

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin,
Arbeitsbereich Lipidstoffwechsel und Ernährungswissenschaft,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klinische Charakterisierung und Mutationsspektrum deutscher Patienten
mit familiärer Hypercholesterinämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Grenkowitz
aus Berlin

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt in Deutsch	3
2	Abstrakt in Englisch	5
3	Eidesstattliche Versicherung	7
4	Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	8
5	Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)	9
6	Druckexemplar der ausgewählten Publikation	10
7	Lebenslauf	16
8	Publikationsliste	18
8.1	Journal Publikationen	18
8.2	Poster Publikationen.....	18
9	Danksagung	20

1 Abstrakt in Deutsch

Hintergrund und Ziele

Die familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine der häufigsten monogenetischen Erkrankungen (Prävalenz 1:200-300). Der Erbgang ist autosomal-dominant. Die FH ist durch erhöhte „low-density lipoprotein cholesterol“ (LDL-C) Plasmaspiegel (LDL-C bei Heterozygoten 200-400 mg/dl, bei Homozygoten > 500 mg/dl) und ein deutlich erhöhtes Risiko frühzeitig kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden charakterisiert. Gegenwärtig sind Mutationen in drei bekannten Genen mit der FH assoziiert: LDL-Rezeptor-Gen (*LDLR*), Apolipoprotein B-Gen (*APOB*), sowie Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9-Gen (*PCSK9*). In der vorliegenden Arbeit werden die Häufigkeit und das Spektrum der FH verursachenden Mutationen in Deutschland beschrieben.

Methoden

Es wurden 206 Patienten mit bekannter Hypercholesterinämie, von denen 192 nicht miteinander verwandt waren, bezüglich Mutationen in den kodierenden Regionen der Gene *LDLR*, *PCSK9* und *APOB* untersucht. Im Bereich des *APOB*-Gens wurde allein nach der häufigsten, krankheitsverursachenden Mutation, c.10580G>A (p.Arg.3527Gln) gesucht.

Des Weiteren wurden die Patienten nach den „Dutch Lipid Clinic Network Criteria“ (DLCNC) bezüglich einer FH klinisch bewertet, um einen Vergleich zwischen identifizierten Mutationen und beobachteten Phänotypen zu ermöglichen.

Eingeschlossen der Ergebnisse von vorausgegangenen Studien an deutschen FH-Patienten, war es möglich insgesamt Daten von 479 Individuen zu analysieren.

Ergebnisse

Es wurden 98 FH verursachende Varianten in 92 Patienten (neun in verwandten Patienten und sechs Patienten mit je zwei Varianten auf wahrscheinlich zwei betroffenen Allelen) detektiert, von denen 90 im *LDLR*-Gen und acht im *APOB*-Gen (c.10580G>A) identifiziert wurden. Es wurde keine Mutation im *PCSK9*-Gen gefunden.

Während 48 von den *LDLR*-Mutationen bereits zuvor als krankheitsverursachend beschrieben waren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neun neue *LDLR*-Veränderungen entdeckt, welche als „pathogen“ oder „wahrscheinlich pathogen“,

basierend auf dem vorhergesagten Effekt auf das korrespondierende Protein, eingeschätzt wurden.

Die Verteilung der verschiedenen Mutationstypen im *LDLR*-Gen und deren Lokalisation im Gen war in der aktuellen Untersuchung und der kombinierten Analyse mit 479 Patienten (aktuelle Untersuchung und Fälle aus der Literatur) vergleichbar, ebenso wie in anderen Studien zum *LDLR*-Mutationsspektrum. Rund die Hälfte der gefundenen Varianten ist vom „Missense“-Typ, zusätzlich konnte eine Häufung von Mutationen in den Exonen vier, fünf und neun beobachtet werden.

2 Abstrakt in Englisch

Background and aims

Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common monogenetic diseases (prevalence: 1:200-300). The mode of inheritance is autosomal-dominant. FH is characterized by extremely elevated plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C): up to 200-400 mg/dl in heterozygous and more than 500 mg/dl in homozygous individuals. Patients also have a dramatically increased risk to develop a premature cardiovascular disease as a result of severe atherosclerosis.

Mutations in three genes have been associated with FH: LDL receptor gene (*LDLR*), apolipoprotein B gene (*APOB*) and proprotein convertase subtilisin/kexin 9 gene (*PCSK9*).

The frequency and the spectrum of FH causing mutations in Germany was investigated in the current study.

Methods

206 patients with known hypercholesterolemia, 192 were evidently not related, were analyzed for variants in the coding regions of *LDLR*, *PCSK9* and *APOB* (c.10580G>A, p.Arg.3527Aln). To compare the clinical phenotype and the identified variants, patients were classified using Dutch Lipid Clinic Network Criteria (DLCNC).

We combined data from the current study and from previous investigations on German FH patients to analyze data from 479 individuals.

Results

We detected 98 FH causing mutations in 92 individuals (six patients with two variants and probable two affected alleles, as well as nine in related patients). 90 variants were located in the *LDLR* gene and eight in the *APOB* gene (c.10580G>A). We found no mutation in the *PCSK9* gene. 48 *LDLR* mutations were described as disease causing before. In the current study we identified nine new *LDLR* variants, which were rated as “pathogenic” or “likely pathogenic” based on their predicted effect on the corresponding protein. In comparison of the current study and the combined analysis of 479 individuals the distribution of the different types of *LDLR* mutations and their localization was very

similar, just as in other studies from the literature. Nearly a half of the variants identified were missense mutations and mutations were clustered in exons 4, 5 and 9.

3 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Thomas Grenkowitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Klinische Charakterisierung und Mutationsspektrum deutscher Patienten 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 Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

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

Berlin, den 01.12.2016

Unterschrift

4 Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Grenkowitz T., Kassner U., Wühle-Demuth M., Salewsky B., Rosada A., Zemojtel T., Hopfenmüller W., Isermann B., Borucki K., Heigl F., Laufs U., Wagner S., Kleber M. E., Binner P., März W., Steinhagen-Thiessen E. and Demuth I. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 253: 88-93.

Beitrag im Einzelnen:

Thomas Grenkowitz hat für die vorgelegte Arbeit die Zusammenstellung der Patientendaten im interdisziplinären Stoffwechsel-Centrum und die Erstellung der gesamten digitalen Genotyp-Phänotyp-Datenbank selbständig durchgeführt. Die statistische Auswertung der Patientendaten, der Daten aus der Literatur und die Erstellung der Abbildungen 1, 2 und 3 und aller Tabellen erfolgte überwiegend durch Thomas Grenkowitz. Das Manuskript wurde von Thomas Grenkowitz gemeinsam mit Frau Dr. Ursula Kassner und Herrn PD Dr. Ilja Demuth verfasst.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

5 Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Abgerufen am 21. November 2016 von <http://admin-apps.webofknowledge.com>

Kategorie: Peripheral Vascular Disease (12/63)

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME HELP

2015 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: subject categories PERIPHERAL VASCULAR DI SEASE [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: Impact Factor [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 63)

Navigation icons: <<< << < [1 | 2 | 3 | 4] >> >>>

Page 1 of 4

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	CIRCULATION	0009-7322	155582	17.202	16.252	4.364	368	>10.0	0.26920	6.833
<input type="checkbox"/>	2	CIRC RES	0009-7330	47491	11.551	11.218	4.084	237	8.9	0.08503	4.174
<input type="checkbox"/>	3	HYPERTENSION	0194-911X	34532	6.350	6.860	1.745	310	8.7	0.05529	2.228
<input type="checkbox"/>	4	ARTERIOSCL THROM VAS	1079-5642	32993	5.969	6.225	1.544	298	8.7	0.05696	2.141
<input type="checkbox"/>	5	STROKE	0039-2499	57427	5.787	6.308	1.320	556	8.8	0.09772	2.217
<input type="checkbox"/>	6	J THROMB HAEMOST	1538-7933	15844	5.565	5.720	1.046	280	6.1	0.04208	2.114
<input type="checkbox"/>	7	CURR OPIN LIPIDOL	0957-9672	3953	5.336	5.150	0.746	71	7.3	0.00813	1.752
<input type="checkbox"/>	8	THROMB HAEMOSTASIS	0340-6245	16829	5.255	4.781	1.659	249	7.9	0.03131	1.599
<input type="checkbox"/>	9	J HYPERTENS	0263-6352	15665	5.062	4.293	1.218	271	7.9	0.02755	1.346
<input type="checkbox"/>	10	J STROKE	2287-6391	244	4.795		0.886	35	1.8	0.00099	
<input type="checkbox"/>	11	ANGIOGENESIS	0969-6970	2341	4.301	4.527	0.474	38	5.7	0.00553	1.395
<input type="checkbox"/>	12	ATHEROSCLEROSIS	0021-9150	22038	3.942	4.000	0.866	492	6.3	0.04461	1.189
<input type="checkbox"/>	13	SEMIN THROMB HEMOST	0094-6176	3400	3.505	3.198	1.560	100	6.0	0.00687	0.937
<input type="checkbox"/>	14	J VASC SURG	0741-5214	21773	3.454	3.260	0.709	413	7.8	0.03898	1.048
<input type="checkbox"/>	15	CEREBROVASC DIS	1015-9770	5518	3.359	3.330	0.558	77	6.7	0.01230	1.167
<input type="checkbox"/>	16	ATHEROSCLEROSIS SUPP	1567-5688	717	3.356	3.953	0.404	47	9.1	0.00109	1.129
<input type="checkbox"/>	17	AM J PHYSIOL-HEART C	0363-6135	30695	3.324	3.579	0.718	373	9.8	0.03680	1.151
<input type="checkbox"/>	18	CURR OPIN NEPHROL HY	1062-4821	3078	3.232	3.278	0.747	83	6.3	0.00751	1.152
<input type="checkbox"/>	19	HYPERTENS RES	0916-9636	4727	3.208	2.731	0.681	119	6.2	0.00841	0.692
<input type="checkbox"/>	20	AM J HYPERTENS	0895-7061	8250	3.182	3.160	1.000	175	8.4	0.01290	0.950

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 63)

Navigation icons: <<< << < [1 | 2 | 3 | 4] >> >>>

Page 1 of 4

[Acceptable Use Policy](#)
Copyright © 2016 Thomson Reuters.

6 Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Grenkowitz T., Kassner U., Wühle-Demuth M., Salewsky B., Rosada A., Zemojtel T., Hopfenmüller W., Isermann B., Borucki K., Heigl F., Laufs U., Wagner S., Kleber M. E., Binner P., März W., Steinhagen-Thiessen E. and Demuth I. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 253: 88-93.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.037>

7 Lebenslauf

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

8 Publikationsliste

8.1 Journal Publikationen

Grenkowitz T., Kassner U., Wühle-Demuth M., Salewsky B., Rosada A., Zemojtel T., Hopfenmüller W., Isermann B., Borucki K., Heigl F., Laufs U., Wagner S., Kleber M. E., Binner P., März W., Steinhagen-Thiessen E. and Demuth I. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 253: 88-93.

Kassner U., Salewsky B., Wühle-Demuth M., Szijarto I. A., **Grenkowitz T.**, Binner P., März W., Steinhagen-Thiessen E. and Demuth I. Severe hypertriglyceridemia in a patient heterozygous for a lipoprotein lipase gene allele with two novel missense variants. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(9): 1259-1261.

8.2 Poster Publikationen

Grenkowitz T., Hollstein T, Buchmann N, Ibrahim N, Spira D, Demuth I, Steinhagen-Thiessen I, Kassner U. Case Report Hypercholesterolemic patient with new homozygous LDLR mutation and severe early coronary heart disease. European Atherosclerosis Society (EAS) Congress 2016. Innsbruck, Austria.

Kassner U, Hollstein T, **Grenkowitz T.**, Wühle-Demuth M, Demuth I, Steinhagen-Thiessen E. Gene Therapy Case Report: First Treatment with Alipogene Tiparvovec in a Patient with Lipoprotein Lipase Deficiency and recurrent pancreatitis in Germany. European Atherosclerosis Society (EAS) Congress 2016. Innsbruck, Austria.

Hollstein T, **Grenkowitz T.**, Spira D, Buchmann N, Bobbert T, Steinhagen-Thiessen E, Kassner U. Treatment of therapy-refractory hypercholesterolemia with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibodies (PCSK9-I) in patients at high cardiovascular risk – effectivity and safety in clinical routine. European Atherosclerosis Society (EAS) Congress 2016. Innsbruck, Austria.

Grenkowitz T, Kassner U, Hollstein T, El-Zidy Ibrahim N, Buchmann N, Spira D, Demuth I, Steinhagen-Thiessen E. Kasuistik Patientin mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie bei neuer LDL-Rezeptor-Mutation und schwerer frühzeitiger koronarer Herzerkrankung. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) 2016. Mannheim, Deutschland.

Kassner U, Hollstein T, **Grenkowitz T**, Wühle-Demuth M, Demuth I., Steinhagen-Thiessen E. Kasuistik: Erste Gentherapie in Deutschland mit Alipogen Tiparvovec bei einer Patientin mit familiärer Lipoproteinlipasedefizienz und rezidivierenden Pankreatitiden. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) 2016. Mannheim, Deutschland.

Hollstein T, **Grenkowitz T**, Spira D, Buchmann N, Bobbert T, Steinhagen-Thiessen E, Kassner U. Die Behandlung der therapierefraktären Hypercholesterinämie mit proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)-Antikörpern bei Hochrisikopatienten – Effektivität und Verträglichkeit im klinischen Alltag. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) 2016. Mannheim, Deutschland.

Grenkowitz T, Kassner U, Salewsky B, März W, Binner P, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I. Mutation Spectrum in German Patients with Familial Hypercholesterolemia – An Update. Gesellschaft für Humangenetik 2016. Lübeck, Deutschland.

Grenkowitz T, Kassner U, März W, Binner P, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I. Mutation Spectrum in German Patients with Familial. Gesellschaft für Humangenetik 2015. Graz, Austria.

Kassner U, **Grenkowitz T**, Missala I, Meyer-zum-Büschelfelde D, Steinhagen-Thiessen E. The Use of Lp-PLA2 Measurement as a cardiovascular „finetuner“. European Atherosclerosis Society (EAS) Congress 2013. Lyon, France.

9 Danksagung

In besonderer Weise möchte ich PD Dr. Ilja Demuth für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen, die stets motivierenden Gespräche, sowie die enge und zuverlässige Betreuung danken.

Prof. Dr. Elisabeth Steinhagen-Thiessen danke ich für die Möglichkeit an Ihrer Ambulanz meine Arbeit durchzuführen, die freundliche Unterstützung und die wertvollen Ratschläge.

Besonders herzlich möchte ich Dr. Ursula Kassner danken, die mich schon viele Jahre wissenschaftlich und freundschaftlich unterstützt hat, sowohl in der Überlassung erster wissenschaftlicher Arbeiten, als auch in der angenehmen und verständnisvollen Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich auch den Mitgliedern der AG „Biologie des Alterns“ für den regen wissenschaftlichen Austausch.

Herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich stets und von Anfang an in allem was ich mir vorgenommen habe unterstützt haben, nie das Interesse verloren haben und mich an den Punkt geführt haben an dem ich heute bin.

Meiner Frau, Beatrice, möchte ich für die liebevolle Unterstützung zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit danken, für das Verständnis, die Kraft und die Geduld während aller Höhen und Tiefen.