- subjects, the highest score, $0.639(\pm 0.164)$, was found in the FH/M- patients. Interestingly, the LDL-C polygenic score from the FH/M+ subjects, $0.573(\pm 0.2)$, did not differ significantly from the "healthy" BASE-II controls $0.578(\pm 0.248)$, $t(137.7) = -0.282$, $P = 0.778$. There was a statistically significant difference between the scores of the BASE-II group and the FH/M- group, with a mean

difference of 0.061 (95%-CI [0.035, 0.088]) lower for the BASE-II controls, $t(250.177) = 4.520$, $P < .001$. A scatterplot of these results can be seen in Figure 3.

Additionally, we assigned the BASE-II controls and both, FH/M- and FH/M+ patients, into three groups excluding individuals from BASE-II with a baseline LDL-C > 155 mg/dL and from the cohort of patients with baseline LDL-C < 155 mg/dL (the cutoff for the DLCN score). This allowed us to evaluate how well the score discriminates between "affected" (>155 mg/dL) and "nonaffected" (<155 mg/dL) individuals. The Area under the receiver operating characteristic statistical method indicated that the SNP score does not discriminate well between BASE-II controls and FH/M+ subjects (AUC = 0.50 [95% CI = 0.45-0.54, $P = 0.8971$]), BASE-II controls and FH/M- subjects (AUC = 0.60 [95% CI = 0.56-0.64, $P < .001$]) and between FH/M+ and FH/M- subjects (AUC = 0.62 [95% CI = 0.55-0.69, $P < .001$]). The corresponding ROC curves are shown in Figure S5. When computing the Youden index to the ROC curve of BASE-II controls and FH/M-patients, we were able to determine a cutoff at which the LDL-C SNP score discriminates best between the two groups. This allowed us to retrieve the basic quality criteria in a diagnostic test. After adjusting the positive predictive value for the disease prevalence of FH using Bayesian statistics, it was 0.57%. According to this finding the SNP score would allow 0.701 (less than one patient) correct positive diagnoses among the 123 mutation negative subjects with baseline LDL-C above 155 mg/dL. A "correct diagnosis" in this case signifies that these individuals were correctly assigned to the group in which the (elevated and likely disease causing baseline) LDL-C levels can be explained by a polygenic etiology derived from the SNP score. Information is shown in Table S8.

To analyze the association of the SNP score with baseline LDL-C in the control group and in our mutation negative (FH/M-) patients

we computed a linear regression model. Despite being statistically significant, the score only explained a small fraction of the variance in baseline LDL-C ($\beta = 34.769$, $P < .001$, $R^2 = .031$ [$R_{adj}^2 = .030$]). In a next analysis step, we considered sex and age along with the SNP score as independent variables in the regression model. This model provided a better prediction of baseline LDL-C ($F[3.20] = 76.26$, $P < .001$, $R^2 = .099$ [$R_{adj}^2 = .098$]). Two of the three variables except sex ($P = .542$) added statistically significant to the model ($P < .001$). Interestingly, this revealed that the most robust association of baseline LDL-C was observed with age followed by the SNP score and sex (Table 2). These findings indicate that when combining the SNP score with the covariate age up to 10% of the variance of LDL-C levels can be explained. No significant correlation was detected between the different groups of the DLCN score and the SNP score (data not shown).

4 | DISCUSSION

In this study, we analyzed the clinical FH phenotype and the mutational status of 336 patients from Berlin, Germany. In addition, we genotyped six SNPs and calculated a previously proposed six-SNP polygenic score.¹⁸ The applied BASE-II dataset comprising $N = 1985$ individuals, served as a control group in the current study. To the best of our knowledge, this is the first report systematically evaluating the polygenic etiology in German hypercholesterolemic patients.

We found 73 different FH causing sequence variants including 11 novel mutations in 117 patients. Most of the identified variants were located in the *LDLR* gene and the majority of these were of the missense type. No disease causing variants were identified in the genes *PCSK9* and *LDLRAP1*. Similar to previous research³⁷ we found disease causing variants in the *LDLR* gene to be clustered in exons

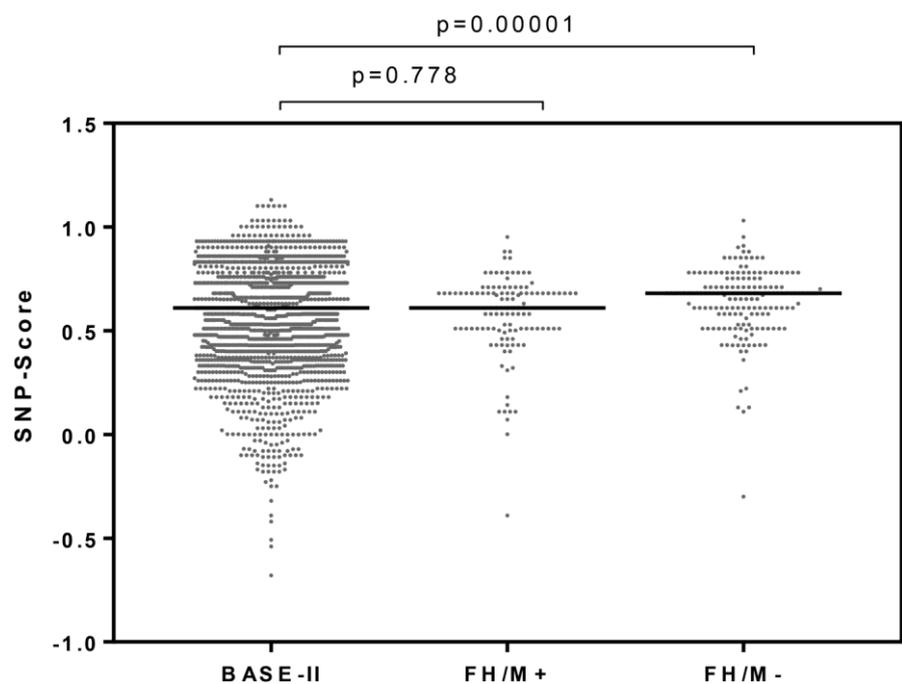


FIGURE 3 Six-SNP polygenic score in BASE-II controls and subgroups of FH patients. The six-SNP polygenic score was available for 1985 individuals in BASE-II controls, 117 patients in the FH/M+ (i.e., individuals carrying an FH causing mutation) group and 175 patients in the FH/M- (no FH causing mutation) group. Median LDL-C values are indicated by black lines. Unpaired t test revealed significant differences between BASE-II and FH/M- ($P < .001$). No statistically significant difference was found between BASE-II and FH/M+. FH, familial hypercholesterolemia; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol

Covariates	β	Standardized β	SE	95% CI	P-Value
SNP score	34.529	.174	4.140	26.410-42.649	<.001
Sex	1.234	.013	2.024	-2.736-5.204	.542
Age	.767	.263	.061	.647-.886	<.001
$R^2 = .099$, adjusted $R^2 = .098$					

Note: Dependent variable: Serum-LDL-C (mg/dl).

Abbreviations: LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; SNP, single nucleotide polymorphisms.

TABLE 2 Results of linear regression analysis of LDL-C values on the six-SNP polygenic score adjusted for sex and age (years)

4 and 5, a region also containing the most frequent *LDLR* variant among German patients, that is, c.798 T > A (p.Asp266Glu). The most frequent variant was *APOB* c.10580G > A (p.Arg3527Gln) which corresponds to previous findings in German patients.⁸ Our study further substantiates the mutation spectrum underlying FH in a dataset from Germany. Surprisingly, the mean LDL-C of the six patients carrying two or more disease causing variants was not higher when compared to patients with only one sequence variant. This is likely due to the combination of the variants detected and their putative impact on LDL receptor function, since if both encode a protein with residual activity instead of a null mutation, then LDL-C elevations can be expected to be less severe, as has been reported before.³⁸ In agreement with a consensus study from the European Atherosclerosis Society, mean LDL-C levels and corresponding clinical phenotypes according to the DLCN score were lower in heterozygous patients with variants in two different genes than in compound heterozygous patients. This observation, which could be explained by the notion that carrying more than one alteration in the same protein is more likely to decrease its function more drastically.³⁹ Especially in the putatively compound heterozygous patients further investigation is needed to test for allelic independency. A possible allelic linkage in these patients could explain the lack of difference in mean LDL-C values between all mutation positive patients and patients carrying two variants in Figure 2B.

As expected, the baseline LDL-C was significantly higher in patients with all types of detected variants, when compared to mutation negative patients. When comparing the LDL-C levels of the mutation negative patients with those of patients with alterations rated as VUS by ACMG guidelines, there was no significant difference suggesting that most of these variants are likely to be benign. It is a general problem that a significant proportion of the variants detected in standard molecular diagnostic procedures cannot be comprehensively interpreted due to a lack of information on their functional impact. This has some serious diagnostic implications since less than 10% of the variants detected in the three known FH causing genes have been validated as *pathogenic* based on *in vitro* or other functional assays.⁴⁰ A strategy to improve interpretability of noncoding variants was recently proposed by Kircher et al,⁴¹ who used a combination of saturation mutagenesis and reporter assays to conduct functional measurements of over 30 000 single-nucleotide substitutions and deletions in the 20 disease-associated gene promoters and enhancers, including the *LDLR* gene. It would be desirable to have a similar catalog containing functional consequences of variants in the coding

region of the FH genes, demonstrating for example, the impact of the large proportion of unclassified missense variants in the *LDLR* gene. Using the DLCN score we categorized our patients based on their clinical phenotypes and calculated its ability to discriminate between subjects being mutation negative and mutation positive in the three major FH genes in ROC curves. We detected a variant causative for the disease in over 70% of the patients with a diagnosis rated as *probable* and *definite* according to DLCN criteria which is lower than reported by Scicali et al with over 90.5%. This might be explained by the higher prevalence of the disease (FH/M+) in their study with 46.4% compared to 40.0% in our cohort.⁴² The DLCN score discriminated between mutation positive and mutation negative patients with an AUC of 0.76 (95% CI = 0.69-0.82, $P < .001$) and the baseline LDL-C with an AUC of 0.77 (95% CI = 0.71-0.83 $P < .001$). In other words, using baseline LDL-C is just as good in discriminating mutation positive and mutation negative patients, as the score calculated based on the DLNC criteria in our dataset. This is in agreement with our earlier findings from Grenkowitz et al (2016), and results from other studies.^{8,43,44} The discriminatory power of LDL-C, however, is lower in older patients (>60 years), with the DLCN criteria being useful for the clinical diagnosis.⁴⁵

In our study, we were unable to detect disease causing variants in 65.2% of the patients clinically suspected to have FH, a proportion which is in the range found in a recently published review article.⁴⁶ Futema and colleagues proposed a six-SNP polygenic score to recognize patients in which a polygenic FH etiology is likely.¹⁸ We followed this strategy and overall observed similar results: the polygenic score was highest in patients without a detected disease causing variant (=mutation negative). In contrast to Futema et al we found no difference in the six-SNP polygenic score between patients with a disease causing variant detected (=mutation positive) and our control group. Another difference in relation to the original description of the score was that we observed on average lower scores in our cohorts, which limits a direct comparison to the results reported by Futema and colleagues. This could be explained by the fact that we assigned a score of *zero* for a particular SNP, if we were unable to evaluate one or two of the genotypes in a particular patient, unlike Futema et al who in some cases assigned the SNP genotypes that are most common, if one was missing.

In order to further evaluate the six-SNP polygenic score we tested its power to discriminate between "nonaffected" individuals from our control group and mutation negative subjects from our patient cohort. These analyses revealed only a modest discrimination

power with an AUC = 0.60 (95% CI = 0.56-0.64, $P < .001$). This result was supported by both the very low positive predictive value of the score calculated for our mutation negative patients and our control group (0.57%) and our linear regression models showing that the overall variance explained by the baseline LDL-C levels is small (~3%) and that age is a better predictor of LDL-C levels than the six-SNP polygenic score. In our view it does not come as a surprise that patients with a clinical FH phenotype but without evidence for disease causing variants in one of the known FH genes have a higher SNP score (=frequency) of LDL-C raising variants than controls, since most of them have become noticed because of their high LDL-C. Because the six-SNP polygenic score explained only 3% of the variance in LDL-C, we do not think, however, that a high SNP score is the primary (polygenic) cause of the disease in these patients. A higher SNP score rather has increased the chance to be diagnosed with clinical FH in patients, which might have a disease causing variant in an unknown gene, or with a so far unknown epigenetic modification. Less severity of variants in these unknown disease genes or modifications, when compared to alterations of the known FH genes, might then explain the intermediate LDL-C levels in these patients.

Interestingly, other groups have recently reported polygenic risk scores predictive for clinical outcomes in the context of FH: Trinder et al reported that patients with a monogenic cause for FH and a high polygenic risk score based on 28 LDL-C associated SNPs (four of which were also included in our study) had a significantly increased risk for premature CVD. An increased CVD risk, however, was not detected for the fraction of mutation negative patients in that same study.⁴⁷ Paquette et al reported similar results using a genetic risk score comprised of 192 SNPs associated with coronary artery disease (CAD) which were found to be strongly associated with CVD events in 725 FH mutation positive patients.⁴⁸ In clinical practice a score like this could be used for screening for “general CVD risk” and perhaps as additional information alongside the established measures, such as the molecular diagnosis and the clinical phenotype, for high risk patients with a known monogenetic cause and superimposed polygenic risk.

Other scores based on LDL-C associated SNPs have been proposed by Wang et al (2016), Lamiquiz-Moneo et al (2017),^{49,50} Considering their results and the reviews of both Hooper et al (2018) and Iacocca & Hegele et al (2017)^{51,52} leads to analogous conclusions. There was no strong association found between LDL-C levels and a SNP score in other studies, for example, Lamiquiz-Moneo et al (2017) observed that only 3.1% of the LDL-C variance could be explained in their examined cohort, which supports our findings.^{49,50} Finally, Wang et al (2016) and Iacocca & Hegele et al (2017) proposed that the aggregation of SNPs will cluster within families, a hypothesis we could not assess owing to the lack of sufficient family-based data in our datasets.

In summary, we did not find evidence that the polygenic risk score proposed by Futema and colleagues represents a reliable tool for FH in clinical practice. However, further research should be conducted to evaluate the potential of polygenic risk score(s) in clinical risk prediction of CVD. Therefore, we would argue that

patients with a clinical FH phenotype lacking evidence for disease causing variants in the canonical FH genes should not be referred to as *hypercholesterolemic with a polygenic cause*. Instead, these patients should be the subject of future research to reveal the real underlying cause of the disease, be it genetic, epigenetic or of a different in nature.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge Gabriele Hildebrand and Susanne Rothe for their technical advice on the conduction of laboratory assays.

CONFLICT OF INTEREST

Nothing to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Lorenz Rieck, Ursula Kassner, and Ilja Demuth conceived the study, interpreted and discussed data. Lorenz Rieck generated the genotype data for the patient cohort, analyzed the data and wrote the first manuscript draft. Frieda Bardey contributed to the statistical analysis and Thomas Grenkowitz helped conceptualizing the study design. Lars Bertram, Johannes Helmuth, Claudia Mischung, Joachim Spranger, Elisabeth Steinhagen-Thiessen, Thomas Bobbert, Ursula Kassner, and Ilja Demuth provided data. Ursula Kassner, and Ilja Demuth supervised the study. All authors reviewed the manuscript.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/cge.13826>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Due to concerns for participant privacy, BASE-II data are available only upon request. External scientists may apply to the Steering Committee of BASE-II for data access. Please refer to the BASE-II website (<https://www.base2.mpg.de/en/project-information/datadocumentation>) for additional information. Please contact Ludmila Müller, scientific coordinator, at lmuller@mpib-berlin.mpg.de.

ORCID

Lorenz Rieck  <https://orcid.org/0000-0003-3493-2423>

REFERENCES

1. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European atherosclerosis society consensus panel. *Eur Heart J*. 2017;38:2459-2472.
2. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. 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;34:3478-3490a.
3. Kassner U, Wühle-Demuth M, Missala I, et al. Clinical utility gene card for: hyperlipoproteinemia, TYPE II. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(7).

4. Mbikay M, Mayne J, Chrétien M. Proprotein convertases subtilisin/kexin type 9, an enzyme turned escort protein: hepatic and extra hepatic functions. *J Diabetes*. 2013;5:391-405.
5. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4:214-225.
6. Fellin R, Arca M, Zuliani G, Calandra S, Bertolini S. The history of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene*. 2015;555:23-32.
7. Leigh S, Futema M, Whittall R, et al. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet*. 2017;54:217-223.
8. Grenkowitz T, Kassner U, Wühle-Demuth M, et al. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2016;253:88-93.
9. Vuorio A, Watts GF, Schneider WJ, et al. Familial hypercholesterolemia and elevated lipoprotein(a): double heritable risk and new therapeutic opportunities. *J Intern Med*. 2020;287(1):2-18.
10. Graham CA, McIlhatton BP, Kirk CW, et al. Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate. *Atherosclerosis*. 2005;182:331-340.
11. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet*. 2013;381:1293-1301.
12. Umans-Eckenhausen MA, Defesche JC, Sijbrands EJ, et al. Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in The Netherlands. *Lancet*. 2001;357:165-168.
13. Marduel M, Ouguerram K, Serre V, et al. Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum Mutat*. 2013;34:83-87.
14. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2014;115:552-555.
15. Danyel M, Ott CE, Grenkowitz T, et al. Evaluation of the role of STAP1 in familial hypercholesterolemia. *Sci Rep*. 2019;9:11995.
16. Loaiza N, Hartgers ML, Reeskamp LF, et al. Taking one step back in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(4):ATVBAHA119313470.
17. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466:707-713.
18. Futema M, Shah S, Cooper JA, et al. 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;61:231-238.
19. Bertram L, Böckenhoff A, Demuth I, et al. Cohort profile: the Berlin aging study II (BASE-II). *Int J Epidemiol*. 2014;43:703-712.
20. Adams SP, Tsang M, Wright JM. Lipid lowering efficacy of atorvastatin. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;12:CD008226.
21. Ara R, Tumur I, Pandor A, et al. Ezetimibe for the treatment of hypercholesterolaemia: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2008;12:1-212.
22. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Raya JL, et al. Efficacy, safety and effect on biomarkers related to cholesterol and lipoprotein metabolism of rosuvastatin 10 or 20 mg plus ezetimibe 10 mg vs. simvastatin 40 or 80 mg plus ezetimibe 10 mg in high-risk patients: results of the GRAVITY randomized study. *Atherosclerosis*. 2014;232:86-93.
23. Ballantyne CM, Houry J, Notarbartolo A, et al. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation*. 2003;107:2409-2415.
24. Ballantyne CM, Pazzucconi F, Pintó X, et al. Efficacy and tolerability of fluvastatin extended-release delivery system: a pooled analysis. *Clin Ther*. 2001;23:177-192.
25. Ballantyne CM, Weiss R, Moccetti T, et al. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study). *Am J Cardiol*. 2007;99:673-680.
26. Foody JM, Toth PP, Tomassini JE, et al. Changes in LDL-C levels and goal attainment associated with addition of ezetimibe to simvastatin, atorvastatin, or rosuvastatin compared with titrating statin monotherapy. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:719-727.
27. Jones P, Kafonek S, Laurora I, et al. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol*. 1998;81:582-587.
28. Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2003;326:1423-1420.
29. Organization, WH. Familial hypercholesterolemia—report of a second WHO consultation, Geneva: World Health Organization, 1999.
30. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The human gene mutation database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*. 2017;136:665-677.
31. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D1062-D1067.
32. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248-249.
33. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11:361-362.
34. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:e67.
35. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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;17:405-424.
36. Nykamp K, Anderson M, Powers M, et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med*. 2017;19:1105-1117.
37. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*. 2004;160:407-420.
38. Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, et al. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the international atherosclerosis society severe familial hypercholesterolemia panel. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4:850-861.
39. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the consensus panel on familial Hypercholesterolaemia of the European atherosclerosis society. *Eur Heart J*. 2014;35:2146-2157.
40. Chora JR, Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet Med*. 2018;20:591-598.
41. Kircher M, Xiong C, Martin B, et al. Saturation mutagenesis of twenty disease-associated regulatory elements at single base-pair resolution. *Nat Commun*. 2019;10:3583.

42. Scicali R, Di Pino A, Platania R, et al. Detecting familial hypercholesterolemia by serum lipid profile screening in a hospital setting: clinical, genetic and atherosclerotic burden profile. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018;28(1):35-43.
43. Silva PRS, Jannes CE, Oliveira TGM, et al. Evaluation of clinical and laboratory parameters used in the identification of index cases for genetic screening of familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atherosclerosis.* 2017;263:257-262.
44. Garg A, Garg V, Hegele RA, Lewis GF. Practical definitions of severe versus familial hypercholesterolaemia and hypertriglyceridaemia for adult clinical practice. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7:880-886.
45. Wald DS, Bestwick JP, Wald NJ. Child-parent screening for familial hypercholesterolaemia: screening strategy based on a meta-analysis. *BMJ.* 2007;335:599.
46. Sharifi M, Futema M, Nair D, Humphries SE. Polygenic hypercholesterolemia and cardiovascular disease risk. *Curr Cardiol Rep.* 2019; 21:43.
47. Trinder M, Li X, DeCastro ML, et al. Risk of premature atherosclerotic disease in patients with monogenic versus polygenic familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74:512-522.
48. Paquette M, Chong M, Thériault S, Dufour R, Paré G, Baass A. Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2017;11: 725-732. e725.
49. Wang J, Dron JS, Ban MR, et al. Polygenic versus monogenic causes of hypercholesterolemia ascertained clinically. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:2439-2445.
50. Lamiquiz-Moneo I, Pérez-Ruiz MR, Jarauta E, et al. Single nucleotide variants associated with polygenic hypercholesterolemia in families diagnosed clinically with familial hypercholesterolemia. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed.)* 2018;71:351-356.
51. Hooper AJ, Burnett JR, Bell DA, Watts GF. The present and the future of genetic testing in familial hypercholesterolemia: opportunities and caveats. *Curr Atheroscler Rep.* 2018;20:31.
52. Iacocca MA, Hegele RA. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17:641-651.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Rieck L, Bardey F, Grenkowitz T, et al. Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 2020;98: 457-467. <https://doi.org/10.1111/cge.13826>

7. Lebenslauf

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

8. Komplette Publikationsliste

Publikationen: Rieck, L., F. Bardey, T. Grenkowitz, L. Bertram, J. Helmuth, C. Mischung, J. Spranger, E. Steinhagen-Thiessen, T. Bobbert, U. Kassner, and I. Demuth, *Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia*. Clin Genet, 2020. **98**(5): p. 457-467.

9. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinen Betreuer*innen Dr. med. Ursula Kassner und Prof. Ilja Demuth für die konstruktive und liebenswerte Betreuung bedanken. Ohne sie wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.