



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Decoding telomere gene variation through saturation genome editing: from functional genomics to clinical interpretation

Obolenski, S.

Citation

Obolenski, S. (2026, September 24). *Decoding telomere gene variation through saturation genome editing: from functional genomics to clinical interpretation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4310110>

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/1887/4310110>

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

Nederlandse Samenvatting

Ontcijfering van variatie in telomeergenen met behulp van verzadigde genoombewerking: van functionele genomica tot klinische interpretatie

Telomeren en de bijbehorende eiwitcomplexen zijn essentieel voor het behoud van chromosomale integriteit. Varianten die dit systeem verstoren kunnen predisponeren tot kanker en tot telomeerbiologie-aandoeningen. In de klinische praktijk worden genen zoals *POT1* en *TINF2* tegenwoordig steeds vaker opgenomen in erfelijke kankergenpaneltesten. Voor veel geïdentificeerde varianten ontbreekt echter voldoende functioneel en epidemiologisch bewijs, waardoor zij worden geclassificeerd als varianten van onzekere klinische betekenis (variants of uncertain significance; VUS). Dit beperkt de klinische bruikbaarheid van genetische testen, doordat een definitieve diagnose wordt bemoeilijkt, risicostratificatie wordt beperkt en beslissingen over klinisch beleid en surveillance voor patiënten en hun families onzeker blijven.

Dit proefschrift onderzoekt of saturation genome editing (SGE) systematisch functioneel bewijs kan leveren voor varianten in telomeerbiologiegenen en of dergelijke gegevens geïntegreerd kunnen worden in bestaande klinische interpretatiekaders. SGE is een gepoolde genome-editingbenadering waarbij grote aantallen varianten op hun endogene genomische locus in een gen worden geïntroduceerd en hun effecten parallel worden gemeten. Met *POT1* en *TINF2* als modelgenen zijn gedetailleerde variant-effectkaarten gegenereerd en geïntegreerd met telomeerfenotypen, klinische observaties en populatieniveau kankerrisico.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van beschikbare functionele genomicsbenaderingen voor variantinterpretatie en positioneert SGE binnen het bredere landschap van CRISPR-gebaseerde endogene multiplex assays of variant effect (MAVE), waarbij de motivatie voor het gebruik van SGE wordt uiteengezet. **Hoofdstuk 3** beschrijft de ontwikkeling van een SGE-workflow in haploïde HAP1-A5-cellen, inclusief het ontwerp van variantbibliotheken, de editingstrategie en kwantitatieve fitness-gebaseerde read-outs die reproduceerbare scoring van grote aantallen coderende varianten mogelijk maken. In **hoofdstuk 4** wordt dit platform toegepast op *POT1*, een essentieel onderdeel van het shelterincomplex met een gevestigde rol in erfelijk melanoom en andere vormen van kanker. Ongeveer 97% van alle mogelijke coderende single-nucleotide-varianten werd onderzocht, wat resulteerde in een functionele kaart die laat zien dat *POT1*-varianten een continuüm van functionele effecten vertonen, waarbij sterke en zwakke loss-of-function-allelen clusteren in de DNA-bindende eiwitdomeinen. SGE-functionele scores werden gevalideerd met behulp van

telomeerlengtemetingen en DNA-schade-responsfenotypering in HAP1-A5-cellen en bleken geassocieerd met kankerdiagnoses in UK BioBank en klinisch geclassificeerde patiëntcohorten, wat een verband ondersteunt tussen functionele verstoring van *POT1*, telomeerdysfunctie en kankerrisico.

Hoofdstuk 5 breidt de SGE-benadering uit naar *TINF2*, met focus op exons die coderen voor kerninteractiedomeinen waarin het merendeel van de bekende kanker-geassocieerde varianten voorkomt. De resulterende functionele kaart bevestigt dat zowel gevestigde pathogene varianten als nieuw geïdentificeerde varianten die in dit proefschrift worden beschreven de cellulaire fitness significant verminderen. Structurele mapping toont aan dat verstoring van interactieoppervlakken met TRF1, TRF2 en TPP1 bijzonder schadelijk is. Integratie van functionele gegevens met beschikbare klinische en pedigree-informatie ondersteunt een breder *TINF2*-geassocieerd tumorspectrum, met melanoom en schildkliercarcinoom als kernmaligniteiten, evenals terugkerende gevallen van zeldzamere maligniteiten, waaronder sarcoom, niercelcarcinoom en meerdere subtypen van hersentumoren.

Hoofdstukken 6 en 7 evalueren de klinische toepassing van SGE. In een populatiegebaseerde case-controlstudie naar melanoom maakte functionele classificatie onderscheid tussen zeldzame *POT1*-varianten die telomeerbinding verstoren en talrijke zeldzame missense-varianten zonder meetbaar functioneel effect, wat laat zien dat pathogene *POT1*-varianten zeldzaam zijn in de algemene populatie maar vaker voorkomen bij melanoompatiënten. In Zweedse melanoomfamilies werden SGE-scores gebruikt als aanvullend bewijs om de interpretatie van *POT1*-varianten die via routinematige klinische diagnostiek waren geïdentificeerd te ondersteunen, met name in complexe stambomen gekenmerkt door vroege ziektestart, multiple primaire tumoren en fenokopieën.

Hoofdstuk 8 plaatst alle bevindingen van dit proefschrift in de context van klinische variantinterpretatie en erfelijke kankergenetica. Het laat zien hoe gekalibreerde SGE-gegevens geïntegreerd kunnen worden in het ACMG/AMP-kader, waardoor de last van VUS wordt verminderd en variantinterpretatie over populaties heen wordt verbeterd. Tevens worden de beperkingen van het experimentele model besproken en toekomstige richtingen geschetst, waaronder uitbreiding naar niet-coderende variatie, aanvullende fenotypische read-outs en integratie met predictieve benaderingen.

Samenvattend vestigt dit proefschrift SGE als een klinisch relevant functioneel genomicskader voor telomeerbiologiegenen. Voor de kankerpredispositiegenen *POT1* en *TINF2* biedt dit werk functionele kaarten met hoge resolutie die de onderliggende biologie weerspiegelen en

domeinspecifieke kwetsbaarheden identificeren, wat de interpretatie van zeldzame kiemlijnvarianten in klinische cohorten ondersteunt. Door functionele effecten op variantniveau te koppelen aan telomeerfenotypen en kankerrisico draagt dit werk bij aan een verbeterde klinische zorg voor individuen met *POT1*- en *TINF2*-varianten en illustreert het hoe functionele genomica verder kan gaan dan annotatie richting praktische toepassing binnen erfelijke kankerpredispositie.