



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).

Deutsche Zusammenfassung

Telomere und die mit ihnen assoziierten Proteinkomplexe sind essenziell für die Aufrechterhaltung der chromosomalen Integrität. Varianten, die dieses System beeinträchtigen, können sowohl zu einer erhöhten Krebsprädisposition als auch zu Störungen der Telomerbiologie führen. In der klinischen Praxis werden Gene wie *POT1* und *TINF2* zunehmend in Panels zur Diagnostik hereditärer Krebserkrankungen aufgenommen. Für einen erheblichen Anteil der identifizierten Varianten fehlen jedoch ausreichende funktionelle und epidemiologische Evidenzen, sodass sie als Varianten unklarer klinischer Signifikanz (variants of uncertain significance; VUS) klassifiziert werden. Dies schränkt den klinischen Nutzen genetischer Testungen erheblich ein, da eine verlässliche Risikobewertung, klare diagnostische Zuordnung sowie fundierte Entscheidungen zu Überwachung und Präventionsmaßnahmen für Patientinnen und Patienten sowie deren Familien erschwert werden.

In dieser Dissertation wird untersucht, ob Saturation Genome Editing (SGE) genutzt werden kann, um die funktionelle Bedeutung genetischer Varianten in Telomerbiologie-Genen systematisch zu bewerten. Außerdem wird geprüft, inwieweit solche experimentellen Daten in bestehende klinische Bewertungssysteme für genetische Varianten integriert werden können.

SGE ist eine Methode der Genom-Editierung, bei der viele verschiedene genetische Varianten gleichzeitig direkt an ihrer natürlichen Position im Genom eingeführt werden. Anschließend kann parallel gemessen werden, welche Auswirkungen diese Varianten auf die Funktion der Zelle oder des Gens haben. In dieser Arbeit wurden *POT1* und *TINF2* als Modellgene verwendet. Für beide Gene wurden umfassende Varianteneffekt-Karten erstellt. Diese Daten wurden anschließend mit Telomer-Phänotypen, klinischen Beobachtungen und populationsbasierten Daten zum Krebsrisiko zusammengeführt.

Kapitel 2 gibt einen Überblick über aktuelle funktionell-genomische Ansätze zur Varianteninterpretation, mit besonderem Fokus auf CRISPR-basierte endogene Multiplex-Assays zur Analyse von Varianteneffekten (MAVE), und begründet die Wahl von SGE als zentralen experimentellen Ansatz. **Kapitel 3** beschreibt die Entwicklung und Optimierung eines SGE-Workflows in haploiden HAP1-A5-Zellen, einschließlich des Designs von Variantenbibliotheken, der Genome-Editing-Strategien sowie quantitativer, fitnessbasierter Readouts, die eine reproduzierbare funktionelle Bewertung großer Zahlen kodierender Varianten ermöglichen.

In **Kapitel 4** wird dieser Ansatz auf *POT1* angewandt, eine zentrale Komponente des Shelterin-Komplexes mit etablierter Rolle bei hereditärem Melanom und weiteren Krebserkrankungen. Etwa 97 % aller möglichen kodierenden Single-Nukleotid-Varianten wurden untersucht. Die resultierende funktionelle Karte zeigt, dass *POT1*-Varianten ein Kontinuum funktioneller Effekte aufweisen und sich nicht in eine einfache binäre Einteilung in pathogene und benigne Varianten fassen lassen. Varianten mit ausgeprägter funktioneller Beeinträchtigung waren vor allem in den DNA-bindenden OB-Fold-Domänen angereichert. Die mittels SGE gewonnenen Funktionsscores wurden durch Telomerlängenmessungen und Analysen der DNA-Schadensantwort validiert und mit Krebsdiagnosen in der UK Biobank sowie in klinisch charakterisierten Patientenkohorten in Beziehung gesetzt. Dies unterstützt einen quantitativen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung von *POT1*, telomerer Dysfunktion und Krebsrisiko.

Kapitel 5 erweitert den SGE-Ansatz auf *TINF2* und konzentriert sich auf Exons, die für zentrale Interaktionsdomänen des Shelterin-Komplexes kodieren, in denen der Großteil der bekannten krebsassoziierten Varianten lokalisiert ist. Die funktionelle Karte bestätigt, dass sowohl etablierte pathogene Varianten als auch neu in dieser Arbeit identifizierte Varianten zu einer signifikanten Beeinträchtigung der zellulären Fitness führen. Strukturbiochemische Analysen zeigen, dass insbesondere Störungen der Interaktionsoberflächen mit TRF1, TRF2 und TPP1 funktionell stark nachteilig sind. Die Integration funktioneller Daten mit klinischen Informationen und Stammbaumanalysen spricht für ein erweitertes *TINF2*-assoziiertes Tumorspektrum, mit Melanom und nicht-medullärem Schilddrüsenkarzinom als Kernmalignomen sowie wiederkehrenden Fällen seltenerer Tumoren, darunter Sarkome, Nierenzellkarzinome und verschiedene Hirntumoren.

Die **Kapitel 6** und **7** befassen sich mit der klinischen Anwendbarkeit von SGE-Daten. In einer populationsbasierten Melanom-Fall-Kontroll-Studie ermöglichte die funktionelle Klassifikation die Unterscheidung seltener *POT1*-Varianten mit gestörter Telomerbindung von zahlreichen seltenen Missense-Varianten ohne messbaren funktionellen Effekt. Dies zeigt, dass pathogene *POT1*-Varianten in der Allgemeinbevölkerung selten sind, jedoch bei Melanompatientinnen und -patienten häufiger auftreten. In schwedischen Melanomfamilien wurden SGE-basierte Funktionsscores als ergänzende Evidenz herangezogen, um die Interpretation von *POT1*-Varianten zu unterstützen, die im Rahmen der routinemäßigen klinischen genetischen Diagnostik identifiziert wurden, insbesondere in komplexen Stammbäumen mit frühem Erkrankungsbeginn, multiplen Primärtumoren und Phänokopien.

Kapitel 8 ordnet die Ergebnisse dieser Dissertation in den übergeordneten Kontext der klinischen Varianteninterpretation und der hereditären Krebsgenetik ein. Es wird gezeigt, wie

kalibrierte SGE-Daten in das ACMG/AMP-Klassifikationssystem integriert werden können, was zur Reduktion des Anteils von VUS und zu einer verbesserten Varianteninterpretation auf Populationsebene beiträgt. Darüber hinaus werden die Limitationen des experimentellen Modells diskutiert und zukünftige Perspektiven aufgezeigt, darunter die Ausweitung auf nicht-kodierende Varianten, zusätzliche phänotypische Readouts sowie die Integration prädiktiver Ansätze.

Zusammenfassend zeigt diese Dissertation, dass SGE einen klinisch relevanten funktionell-genomischen Ansatz für die Untersuchung von Telomerbiologiegenen darstellt. Für die Krebsprädispositionsgene *POT1* und *TINF2* werden hochauflösende funktionelle Karten präsentiert, die die zugrunde liegende Biologie widerspiegeln, domänenspezifische Vulnerabilitäten identifizieren und die Interpretation seltener Keimbahnvarianten in klinischen Kohorten unterstützen. Durch die Verknüpfung variantspezifischer funktioneller Effekte mit Telomerphänotypen und Krebsrisiko leistet diese Arbeit einen Beitrag zur fundierteren klinischen Interpretation genetischer Testergebnisse und verdeutlicht das Potenzial funktioneller Genomik für die praktische Anwendung in der hereditären Krebsprädisposition.