



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Genetic dependencies in hereditary and sporadic melanoma

Christodoulou, E.

### Citation

Christodoulou, E. (2020, August 26). *Genetic dependencies in hereditary and sporadic melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136021>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136021>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136021> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Christodoulou, E.

**Title:** Genetic dependencies in hereditary and sporadic melanoma

**Issue date:** 2020-08-26

# **APPENDIX**

---

## Nederlandse samenvatting

Cutaan melanoom (CM) ontwikkelt zich door maligne ontarding van melanocyten, de pigment-producerende cellen van de huid. CM is een van de dodelijkste vormen van huidkanker vanwege het vermogen van tumorcellen om uit te zaaien. Er worden naar schatting wereldwijd 232.100 gevallen per jaar gediagnosticeerd en er zijn ongeveer 55 500 sterfgevallen. Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een algemene introductie over de verschillende aspecten van genetische predispositie bij familiair melanoom en verkregen genetische veranderingen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van melanoom.

Het voorkomen van melanoom bij familieleden is geassocieerd met verhoogd individueel risico op het ontwikkelen van deze vorm van huidkanker. Bij ongeveer 10% van de patiënten met melanoom zijn ook familieleden aangedaan. Er wordt van familiair (of erfelijk) melanoom gesproken bij voorkomen van tenminste drie gevallen van melanoom in een familie waarvan twee of meer bij eerstegraads verwanten. In de jaren 90 werden erfelijke veranderingen in het *CDKN2A* gen geïdentificeerd als oorzaak van familiale clustering van melanoom. In Nederlandse families met melanoom betreft het doorgaans een specifieke 'founder' mutatie in *CDKN2A*, de *p16-Leiden* mutatie. Sinds de identificatie van *CDKN2A* zijn andere genen gerapporteerd als melanoom risico genen als oorzaak van familiair voorkomen, waaronder *CDK4*, *BAP1*, *MITE*, *TERT*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP*, *GOLM1*, *EBF3*, *POLE* en *TP53AIP1*. Erfelijke veranderingen in *CDKN2A* en deze andere genen verklaren tezamen minder dan de helft van de familiair melanoom gevallen; in meer dan 50% van de patiënten met familiair melanoom is de oorzaak onbekend.

In hoofdstuk 2 hebben we getracht de genetische basis van familiair melanoom te verhelderen door een erfelijke verandering in het *NEK11* gene te onderzoeken. Deze erfelijke verandering was ontdekt bij alle door melanoom aangedane leden van een Nederlandse familie door toepassing van volledige exome sequencing (WES) -analyse. We toonden somatisch verlies van het wildtype allel (LOH) in het melanoom van een *NEK11*-mutatiedrager aan. Met behulp van experimenten met gekweekte cellen konden we aantonen dat de erfelijke verandering in het *NEK11* gen, dat een rol speelt bij regulatie van de celcyclus, instabiliteit van het *NEK11* eiwit waarvoor dit gen codeert veroorzaakt. De erfelijke verandering in het *NEK11* gen leidt tot functieverlies en dit ondersteunt de hypothese dat erfelijke veranderingen in het *NEK11* gen een oorzaak kunnen zijn van verhoogd risico op melanoom.

*CDKN2A* is het meest voorkomende melanoom risico gen en belangrijkste oorzaak van familiair melanoom. Draggers met erfelijke *CDKN2A* mutaties hebben een risico van 70% om gedurende het leven melanoom te ontwikkelen en daarbij een risico van 15-20% op het ontwikkelen van alvleesklierkanker (pancreascarcinoom, PC).

Interessant is dat klinische studies variabiliteit suggereren in het voorkomen van melanoom en PC binnen families, hetgeen suggereert dat modifierende factoren kunnen bijdragen aan het risico van het ontwikkelen van deze twee tumortypen bij dragers van *CDKN2A* mutaties. Bepaling van erfelijke factoren die het risico op PC en melanoom in families met *CDKN2A* mutatie moduleren zou daarom een betere identificatie mogelijk maken van patiënten met een extra verhoogd risico die baat zouden kunnen hebben bij gepersonaliseerde screening en preventie. In hoofdstuk 3 hebben we getracht erfelijke factoren te identificeren die verantwoordelijk zijn voor het PC-risico in *p16-Leidse* families. We testten een Single Nucleotide Polymorphism (SNP) gelegen in een multi-kanker risico locus, *TERT/CLPTM1L*, en vonden geen significant verband met het PC risico. Met betrekking tot melanoom vonden we wel een significant beschermend effect van de SNP, hoewel er een invloed was op de vaststelling in onze testgroep van patiënten en na correctie was de waargenomen associatie niet langer significant. Onze studie geeft aan dat meer onderzoek nodig is om erfelijke factoren die het risico op PC en melanoom modifieren bij dragers van *CDKN2A* mutaties te bepalen.

Hoewel wetenschappelijke studies hebben aangetoond dat verlies van het tweede wildtype allel bij patiënten met familiair melanoom ten gevolge van een erfelijke mutatie in het *CDKN2A* gen essentieel is voor de ontwikkeling van invasief melanoom is het niet bekend in welke fase in de ontwikkeling van melanocyt, moedervlek (nevus) naar melanoom dit optreedt. In hoofdstuk 4 hebben we *CDKN2A*-inactivatie onderzocht door verlies van heterozygositeit (LOH) bij melanocyttaire nevi en melanoom van patiënten met een erfelijke *CDKN2A* mutatie. Toepassing van gevoelige digitale PCR (dPCR)-technologie maakte nauwkeurige kwantificering van het *CDKN2A* gen mogelijk en toonde aan dat in een aantal melanocyttaire nevi het wildtype *CDKN2A*-allel verloren ging in subklonen van cellen. Dit bracht ons tot de conclusie dat bij familiair melanoom bi-allelische inactivatie van het *CDKN2A* gen al in een vroeg, pre-maligne stadium kan optreden. Dit is anders dan wat bekend is over de genomische evolutie van sporadisch (niet-familiair) melanoom. De kwantitatieve gegevens van dPCR-analyse van *CDKN2A*, *BRAF*, *TERT* en een locus op chromosoom 9q gaven ook inzicht in de volgorde waarin deze genetische verandering tijdens de vorming van melanoom optreden. Onze resultaten tonen aan dat *BRAF* mutatie optreedt vóór *CDKN2A*-verlies in het nevus stadium en verlies op chromosoom 9q later bij de ontwikkeling van melanoom. Het is aannemelijk dat melanocyttaire nevi die subklonen bevatten van cellen met *CDKN2A* LOH een hoger risico hebben om zich te ontwikkelen tot melanoom.

Naast genen geassocieerd met risico om melanoom te ontwikkelen en genen die een oorzakelijke rol spelen bij de vorming van melanoom kan een andere klasse van melanoom fitness genen onderscheiden worden. Deze genen relevant voor de biologie en behandeling kunnen worden gebruikt als doelwit voor therapie en

vormen in zekere zin de Achilleshiel van tumorcellen. Identificatie is vooral van groot van belang om nieuwe aanknopingspunten voor therapie te ontwikkelen. Tegen veel van de huidige therapieën voor uitgezaaid melanoom worden deze tumoren namelijk resistent. In hoofdstuk 5 beschrijven we analyses, verricht in samenwerking met het Wellcome Trust Sanger Institute (VK), op functionele genoom-wijde CRISPR-Cas9 screen resultaten gericht op het vinden van melanoom fitness genen en daarmee kwetsbaarheden voor therapie. Eerder gerapporteerde fitnessgenen voor melanoom, zoals *SOX10*, *BRAF* en *MITF* behoorden tot de door ons geïdentificeerde genen; dit suggereert dat de resultaten van deze screen analyse specifiek zijn voor melanoom. Opvallend was dat inactivatie van genen die coderen voor eiwitten die het MAPK signaaltransductiepad remmen, zoals *DUSP4* en *PPP2R2A*, de celdeling van melanoomcellen blokkeerden. Dit kan erop wijzen dat deze fosfatase eiwitten geschikte doelen voor therapie van melanoom zouden kunnen zijn.

In hoofdstuk 6 bespreken we de bevindingen van dit proefschrift, beperkingen en suggereren toekomstige richtingen. Gezamenlijk hopen we door toepassing van nieuwe genomische technieken een stap vooruit te hebben gezet in het begrijpen van verschillende genetische factoren betrokken bij het ontstaan van familiair en sporadisch melanoom.

