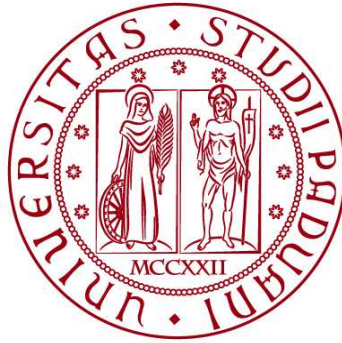


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**VARIANTI GERMINALI NEI GENI *POT1*, *TINF2* E
ACD, CHE REGOLANO LA LUNGHEZZA DEI
TELOMERI, SONO COINVOLTE NELLA
PREDISPOSIZIONE EREDITARIA AL
CARCINOMA PAPILLARE DELLA TIROIDE**

Tutor: Prof. Giovanni Vazza
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Giulia Penzo

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

SOMMARIO

ABSTRACT	2
STATO DELL'ARTE: INTRODUZIONE ALLA PROBLEMATICAFRONTATA	3
Il carcinoma papillare della tiroide	3
Telomeri e predisposizione ereditaria al PTC	4
Obiettivi.....	6
APPROCCIO SPERIMENTALE: DESCRIZIONE DELLE METODOLOGIE ...	7
Soggetti analizzati	7
Analisi di sequenziamento mediante NGS.....	8
Prioritizzazione delle varianti	9
Analisi della lunghezza dei telomeri	10
Identificazione delle mutazioni somatiche.....	10
RISULTATI E DISCUSSIONE: ANALISI CRITICA E DISCUSSIONE DELL'APPROCCIO SPERIMENTALE.....	11
Varianti identificate nella coorte 1	11
Varianti identificate nella coorte 2	13
Concomitanza con altre neoplasie.....	14
Anticipazione genetica	15
Telomerasi e varianti genetiche	16
Mantenimento dei telomeri	17
CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI	18
BIBLIOGRAFIA	20

ABSTRACT

Tra le forme più comuni di neoplasie endocrine, emerge il carcinoma papillare della tiroide (PTC), la cui forma familiare non è ancora ben definita da un punto di vista genetico e di meccanismi molecolari implicati. Un recente percorso di ricerca sta focalizzando la propria attenzione sui telomeri e sulla loro eventuale applicazione nella predisposizione tumorale. In questo elaborato di tesi viene analizzato lo studio condotto da DeBoy e colleghi, dal titolo “*Telomere-lengthening germline variants predispose to a syndromic papillary thyroid cancer subtype*” nel quale, per indagare questa possibile correlazione, sono stati qui analizzati cinque geni candidati: *POT1*, *TINF2*, *ACD*, *TERT* e il promotore di *TERT* (*TERTp*). Al fine di consolidare questo studio, sono state reclutate due coorti di individui affetti da PTC, la prima selezionata secondo criteri specifici, mentre la seconda è stata reclutata senza alcun criterio. Entrambe le coorti sono state sottoposte a sequenziamento e ad analisi delle varianti e della lunghezza telomerica ed è emerso che gli individui portatori di mutazioni nei cinque geni candidati erano caratterizzati dalla presenza di telomeri ultra-lunghi e, nella maggior parte dei casi, sviluppavano altre neoplasie concomitanti. È emersa, inoltre, la presenza di anticipazione genetica, per cui le generazioni successive presentavano telomeri più lunghi e insorgenze neoplastiche più precoci. L’ipotesi finale prevede che il PTC tenda a svilupparsi più facilmente in individui con telomeri lunghi, poiché in questi casi non sono necessari ulteriori meccanismi somatici di mantenimento della lunghezza telomerica.

STATO DELL'ARTE: INTRODUZIONE ALLA PROBLEMATICCA AFFRONTATA

Il carcinoma papillare della tiroide

Il carcinoma papillare della tiroide (PTC) è la forma più frequente di tumore endocrino e costituisce circa il 90% di tutti i tumori maligni della tiroide. I tumori tiroidei si distinguono in due categorie principali: midollari e non midollari.

I carcinomi midollari originano dalle cellule parafollicolari (note anche come cellule C), responsabili della produzione di calcitonina. Al contrario, i tumori non midollari, tra i quali rientra il PTC, che è il sottotipo più comune, derivano da cellule follicolari della tiroide, coinvolte nella produzione di ormoni tiroidei.

Dal punto di vista istologico, il PTC papillare è distinguibile morfologicamente per la presenza di visibili estroflessioni papillari, strutture ramificate e digitiformi rivestite da tessuto epiteliale neoplastico, da cui deriva il nome stesso del tumore.

Clinicamente, il tumore papillare tiroideo è associato generalmente a una prognosi favorevole, soprattutto se diagnosticato in fase precoce: la sopravvivenza a cinque anni dall'intervento chirurgico supera il 95% dei casi. Tuttavia, negli stadi più avanzati, c'è il rischio di recidiva o metastasi nel 50% dei pazienti, anche dopo 10 anni dalla prima diagnosi.

Il PTC si manifesta principalmente in due forme: sporadica o familiare.

Il carcinoma papillare tiroideo sporadico è la forma più comune e viene rilevato in assenza di una storia familiare pregressa della malattia: un individuo sviluppa il tumore, ma nessun altro parente ha avuto lo stesso tipo di cancro. In queste condizioni, la tumorigenesi è dovuta a mutazioni somatiche, acquisite nel corso della vita e non ereditate, che sono ormai sufficientemente note e, tra le più frequenti, ci sono quelle che coinvolgono i geni *BRAF*, *RAS* e *RET*. La solida conoscenza di queste alterazioni genetiche ha reso possibile il loro utilizzo in ambito diagnostico.

Circa il 10% dei casi di PTC presenta, invece, una componente familiare, in cui la malattia si manifesta in più membri di una stessa famiglia; in questi casi, almeno due parenti di primo grado (come, ad esempio, due fratelli o un genitore e un figlio) sono affetti dallo stesso identico tipo di tumore. Tuttavia, dato l'elevato tasso di incidenza della forma sporadica, si potrebbero verificare due casi di PTC nella stessa famiglia per semplice coincidenza. Per questo motivo, è più efficiente studiare famiglie con almeno tre membri affetti.

Diversamente dalla forma sporadica, per la quale i meccanismi molecolari sono noti, il PTC familiare è un ambito di studio più recente ed è ancora poco definito da un punto di vista genetico. Attualmente, sembrerebbe trattarsi di una malattia con trasmissione autosomica dominante, di cui sono stati proposti circa 60 possibili geni coinvolti, ma nessuno di questi è stato confermato in maniera

convincente in campioni indipendenti. Per questo motivo, questi geni non vengono attualmente utilizzati per gli screening genetici o per la valutazione del rischio familiare.

Telomeri e predisposizione ereditaria al PTC

Una linea di ricerca suggerisce che i telomeri potrebbero essere coinvolti nella predisposizione familiare al carcinoma papillare della tiroide.

Inizialmente, si ipotizzava che la responsabilità fosse associata alla presenza di telomeri corti rilevati nei leucociti di pazienti affetti da PTC. Nei casi familiari, a differenza di quelli sporadici, i telomeri corti non erano presenti solo nei tessuti neoplastici, ma anche in quelli sani, suggerendo un fenotipo ereditario di predisposizione tumorale.

Tuttavia, un'analisi ventennale (2003-2022) ha evidenziato che i soggetti affetti da sindromi da telomero corto avevano una frequenza di insorgenza di PTC minore dell'atteso. Lo studio ha inoltre dimostrato come gli individui con telomeri più corti della media presentino un rischio maggiore di sviluppare carcinomi a cellule squamose (come quelli di testa-collo, ano o cute), e un rischio inferiore per altri tumori legati all'invecchiamento (come tiroide, polmone e colon). Pertanto, questi risultati suggeriscono che, sebbene i telomeri corti predispongano alcune forme tumorali, contemporaneamente possano avere un ruolo protettivo per alcune neoplasie legate all'età.

Sebbene l'interesse scientifico si fosse inizialmente concentrato sulla correlazione tra telomeri corti e predisposizione tumorale, suggerendo che l'instabilità cromosomica derivante dall'erosione telomerica favorisse l'insorgenza di neoplasie, l'analisi più recente di casi familiari e di coorti portatrici di mutazioni in alcuni geni coinvolti nella regolazione della lunghezza telomerica ha messo in discussione questa visione.

È emerso, infatti, che alcuni soggetti predisposti geneticamente alla trasformazione neoplastica non presentano telomeri corti, ma ultra-lunghi. Queste osservazioni hanno suggerito che la persistente lunghezza dei telomeri potrebbe sia favorire la sopravvivenza cellulare prolungata sia promuovere l'accumulo di mutazioni nel tempo, contribuendo allo sviluppo tumorale.

Di conseguenza, mentre i telomeri corti sembrerebbero limitare la proliferazione incontrollata, i telomeri ultra-lunghi potrebbero costituire un rischio oncologico in individui geneticamente predisposti.

Un esempio interessante è rappresentato dalle mutazioni germinali in eterozigosi *loss of function* nel gene *POT1* (*Protection Of Telomeres 1*), che è una proteina che si lega all'estremità 3' del singolo filamento del DNA telomerico, proteggendolo dalla degradazione esonucleasica e mantenendone la stabilità cromosomica, limitandone l'estensione.

Uno studio di 17 individui eterozigoti portatori di mutazioni germinali *loss of function* nel gene *POT1* e di una coorte di validazione successiva ha mostrato che quasi tutti i soggetti presentavano telomeri ultra-lunghi con una lunghezza superiore quasi sempre al 99° percentile, rispetto ai parenti non portatori, utilizzati come controllo. La presenza di telomeri più lunghi del normale favorisce il ritardo della senescenza replicativa, ma facilita anche la sopravvivenza e la riproduzione di cloni cellulari con mutazioni somatiche *driver*, aumentando il rischio di emopoiesi clonale e tumori solidi, tra cui il PTC, che risulta essere il secondo tumore solido più comune.

Queste modalità vengono associate a un modello di predisposizione familiare con trasmissione autosomica dominante, in cui la longevità cellulare acquisita dalla presenza di telomeri ultra-lunghi favorisce l'accumulo di mutazioni e di cloni.

Si notano anche fenomeni di anticipazione genetica: insorgenza di neoplasie sempre più precoci in termini di età con il passare delle generazioni. Inoltre, la presenza di telomeri ultra-lunghi sembrerebbe favorire la presenza di tumori multipli, tra cui il melanoma.

Un altro gene interessante nell'ambito della predisposizione ereditaria al cancro è *TINF2*, che codifica per una proteina telomerasica, TIN2, che è una componente chiave del complesso *shelterin*, responsabile del mantenimento della lunghezza telomerica.

Mutazioni germinali troncanti di *TINF2*, responsabili di una perdita di funzione in eterozigosi (aploinsufficienza), sono state associate a una nuova forma di predisposizione ereditaria al cancro. Queste mutazioni sono responsabili dell'estensione eccessiva dei telomeri già nella fase di sviluppo embrionale, generando telomeri ultra-lunghi, che, nei pazienti portatori, non sono associati né a un'instabilità genomica né alla perdita di protezione telomerica, ma a una prolungata capacità replicativa delle cellule, che consente l'accumulo di ulteriori alterazioni genetiche, favorendo la formazione di neoplasie.

Nei soggetti portatori di mutazioni troncanti in *TINF2* si presenta un ampio spettro tumorale, tra cui il carcinoma mammario, il melanoma, il carcinoma del colon retto, e, in particolare, il carcinoma papillare della tiroide, riscontrato in più soggetti affetti all'interno delle famiglie studiate, suggerendo un ruolo causale del gene nella sua predisposizione.

Le mutazioni di *TINF2* sembrano agire durante le prime fasi embrionali, dove la telomerasi, attiva nei tessuti embrionali, facilita l'allungamento di questi telomeri in assenza del limite normalmente imposto da *TINF2*, predisponendo all'insorgenza di tumori, come il carcinoma papillare della tiroide.

Pertanto, *TINF2* risulta essere un oncosoppressore atipico, la cui funzione protettiva si esplicita in una breve finestra temporale durante lo sviluppo umano e induce a compiere una riflessione sul fatto che la lunghezza dei telomeri può essere considerata un potenziale biomarcatore di rischio oncologico, in particolar modo, nei confronti di famiglie che presentano predisposizioni al cancro.

Obiettivi

In questo studio non vengono dunque proposti nuovi possibili geni responsabili della predisposizione ereditaria al PTC, ma si approfondiscono i ruoli di geni già descritti in alcune analisi precedenti, quali *POT1*, *TINF2*, e di altri 3 geni, *ACD*, *TERF2IP* e il promotore di *TERT*, con l'obiettivo di comprendere se questi geni, coinvolti nel mantenimento dei telomeri, siano effettivamente in grado di spiegare la suscettibilità monogenica al carcinoma papillare della tiroide e, in tal caso, approfondire il loro potenziale clinico per il monitoraggio dei pazienti.

APPROCCIO SPERIMENTALE: DESCRIZIONE DELLE METODOLOGIE

Soggetti analizzati

Per effettuare lo studio, sono state analizzate le varianti germinali dei cinque geni telomerici candidati in 2 coorti, reclutate tra il 1999 e il 2019.

La coorte 1 è stata assemblata reclutando alcuni soggetti presenti nel registro OSU (*Ohio State University*) e da uno studio su PTC familiare. Sono stati scelti i primi 200 individui con le seguenti caratteristiche, in ordine di priorità¹:

- (1) Soggetti con PTC e storia melanoma o nevi;
- (2) PTC coesistente con leucemia o linfoma;
- (3) PTC familiare (tre o più individui affetti);
- (4) Maschi con PTC diagnosticato prima dei 40 anni;
- (5) Partecipanti con PTC multifocale.

Si è ritenuto opportuno analizzare una seconda coorte di individui, con l'obiettivo di confermare il coinvolgimento dei tre geni telomerici presenti nella coorte 1. La coorte 2 presenta 270 soggetti con PTC selezionati senza criteri specifici, per i quali erano disponibili i dati dell'esoma del DNA ematico.

Tutte le caratteristiche degli individui analizzati sono riportate nella Tabella 1.

Caratteristiche	Numeri della coorte 1	Numeri della coorte 2
Partecipanti totali con PTC	200	270
Numero di famiglie uniche	189	
Età alla diagnosi di PTC, mediana (intervallo)	39 (9-88)	45 (16-85)
Uomini	138	92
Donne	62	177
Sconosciuti	0	1
Storia familiare (parenti di 1° o 2° grado con PTC)		
0	101	211
1 (2 casi totali di PTC in una famiglia)	49	22
≥2 (3 o più casi di PTC in una famiglia)	50	7
Sconosciuto	0	30
Distribuzione della fascia d'età		
<29	45	40
30-49	99	122
50-69	46	88
>70	10	20
Focalità del PTC		
Unifocale	20	115
Multifocale	179	124
Sconosciuto	1	31
Neoplasie concomitanti		
PTC con melanoma (inclusi melanomi in situ/nevi)	27 (inclusi 22)	9
PTC con leucemia/linfoma	13	/

¹elenco tratto integralmente da De Boy et al., 2024, *The American Journal of Human Genetics* 111, 1114–1124

Confrontando la distribuzione dei soggetti per sesso nelle due coorti, viene alla luce una differenza apparente: la coorte 2, nonostante comprenda un numero maggiore di individui, presenta una quantità di soggetti di sesso maschile inferiore rispetto alla coorte 1. Generalmente, il PTC si rileva soprattutto in individui di sesso femminile, ma, in questo studio, l'elevata quantità di maschi presenti nella coorte 1 rispetto alla coorte 2 sembrerebbe essere un *bias*, dovuto ai criteri di selezione nella fase di reclutamento: nella coorte 2 i soggetti sono stati scelti in modo casuale, mentre nella coorte 1 si è deciso di selezionare anche un sottogruppo di individui di sesso maschile di età inferiore ai quarant'anni, affetti da PTC, al fine di aumentare la probabilità di avere una famiglia con una genetica forte, soprattutto in una famiglia con molti maschi affetti.

Analisi di sequenziamento mediante NGS

Per la coorte 1 si è scelto un approccio di sequenziamento mirato *paired-end* sulla piattaforma Illumina MiSeq, con la quale si è creato un *target panel*, consentendo la cattura, a partire dal DNA genomico, delle sequenze di interesse, relative ai cinque geni candidati, mediante l'utilizzo di sonde specifiche.

Il protocollo prevede in primo luogo l'estrazione del DNA genomico, successivamente la sua frammentazione, seguita dall'ibridazione con delle sonde disegnate per catturare selettivamente le regioni esoniche dei cinque geni di interesse; infine, le sequenze vengono amplificate e utilizzate per creare una libreria di sequenziamento, che viene caricata sulla piattaforma MiSeq per fare *next generation sequencing*.

La regione del promotore del gene *TERT*, tuttavia, aveva un *coverage* insufficiente, probabilmente dovuto all'inefficacia della sonda specifica di quella regione; per risolvere questo problema, la regione del promotore è stata amplificata mediante PCR ed è stato eseguito un sequenziamento Sanger.

L'identificazione delle varianti è avvenuta con un allineamento delle *reads* alla sequenza di riferimento (GRCh37), seguito da analisi bioinformatica di *variant calling* mediante il software Genome Analysis Toolkit (GATK). Successivamente, tutte le varianti identificate sono state sottoposte a una fase di annotazione funzionale mediante il software ANNOVAR, al fine di attribuire il corretto significato biologico a ciascuna mutazione. Una volta annotate, è stata effettuata una fase di filtraggio delle varianti mediante bcftools, al fine di valutarne la qualità. Infine, le varianti identificate nei geni di riferimento sono state confermate nel probando e successivamente nei parenti mediante l'utilizzo di PCR e sequenziamento Sanger.

Per la coorte 2 si è scelto, invece, un approccio di *whole exome sequencing* di uno studio preesistente sugli stessi soggetti. Questo metodo prevede di sequenziare tutto l'esoma con dei kit commerciali, che contengono sonde specifiche per gli esoni noti, con lo scopo di avere una copertura estesa, ma in seguito il procedimento prosegue analogamente a quanto eseguito per la coorte 1: le *reads*

vengono allineate al genoma di riferimento e le varianti vengono identificate sulla base delle differenze tra la sequenza letta e quella attesa. È stata, quindi, effettuata una *variant calling* mediante l'algoritmo Haplotyper, seguita dall'annotazione funzionale tramite Ensembl Variant Effect Predictor, che consente di avere informazioni sul possibile impatto delle varianti a livello genico e proteico. Successivamente, secondo i criteri dello standard Mutalyzer, è stata condotta la prioritizzazione delle varianti, al fine di estrarre i cinque geni di interesse, gli stessi della coorte 1, rendendo possibile un confronto tra le due coorti.

Si osserva che non è stato adottato lo stesso approccio di sequenziamento per le due coorti, scelta giustificata dalla presenza di dati di *whole exome sequencing* già disponibili per la coorte 2, dai quali sono stati estratti i geni di interesse, mentre per la coorte 1 non si possedevano analisi precedenti, motivo per cui si sono scelti approcci di sequenziamento diversi. Si potrebbe ipotizzare che, se si fosse trattato di un'analisi *ex novo*, si sarebbe applicata la stessa strategia di sequenziamento. Tuttavia, nonostante i due metodi diversi, le varianti di entrambe le coorti sono state sottoposte a dei filtri di qualità, allo scopo di distinguere quelle di maggiore rilevanza da quelle di minore rilevanza.

Prioritizzazione delle varianti

Per selezionare le numerose varianti identificate sono stati applicati dei criteri di prioritizzazione, secondo i quali l'attenzione è stata rivolta alla presenza di varianti ultra-rare nonsense o di splicing con frequenza allelica minore a 0,01%. Infatti, affinché una malattia monogenica sia rara nella popolazione, lo deve essere anche la mutazione responsabile e l'effetto patogenetico prodotto deve essere forte; se, al contrario, una variante patogenetica non fosse rara, ci si aspetterebbe un'elevata frequenza di individui affetti nella popolazione, ma ciò non è compatibile con malattie come il PTC. Si scelgono, dunque, modelli monogenici, in cui una sola mutazione ha un effetto determinante, in quanto riescono a spiegare in modo più efficace le segregazioni verticali (ad esempio, la trasmissione da un genitore al figlio), a differenza dei modelli poligenici, in cui sono coinvolti più geni, dove ciascuna variante può avere un effetto minore e, di conseguenza, può essere più frequente nella popolazione, con un effetto cumulativo nel rischio di avere la malattia.

Sono inoltre stati applicati dei predittori di patogenicità, come il CADD score (*Combined Annotation Dependent Depletion*), che, basandosi su mutazioni note, è in grado di stimare la probabilità che una variante sia patogenetica: in queste analisi, il cut-off è stato fissato a 20, in modo che tutte le varianti con un valore maggiore di 20, vengano considerate potenzialmente patogeniche.

Per l'inclusione finale nell'analisi, sono state scelte quelle varianti che avessero la lunghezza media dei telomeri nel sangue superiore al 90° percentile, corretta per età, mediante tecnica flowFISH (citometria a flusso combinata con ibridazione fluorescente in situ) su cellule separate con ficoll e crioconservate. In aggiunta,

sono state selezionate anche le prove precedentemente pubblicate a sostegno della patogenicità, tra cui casi di telomeri ultra-lunghi (maggiori al 99° percentile, sempre determinati con flowFISH), mentre le varianti rare che non rientravano in questi criteri sono state classificate come varianti di significato incerto.

Dal momento che varianti rare sono state identificate in più famiglie, gli autori si sono posti il problema relativo alle origini, interrogandosi se si trattasse effettivamente della stessa mutazione emersa in eventi distinti oppure di una mutazione derivante da un unico antenato comune (effetto fondatore). Per comprendere quale delle due ipotesi fosse corretta, hanno analizzato gli SNP (*single nucleotide polymorphism*) adiacenti alla variante di interesse; se la mutazione compare più volte in maniera indipendente, è probabile che siano diverse le sequenze fiancheggianti; viceversa, la presenza dello stesso aplotipo supporta l'ipotesi di un effetto fondatore, cioè di un'unica origine ancestrale. Per valutare il grado di parentela genetica tra gli individui portatori della stessa variante rara, sono stati esaminati gli SNP array.

Analisi della lunghezza dei telomeri

Per analizzare la distribuzione della lunghezza dei telomeri nelle generazioni, è stata utilizzata la tecnica del FISH telomerico quantitativo (Q-FISH) su cromosomi in metafase, ottenuti in vitro da cellule del sangue periferico tramite isolamento e stimolazione con fitoemoagglutinina (PHA) e crioconservazione presso il laboratorio di Johns Hopkins University.

Identificazione delle mutazioni somatiche

Gli autori hanno esaminato anche il DNA tumorale, al fine di verificare la presenza di mutazioni somatiche aggiuntive alle varianti germinali.

Dopo aver trattato i campioni con NEBNext FFPE DNA repair per minimizzare i danni indotti dalla formalina al DNA, è stato sequenziato in modo mirato il DNA tumorale utilizzando un pannello di 439 geni implicati nei tumori solidi, con una copertura media di circa 473x, per avere una identificazione affidabile delle mutazioni somatiche poco frequenti. Successivamente, sono state eseguite delle analisi bioinformatiche, in cui sono stati allineati i dati ottenuti con il genoma di riferimento hg19 (GRCh37); in un secondo momento è stata effettuata una *variant calling*, focalizzata sui *driver* noti del PTC e sul promotore centrale di *TERT*, dove sono state identificate le mutazioni presenti in siti ricorrenti.

La presenza di mutazioni somatiche aggiuntive a quelle germinali nei geni rilevanti corrobora l'ipotesi di un modello a più fasi, in cui le mutazioni somatiche collaborano con quelle germinali.

RISULTATI E DISCUSSIONE: ANALISI CRITICA E DISCUSSIONE DELL'APPROCCIO SPERIMENTALE

Varianti identificate nella coorte 1

In considerazione della correlazione precedentemente descritta tra la lunghezza dei telomeri e la predisposizione allo sviluppo del carcinoma papillare tiroideo, è stata effettuata un'analisi mirata sui cinque geni candidati relativi ai telomeri, quali *POT1*, *TINF2*, *ACD*, *TERF2IP* e il promotore di *TERT*, nella coorte 1, composta da 200 individui selezionati secondo specifici criteri clinici, appartenenti a 189 famiglie.

L'analisi condotta ha rilevato la presenza di varianti germinali rare in eterozigosi in nove individui, corrispondenti al 4,5% della coorte, appartenenti a sette famiglie distinte. Tre di queste varianti erano collocate nel gene *POT1*, cinque in *TINF2* e una soltanto in *ACD*:

- Nel gene *POT1*, è stata individuata la variante *POT1* c.1071dup (p.Glu358Serfs*13), ritenuta di notevole interesse in quanto identificata in due individui non imparentati, i quali condividevano anche gli SNP adiacenti, suggerendo la presenza di un possibile effetto fondatore.

Inoltre, è stata identificata un'ulteriore variante in questo gene (c.121A>G, p.Thr41Ala), la quale è responsabile dell'alterazione di un residuo altamente conservato della proteina e che, in studi *in vitro*, risulta avere minor capacità di legame al DNA telomerico, suggerendo una possibile perdita della funzione del complesso shelterin.

- Il gene *TINF2*, invece, presenta tre varianti troncanti:
 - c.248_249del (p.Leu83Glnfs*53), che non compare nei principali database di popolazione (gnomAD);
 - c.793C>T (p.Arg265*), la quale era già stata identificata come variante fondatrice in individui danesi, che presentavano melanoma multiplo primario e telomeri ultra-lunghi;
 - c.591del (p.Trp198Glyfs*12), identificata in tre individui appartenenti alla stessa famiglia, già presente in letteratura, e in linea con i parametri di selezione dello studio.
- Infine, è stata identificata anche una variante in *ACD* (c.488A>G, p.Asn163Ser), già descritta come variante fondatrice nel melanoma familiare in famiglie australiane e danesi; inoltre, il probando presentante questa variante e affetto da PTC presentava lo stesso blocco aplo tipico, suggerendo una medesima origine ancestrale e una possibile sovrapposizione dei meccanismi genetici predisponenti.

Tutti gli individui con le varianti sopra riportate sono identificabili negli alberi genealogici presenti nella figura 1.

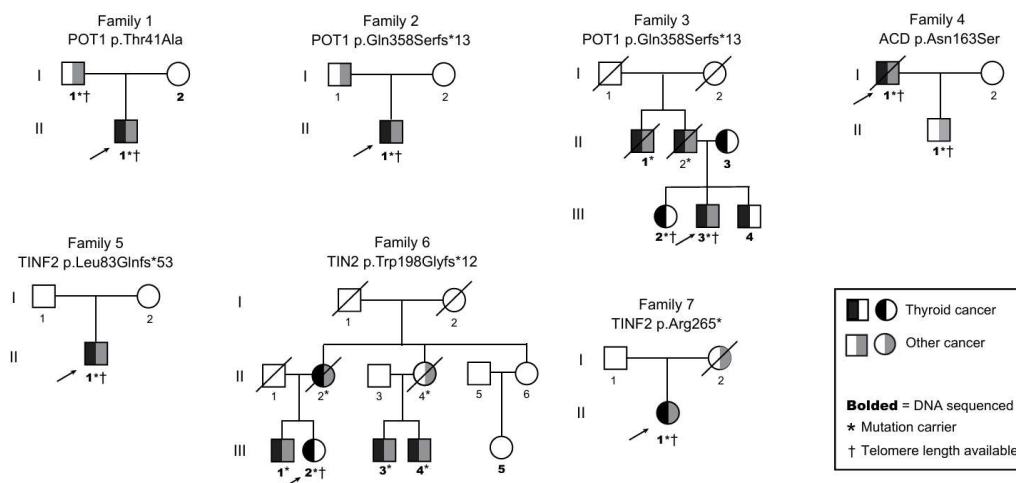


Figura 1: Alberi genealogici di alcuni individui appartenenti alla coorte 1

Pertanto, l'identificazione di queste mutazioni germinali nei geni legati al mantenimento dei telomeri, presenti in un sottogruppo di pazienti affetti da PTC, suggerisce un loro possibile contributo nella predisposizione tumorale. In più, la presenza di varianti fondatrici, già associate ad altri tumori familiari, corrobora l'ipotesi che la disfunzione nei telomeri possa costituire un meccanismo molecolare comune tra le diverse forme neoplastiche, tra cui il PTC.

Al fine di verificare il possibile legame tra la predisposizione tumorale ereditaria e le variazioni sulla lunghezza dei telomeri, sono stati selezionati otto probandi, portatori di mutazioni nei geni coinvolti nel mantenimento telomerico, la cui lunghezza linfocitica è stata misurata mediante FlowFISH (Figura 2).

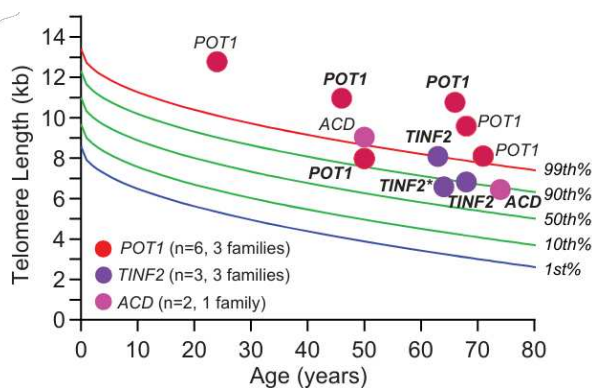


Figura 2: lunghezza telomerica dei linfociti

I dati ottenuti su questi individui sono stati i seguenti:

- Cinque individui presentavano una lunghezza superiore al 90° percentile, aggiustato per età; di questi, tre avevano una lunghezza superiore al 99° percentile.
- Due probandi, invece, presentavano valori inferiori al 90° percentile:
 - Un individuo possedeva la variante *TINF2* c.793C>T (p.Arg265*), già descritta come variante fondatrice, associata a casi di melanoma familiare e di telomeri ultra-lunghi. In questo caso, però, la lunghezza dei telomeri risultava essere leggermente più corta, ma questo dato è spiegabile mediante fattori clinici concomitanti: questo individuo presentava mieloma multiplo e aveva subito un trapianto autologo di midollo osseo per una precedente neoplasia

ematologica; queste condizioni sono note per essere determinanti di un accorciamento telomerico.

- Il secondo individuo possedeva la variante fondatrice *ACD*, il quale, nonostante presentasse una lunghezza telomerica inferiore al 90° percentile, aveva un parente di primo grado che possedeva una lunghezza telomerica maggiore al 99° percentile, proponendo l'ipotesi di una possibile co-segregazione delle alterazioni telomeriche con la variante.
- L'ottavo probando presentava la variante *TERF2IP* c.650C>A (p.Pro217Gln) e una lunghezza telomerica inferiore al 90° percentile, senza altre caratteristiche a supporto della variante identificata; dal momento che non si possedevano evidenze convincenti, questa mutazione è stata catalogata come variante di significato incerto.

Al fine di effettuare ulteriori studi sulla co-segregazione delle varianti genetiche con la lunghezza telomerica, sono stati reclutati altri quattro individui provenienti da tre famiglie: i quattro soggetti risultavano tutti portatori delle stesse varianti dei rispettivi probandi e avevano una lunghezza maggiore al 99° percentile, sostenendo l'ipotesi che si tratti di una trasmissione genetica dominante nella regolazione telomerica; infatti la probabilità che questa situazione si verifichi per caso è estremamente bassa, inferiore all' $1 \cdot 10^{-8}$.

Questi risultati supportano la presenza di una sindrome autosomica dominante, che predisponga all'insorgenza di neoplasie, tra le quali figura anche il carcinoma papillare tiroideo.

Varianti identificate nella coorte 2

Per confermare che le varianti identificate nei geni *POT1*, *TINF2* e *ACD* nei probandi fossero generalizzabili anche ad altri individui affetti da PTC con un contesto clinico più eterogeneo, le analisi sono state estese anche a una seconda coorte di soggetti, costituita da 270 individui selezionati senza criteri relativi al *background* familiare e alla presenza di tumori multipli. All'interno di questa seconda coorte, il 2,5% di individui presentava caratteri clinici di PTC familiare. Sono stati identificati quattro individui (1,5%) portatori di varianti rare potenzialmente patogenetiche, ma assenti nei database gnomAD e caratterizzate tutte da punteggi elevati di patogenicità, suggerendo dunque una contribuzione nella suscettibilità tumorale (figura 3):

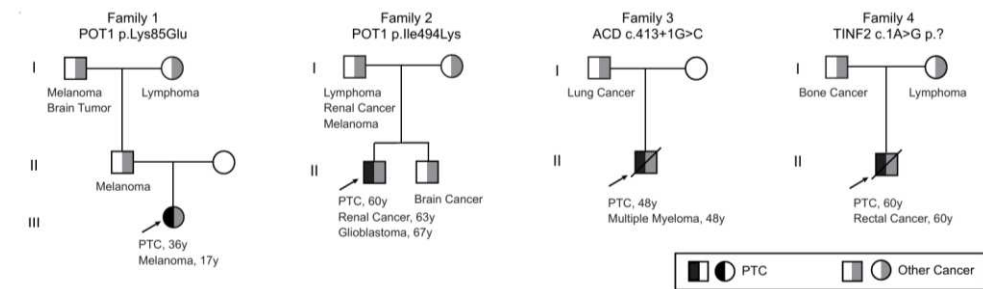


Figura 3: Alberi genealogici di alcuni individui appartenenti alla coorte 2

- Sono state identificate due varianti nel gene *POT1*, una delle quali missenso e localizzata in p.Lys85, un residuo altamente conservato, noto per essere mutato a livello somatico in molte neoplasie;
- La variante identificata in *TINF2* è responsabile di un'alterazione nel codone di inizio della traduzione, potendo compromettere la sintesi della proteina;
- La variante identificata in *ACD* è responsabile dell'alterazione del sito di splicing nel punto +1.

Oltre al PTC, tutti e quattro gli individui presentavano altre neoplasie, tra cui melanoma, carcinoma renale a cellule chiare, glioblastoma e mieloma multiplo, e avevano storie familiari compatibili con una trasmissione autosomica dominante, supportando l'ipotesi di una predisposizione ereditaria al cancro.

Ulteriori soggetti affetti da PTC presenti nella coorte 2 mostravano varianti potenzialmente rilevanti, ma non possedevano i criteri di filtraggio.

Concomitanza con altre neoplasie

Dal momento che è emerso che i soggetti affetti da PTC e portatori di varianti germinali responsabili di un allungamento anomalo dei telomeri sono predisposti allo sviluppo di neoplasie concomitanti, sono stati analizzati 22 individui, estratti da entrambe le coorti, portatori di varianti patogeniche definite, che rientravano tra i criteri di selezione, e di telomeri ultra-lunghi, al fine di valutare la loro storia oncologica.

L'età media risultante equivale a 64 anni, mentre l'età media di diagnosi del PTC (tutti multifocali) equivale a 48 anni, in un intervallo compreso tra 28 e 86 anni.

Inoltre, il 78% degli individui analizzati sono di sesso maschile, in netto contrasto con la nota dominanza femminile del PTC sporadico; questa differenza, tuttavia, non risulta essere statisticamente significativa e potrebbe essere dovuta a dei criteri di selezione.

Un dato molto interessante che è emerso da questo studio è che la maggioranza dei soggetti (83%) erano affetti anche da una seconda neoplasia: negli 8 casi di decesso documentato, la causa del decesso era sempre determinata dal cancro e in sei casi su otto non era determinato da PTC.

Il melanoma risulta essere il secondo tumore più comune (9 casi su 22).

La combinazione PTC e melanoma, diagnosticati di rado contemporaneamente, ma quasi sempre in momenti distinti, facilita l'identificazione di una variante germinale patogena associata alla presenza di telomeri lunghi. Inoltre, i parenti di primo grado dei probandi presentavano spesso melanoma, favorendo l'associazione di una sindrome predisponente familiare riconoscibile.

I tumori diversi dal melanoma più comuni erano quelli ematologici (23%, 5 casi su 22), in particolare associati alle cellule B, come mieloma multiplo (2 casi), leucemia linfatica cronica (un caso), linfoma follicolare (un caso). Inoltre, è stata diagnosticata anche la presenza di neoplasie benigne di diverso tipo, tra cui il gozzo multinodulare, emangioma, lipoma e polipi multipli in colon e cistifellea.

Anticipazione genetica

La lunghezza telomerica è una componente altamente ereditabile, motivo per cui è un fattore determinante la lunghezza telomerica posseduta dai genitori. Nel caso di malattie autosomiche dominanti da telomeri corti, l'accorciamento telomerico è sempre più evidente con il passare delle generazioni, dal momento che questo fenomeno si verifica nella linea germinale. Dunque, dato che la lunghezza dei telomeri è geneticamente ereditabile, la prole non eredita solo la mutazione patogenica associata alla predisposizione tumorale, ma anche una lunghezza telomerica definita. In particolar modo, questo fenomeno è tanto più evidente quanto più il genitore portatore sia di sesso maschile, dal momento che, nei mammiferi, la linea germinale maschile ha un'elevata attività replicativa rispetto alla linea femminile: gli spermatozoi derivano da cellule in continua divisione durante la vita dell'individuo, mentre gli ovociti sono sottoposti a un numero limitato di divisioni, favorendo una trasmissione più variabile o lunga dal padre rispetto a quella dalla madre.

È importante non confondere questo meccanismo con l'elevata incidenza della malattia tipica delle donne rispetto agli uomini, dal momento che l'anticipazione genetica consiste nella comparsa più precoce e fenotipicamente più grave della malattia nel corso delle generazioni, e non a una maggiore frequenza della malattia in un sesso specifico.

La trasmissione della mutazione da parte del padre potrebbe favorire la comparsa di un fenotipo più precoce e/o più grave rispetto alla trasmissione dalla madre, ma questo non significa che i maschi abbiano una maggiore trasmissibilità, dal momento che i geni coinvolti sono autosomici e trasmessi con la stessa probabilità in entrambi i sessi; tuttavia, può essere segnale di una diversa espressione clinica, poiché nella trasmissione paterna ci si potrebbe aspettare una maggiore anticipazione.

Nello studio in esame, sono state esaminate le lunghezze telomeriche e i fenotipi tumorali in tre coppie genitore-figlio, riscontrando un'insorgenza più precoce e un numero maggiore di tumori in due famiglie con varianti *POT1* e *ACD*:

- La famiglia con variante *POT1* c.121A>G (p.Thr41Ala) presenta un probando con PTC, melanoma e carcinoma renale diagnosticati entro i 46 anni, mentre il padre di 71 anni ha sviluppato melanoma e adenoma ipofisario solo dopo i 60 anni;
- La famiglia con variante *ACD* c.488A>G (p.Asn163Ser) ha un probando che ha sviluppato osteosarcoma già a 14 anni, mentre al padre di 74 anni sono stati diagnosticati PTC e carcinoma neuroendocrino alla cavità orale solo dopo i 67 anni;
- La terza famiglia ha variante *POT1* (p.Gln358Ser*13), ma all'età di 23 anni non sono ancora sorti tumori nella prole.

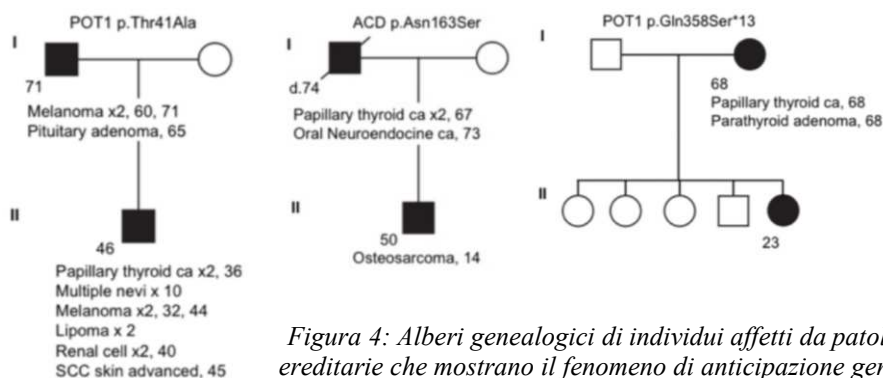


Figura 4: Alberi genealogici di individui affetti da patologie ereditarie che mostrano il fenomeno di anticipazione genetica

Queste famiglie supportano l'ipotesi che l'anticipazione genetica sia indipendente dal gene coinvolto e possa manifestarsi in fenotipi tumorali diversi, anche nella stessa famiglia.

Per comprendere se l'anticipazione genetica fosse effettivamente determinata dalla lunghezza telomerica, sono state confrontate le lunghezze dei telomeri nelle generazioni e in tutti e tre i casi i figli avevano telomeri più lunghi rispetto ai genitori, con un allungamento di +1,4 kb e +1,8 kb nei figli di padri portatori e di +0,9 kb nel figlio di madre portatrice. Questa maggiore lunghezza telomerica nei figli non era solo dovuta al fatto che erano più giovani, ma era anche eccessivamente lunga per la loro età.

Tuttavia, queste osservazioni continuano a rimanere delle ipotesi, in quanto sono state analizzate in pochi individui e si richiede una coorte più ampia per vedere se sono anche influenzate dalla natura della variante, ma rafforzerebbero l'ipotesi che il sesso del genitore di origine e la lunghezza telomerica ereditata influenzino l'espressione clinica e l'anticipazione del fenotipo tumorale nelle sindromi da telomero lungo.

Telomerasi e varianti genetiche

Da questo studio, è emerso un allungamento della lunghezza media dei telomeri, anche se risulta ben noto che la senescenza cellulare, vale a dire l'invecchiamento e la perdita di capacità proliferativa delle cellule, sia *in vivo* sia *in vitro*, è determinata dalla presenza di telomeri più corti, in quanto attivano la risposta al danno del DNA.

Al fine di comprendere meglio questa situazione, gli autori hanno valutato se le varianti germinali responsabili dell'allungamento dei telomeri facessero effettivamente svolgere questo processo in modo ordinato o casuale e se fossero responsabili di un cambiamento d'azione della telomerasi nei confronti dei telomeri più corti.

Per poter supportare queste analisi, si sono basati sull'analisi Q-FISH, attraverso la quale è stato possibile misurare la lunghezza dei telomeri su cromosomi in metafase dei linfociti, trattati *in vitro* e provenienti da due coppie genitore-figlio. Come emergeva anche nelle analisi di citometria a flusso, anche qui si è potuto notare che lunghezza media dei telomeri, sia di quelli già lunghi sia di quelli corti,

era destinata ad aumentare con il passare delle generazioni. Inoltre, la distribuzione delle lunghezze era omogenea e non casuale o bimodale, facendo supporre che i meccanismi di regolazione e di omeostasi della telomerasi sono ancora perfettamente funzionanti.

Pertanto, le varianti in eterozigosi di *POT1*, e molto probabilmente anche quelle presenti negli altri geni associati alla malattia, rendono la telomerasi più attiva, ma i meccanismi che determinano quanto e dove questo enzima deve agire rimangono inalterati, impedendole un'azione casuale: agirà sempre allungando prima i telomeri più corti, al fine di evitare l'invecchiamento o il blocco della cellula.

Mantenimento dei telomeri

L'immortalità dei tumori è determinata dall'acquisizione di meccanismi somatici di mantenimento della lunghezza dei telomeri, che altrimenti sarebbero destinati ad accorciarsi, provocando la morte cellulare. Nei tumori tiroidei, le uniche varianti *gain of function* note responsabili di questo mantenimento sono quelle presenti nel promotore del gene *TERT* (*TERTp*), le quali compaiono nel 15%-40% dei tumori, in particolare nei carcinomi tiroidei non differenziati e la probabilità di trovarle cresce con l'età e potrebbe essere più frequente negli individui di sesso maschile.

In questo studio, i ricercatori hanno studiato il panorama somatico di uno specifico sottogruppo del PTC associato a telomeri lunghi, studiando 439 geni, noti per essere *driver* somatici del PTC in 10 tumori (in 9 maschi e in 1 femmina) provenienti da 10 famiglie non imparentate. Da questa analisi è emerso che:

- Tutti e dieci i tumori (100% dei casi) avevano una sola variante *driver*, quale *BRAF* c.1799T>A (p.Val600Glu), che è una variante oncogenica nota.
- Nessun tumore (0%) aveva mutazioni *driver* in altri geni in *TP53*, *ATM*, *RET*, né nei geni di riparazione degli errori di appaiamento (MMR) o in altri geni del pathway RAS.
- Nessun tumore (0%) aveva mutazioni nel promotore del gene *TERT*, né sono state rilevate mutazioni in altri geni noti per il mantenimento dei telomeri, tra cui *POT1* o altri geni coinvolti nell'allungamento alternativo dei telomeri.

I dati emersi da questo studio supportano l'ipotesi che, se esiste una mutazione germinale responsabile di mantenere i telomeri lunghi, non è necessario avere un meccanismo somatico di mantenimento dei telomeri (come le mutazioni di *TERTp*): se una persona nasce già con telomeri ultra-lunghi, a causa di una mutazione ereditaria, il tumore non necessita di avere dei meccanismi per mantenerli lunghi. Questa condizione ha delle implicazioni importanti, in quanto basterà una sola mutazione *driver* per avere una neoplasia (dunque, viene abbassata la soglia per diventare maligno); inoltre, viene favorita la sopravvivenza delle cellule tumorali, avendo così più tempo a disposizione per accumulare mutazioni oncogeniche somatiche, con possibili variazioni sulla rapidità di progressione e sull'aggressività della neoplasia.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dall'analisi delle metodologie impiegate e dei risultati ottenuti, si possono riscontrare dei punti di forza interessanti, pur con la presenza di alcuni limiti che consentono di effettuare degli ulteriori studi per consolidare le ipotesi presentate.

Uno dei limiti che può emergere da questo articolo deriva dal fatto che lo studio è mirato sull'analisi dei cinque geni specifici, ma questi potrebbero essere in sinergia con altri geni. Dunque, il problema risiede nel fatto che non ci si sia posti il dubbio se fossero presenti solo quelle varianti nei geni analizzati o se ce ne fossero anche in altri geni responsabili della regolazione dei telomeri. Pertanto, lo studio può essere proseguito indagando quali mutazioni con lo stesso pattern di segregazione potrebbero esserci in altri geni non considerati in questa analisi. L'ipotesi proposta continua infatti ad essere interessante, ma è limitante perché la selezione delle mutazioni riguarda solo un numero ristretto di geni rispetto a tutti quelli presenti in tutto il genoma.

Un aspetto che inevitabilmente deve essere tenuto in considerazione per ulteriori approfondimenti riguarda la completezza degli alberi genealogici, le cui immagini sono riportate a pagina 12 e 13. In quasi tutti gli alberi, la trasmissione parentale è brevemente documentata, mostrando solo il passaggio tra genitori e figli, ma se queste mutazioni hanno realmente un effetto forte, ci si dovrebbe aspettare una segregazione familiare altrettanto evidente.

Un esempio significativo è visibile nella variante p.Gln358Serfs*13 del gene *POT1*, in cui due probandi non imparentati (appartenenti alla famiglia 2 e 3) sono in possesso della stessa tipologia di variante e condividono lo stesso aplotipo, suggerendo un possibile legame genetico.

Un altro esempio è riscontrabile nella famiglia 5, in cui è presente una mutazione *frameshift* ad alto impatto in un soggetto con due tumori, ma non si hanno informazioni genetiche riguardo ai genitori, che sono entrambi vivi e sani, e quindi studiabili, impedendo così lo studio sull'origine ereditaria di quella variante.

Inoltre, l'assenza di eventuali fratelli o parenti peggiora ulteriormente le analisi, in quanto la presenza-assenza di tumori in altri individui figli di quella coppia comporterebbe un cambiamento nel peso dell'evidenza di questa situazione.

Dunque, pur mostrando segni di segregazione, la maggior parte degli alberi genealogici risultano troppo ridotti per permettere di confermare la trasmissione delle varianti, limitando le conclusioni che si possono trarre da questo studio e lasciando aperti dubbi sull'effettiva ereditabilità delle mutazioni osservate.

Tuttavia, nonostante la mancanza di conoscenze sulla storia familiare di questi individui possa risultare un possibile limite ai fini di questo studio, il numero di famiglie portatrici di varianti nei geni analizzati è elevato rispetto a quanto riportato in studi precedenti. Questa situazione anomala potrebbe essere il

risultato di un *bias* di selezione, forzando il quadro risultante. È importante ricordare che queste famiglie hanno richiesto un ampio periodo di raccolta dati, dalla durata di vent'anni (1999-2019) e, che, nonostante la rarità, i dati ottenuti risultano essere coerenti, dal momento che in tutti i casi i soggetti portatori sono caratterizzati dalla presenza di telomeri ultra-lunghi. Questo dato, associato alla presenza di mutazioni diverse nello stesso gene, in famiglie differenti, risulta essere interessante per i genetisti.

Rimane tuttavia difficile riuscire a stimare quante situazioni possano spiegare dei casi analoghi a causa della rarità e della specificità delle famiglie studiate.

Questo studio presenta un limite importante: nella maggior parte degli argomenti trattati si parla di ipotesi e spunti interessanti, ma che necessitano di ulteriori verifiche sperimentali e approfondimenti su altri individui prima di poter trarre conclusioni definitive, lasciando il tema ancora aperto.

Si tratta tuttavia di un articolo pubblicato su una rivista di altissimo livello, quale "*The American Journal of Human Genetics*", confermandone l'importanza in termini di novità e di robustezza di alcuni esperimenti trattati.

In conclusione, la storia clinica familiare presente negli individui affetti da PTC svolge un ruolo importante al fine di identificare varianti germinali nei geni telomerici e stimarne il rischio e di effettuare degli screening preventivi nei confronti di altre neoplasie, a causa della variabilità fenotipica e dell'ampia gamma di organi coinvolti. Inoltre, la possibile presenza di anticipazione genetica complica l'analisi consulenziale, rendendo essenziali la presenza di ulteriori dati per comprendere il quadro clinico del paziente. Per questi motivi, dovrebbero essere attivate delle consulenze genetiche e test mirati per gli individui con una storia sospetta di sindromi da telomeri lunghi e si dovrebbero offrire approfondimenti diagnostici per i soggetti portatori di varianti patogeniche.

In sintesi, i dati raccolti in questo studio permettono di correlare la presenza di telomeri ultra-lunghi con l'associazione tra PTC e melanoma, sarcoma e tumori del sangue.

BIBLIOGRAFIA

1. Nose ¹, V. (2011). Familial thyroid cancer: a review. *Mod. Pathol.* 24, S19–S33.
2. Schratz, K.E., Flasch, D.A., Atik, C.C., Cosner, Z.L., Blackford, A.L., Yang, W., Gable, D.L., Vellanki, P.J., Xiang, Z., Gaysinskaya, V., et al. (2023). T cell immune deficiency rather than chromosome instability predisposes patients with short telomere syndromes to squamous cancers. *Cancer Cell* 41,807–817.e6.
3. DeBoy, E.A., Tassia, M.G., Schratz, K.E., Yan, S.M., Cosner, Z.L., McNally, E.J., Gable, D.L., Xiang, Z., Lombard, D.B., Antonarakis, E.S., et al. (2023). Familial Clonal Hematopoiesis in a Long Telomere Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 388, 2422–2433.
4. He, H., Li, W., Comiskey, D.F., Jr., Liyanarachchi, S., Nieminen, T.T., Wang, Y., DeLap, K.E., Brock, P., and de la Chapelle, A. (2020). A truncating germline mutation of TINF2 in individuals with thyroid cancer or melanoma results in longer telomeres. *Thyroid* 30, 204–213.
5. McNally, E.J., Luncsford, P.J., and Armanios, M. (2019). Long telomeres and cancer risk: the price of cellular immortality. *J. Clin. Invest.* 129, 3474–3481.
6. Feldser, D.M., and Greider, C.W. (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* 11, 461–469.

Telomere-lengthening germline variants predispose to a syndromic papillary thyroid cancer subtype

Authors

Emily A. DeBoy, Anna M. Nicosia,
Sandya Liyanarachchi, ..., Matthew D. Ringel,
Pamela Brock, Mary Armanios

Correspondence

marmani1@jhmi.edu

DeBoy et al. identify telomere-lengthening variants in genes encoding three telomere-binding proteins as monogenic risk factors for papillary thyroid cancers, the most common of endocrine malignancies. Eighty-three percent of individuals had second cancers, of which melanoma, sarcoma, and lymphoid malignancies were most common.



Telomere-lengthening germline variants predispose to a syndromic papillary thyroid cancer subtype

Emily A. DeBoy,^{1,4,5} Anna M. Nicosia,^{1,5} Sandya Liyanarachchi,⁷ Sheila S. Iyer,^{1,5} Manisha H. Shah,^{8,9} Matthew D. Ringel,^{7,8,9} Pamela Brock,^{8,9} and Mary Armanios^{1,2,3,5,6,*}

Summary

Papillary thyroid cancer (PTC) is the most common endocrine malignancy. 10% to 15% of individuals show familial clustering with three or more affected members, but the factors underlying this risk are unknown. In a group of recently studied individuals with *POT1* pathogenic variants and ultra-long telomere length, PTC was the second most common solid tumor. We tested whether variants in *POT1* and four other telomere-maintenance genes associated with familial cancer underlie PTC susceptibility. Among 470 individuals, we identified pathogenic or likely pathogenic variants in three genes encoding telomere-binding proteins: *POT1*, *TINF2*, and *ACD*. They were found in 4.5% and 1.5% of familial and unselected cases, respectively. Individuals harboring these variants had ultra-long telomere length, and 15 of 18 (83%) developed other cancers, of which melanoma, lymphoma, and sarcoma were most common. Among individuals with PTC and melanoma, 22% carried a deleterious germline variant, suggesting that a long telomere syndrome might be clinically recognizable. Successive generations had longer telomere length than their parents and, at times, developed more cancers at younger ages. Tumor sequencing identified a single oncogenic driver, BRAF p.Val600Glu, in 10 of 10 tumors studied, but no telomere-maintenance mechanism, including at the *TERT* promoter. These data identify a syndromic subset of PTCs with locus heterogeneity and telomere lengthening as a convergent mechanism. They suggest these germline variants lower the threshold to cancer by obviating the need for an acquired telomere-maintenance mechanism in addition to sustaining the longevity of oncogenic mutations.

Introduction

Papillary thyroid cancer (PTC [MIM: 188550]) is the most common of endocrine malignancies; it accounts for 90% of thyroid tumors and is among the top 10 cancers diagnosed in women. In contrast to medullary thyroid cancer (MTC [MIM: 1552401], which derives from calcitonin-producing parafollicular cells, PTC and the related well-differentiated follicular thyroid cancer arise from epithelial cells that line thyroid follicles and produce thyroid hormone.¹ Early-stage PTC has favorable outcomes; five-year post-resection survival nears 95%. However, 10-year recurrence with advanced-stage disease is near 50%, and there is a risk for metastasis to the lung, bones, and brain. PTC has a well-documented familial clustering in 10%–15% of cases. Although its inheritance shows autosomal-dominant patterns,¹ efforts to identify risk alleles through linkage- and exome-based studies have been elusive. And unlike in medullary thyroid cancers, where rare variants in a single proto-oncogene, *RET* [MIM: 147661], underlie the heritability in nearly 100% of familial cases,^{2,3} the genetic basis underlying familial PTC remains unknown.^{4–7}

Several pieces of evidence suggest that telomere pathways are linked to the risk for thyroid cancer. Although the effect was initially interpreted as being related to short telomeres,⁸ contemporary analyses point to longer telomere length as the likely culprit. In a recently published report on a 20-year experience with individuals with short telomere syndromes, fewer age-related malignancies, including PTC, than predicted were documented,⁹ supporting a protective role for short telomere length. In contrast, among 17 individuals with heterozygous loss-of-function variants in the gene encoding the single-strand telomere-binding protein *POT1* and ultra-long telomere length, PTC was the second most common solid tumor.¹⁰ Individuals with pathogenic *POT1* [MIM: 6064781] variants showed some cosmetic features of delayed aging (such as a later onset of hair graying), were more likely to maintain their telomere length with age, and were prone to multiple cancers, including melanoma.¹⁰ This long-telomere-driven, cancer-prone state has been studied in hematopoietic progenitors, and it derives from an extended cellular longevity, bypass of cellular senescence, and accumulation of somatic variants, including those in proto-oncogenes such as *JAK2* [MIM: 147796].¹⁰ He et al. were first

¹Department of Oncology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ²Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ³Department of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ⁴Medical Scientist Training Program, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ⁵Telomere Center at Johns Hopkins, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ⁶Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ⁷Department of Molecular Medicine and Therapeutics, Columbus, OH, USA; ⁸Department of Internal Medicine, Columbus, OH, USA; ⁹The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA

*Correspondence: marmani1@jhmi.edu

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2024.04.006>

© 2024 American Society of Human Genetics.



to identify a single family having autosomal-dominant PTC and carrying a truncating mutation in *TINF2* [MIM: 604319], a gene that encodes the telomere-binding protein TIN2.¹¹ Haploinsufficiency of *POT1* and *TINF2* promotes telomere lengthening,^{10,12,13} and here we tested the hypothesis that rare variants in *POT1*, *TINF2*, and three other telomere-maintenance genes associated with familial cancer¹⁴ explain monogenic susceptibility to PTC, and if such variants were present, we aimed to understand the significance for patient care.

Subjects and methods

Subjects

We studied the prevalence of germline variants in five candidate telomere genes in two Ohio State University (OSU)-based cohorts recruited from 1999–2019. Cohort 1 was selected from subjects recruited to the OSU Endocrine Neoplasia Repository and a few participants from a familial PTC study.¹⁵ To test the hypothesis that germline variants in telomere maintenance genes are enriched in individuals with inherited predisposition and features of long telomere syndrome, we selected the first 200 participants who fulfilled these criteria in order of priority: (1) PTC subjects with history of “melanoma” or “nevi”; (2) PTC co-occurring with “leukemia” or “lymphoma”; (3) familial PTC (defined as instances involving three or more affected individuals); (4) males with PTC diagnosed prior to age 40; and (5) participants with multifocal PTC. [Table S1](#) summarizes the clinical characteristics. Cohort 2 was queried as validation of the three telomere genes identified in cohort 1. It comprised 270 unselected PTC subjects who had available blood-derived exome data. Cohort 2 clinical characteristics are shown in [Table S2](#). Data supporting the clinical diagnoses were all extracted from primary medical records and were reviewed by two authors (P.B. and M.A.). The study was approved by the Ohio State University and Johns Hopkins Medicine institutional review boards, and all the subjects gave written informed consent.

Targeted germline sequencing (cohort 1)

We extracted genomic DNA from peripheral blood by using standard methods. For cohort 1, we designed a customized panel targeting the five candidate telomere genes (Twist): *TERT* promoter (chr5:1,295,162–1,295,900 [MIM: 1872701]), *ACD* (encodes TPP1 [GenBank: NM_001082486], [MIM: 609377]), *POT1* (GenBank: NM_015450), *TERF2IP* (GenBank: NM_018975 [MIM: 605061]), and *TINF2* (GenBank: NM_001099274). Libraries were prepared from 50 ng of genomic DNA, and paired-end sequencing was performed on MiSeq v.2 (250 bp). Reads were aligned to GRCh37 with decoy via *bwa mem* (v.0.7.15). Mean targeted coverage was 95× (range 57–154). Because the *TERT* promoter coverage was poor in the next-generation sequencing data, we performed PCR amplification and Sanger sequencing separately by using published primers,¹⁶ and we analyzed sequences in SnapGene. We used GATK (v.3.7) to perform variant calling for the next-generation sequencing data. Annotation and filtering were performed with *bcftools* and ANNOVAR (v.4162018). Candidate variants were verified in the proband and in related family members who were subsequently recruited by PCR amplification and Sanger sequencing.

Exome sequencing analysis

For cohort 2, we analyzed candidate genes in existing exome data that were generated on the Nimblegen v.3 platform by using Illumina HiSeq4000. Target coverage was 100×, and a minimum of 50× was required to call variants. Germline variants were called with the Haplotyper algorithm in the Sentieon App [sentieon_release_201911 (<https://www.sentieon.com/>)]. Annotation was performed with Ensembl Variant Effect Predictor,¹⁷ and variants were filtered to have variant allele frequency (VAF) of 0.3 and PHRED QUAL over 100. Candidate variants were verified manually in the Integrated Genome Viewer (v.2.13.0) and prioritized as outlined below. Variant annotation conformed to Mutalyzer v.3.0.7.¹⁸

Variant prioritization

For cohorts 1 and 2, rare nonsynonymous or splice variants (defined as having minor-allele frequency (MAF) < 0.0001 in gnomAD v.2.1.1) were considered further if they were nonsense-type variants, had a Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) (v.1.6) score¹⁹ ≥ 20, or were previously reported in families with cancer in the literature. In cohort 1, probands and family members were recruited, and telomere length greater than the 90th age-adjusted percentile as determined by flow cytometry and fluorescence *in situ* hybridization (flowFISH) was used for inclusion in the final analysis on the basis of recently published data.¹⁰ Published evidence supporting pathogenicity, including prior reports of ultra-long telomere length (greater than the 99th percentile as determined by flowFISH), was also considered. Rare candidate variants that did not fulfill these criteria were considered to be variants of uncertain significance ([Tables S4A](#) and [S4B](#) for cohorts 1 and 2, respectively).

Founder-variant analysis

To assess relatedness among individuals with rare shared variants, we examined SNP array data (Omni-1 Quad-bead chip 1.1M Illumina) that were generated as previously described.²⁰ We phased unimputed genotypes by using population data in SHAPEIT (v.2.790) with 1000 Genomes phase 3 reference data (October 2014 release).²⁰ For one known *ACD* founder familial melanoma variant, we compared the flanking SNPs to the haplotype block reported in Aoude *et al.*²¹ We analyzed relatedness between the two probands sharing a *POT1* variant by examining 1 Mb flanking regions.

Telomere-length studies

Average telomere length

Peripheral-blood average telomere length was measured by flowFISH on cryopreserved ficoll-separated cells at the Johns Hopkins Pathology Laboratory as described.²² Each individual's average telomere length was plotted relative to a clinically validated, age-adjusted nomogram.²²

Metaphase telomere-length measurement

To assess the telomere-length distribution across generations, we performed quantitative telomere FISH (Q-FISH) on metaphases generated from *in vitro* phytohemagglutinin (PHA)-stimulated cryopreserved peripheral-blood-isolated cells at Johns Hopkins Cytogenetics Laboratory. FISH was performed as described,²³ and images were captured on a Nikon ECLIPSE Ni with Intensilight C-HGFI illuminator and fluorescence excitation and emission filters with a 100× oil objective lens. DAPI and TRITC images captured at fixed exposure times were quantified with Telometer, an ImageJ plugin (available at <https://demarzolab.pathology.jhmi.edu/telometer/>),²⁴ access to which is a kind gift from Dr. Angelo DeMarzo and Dr. Alan Meeker. Data were plotted as done previously.²⁵

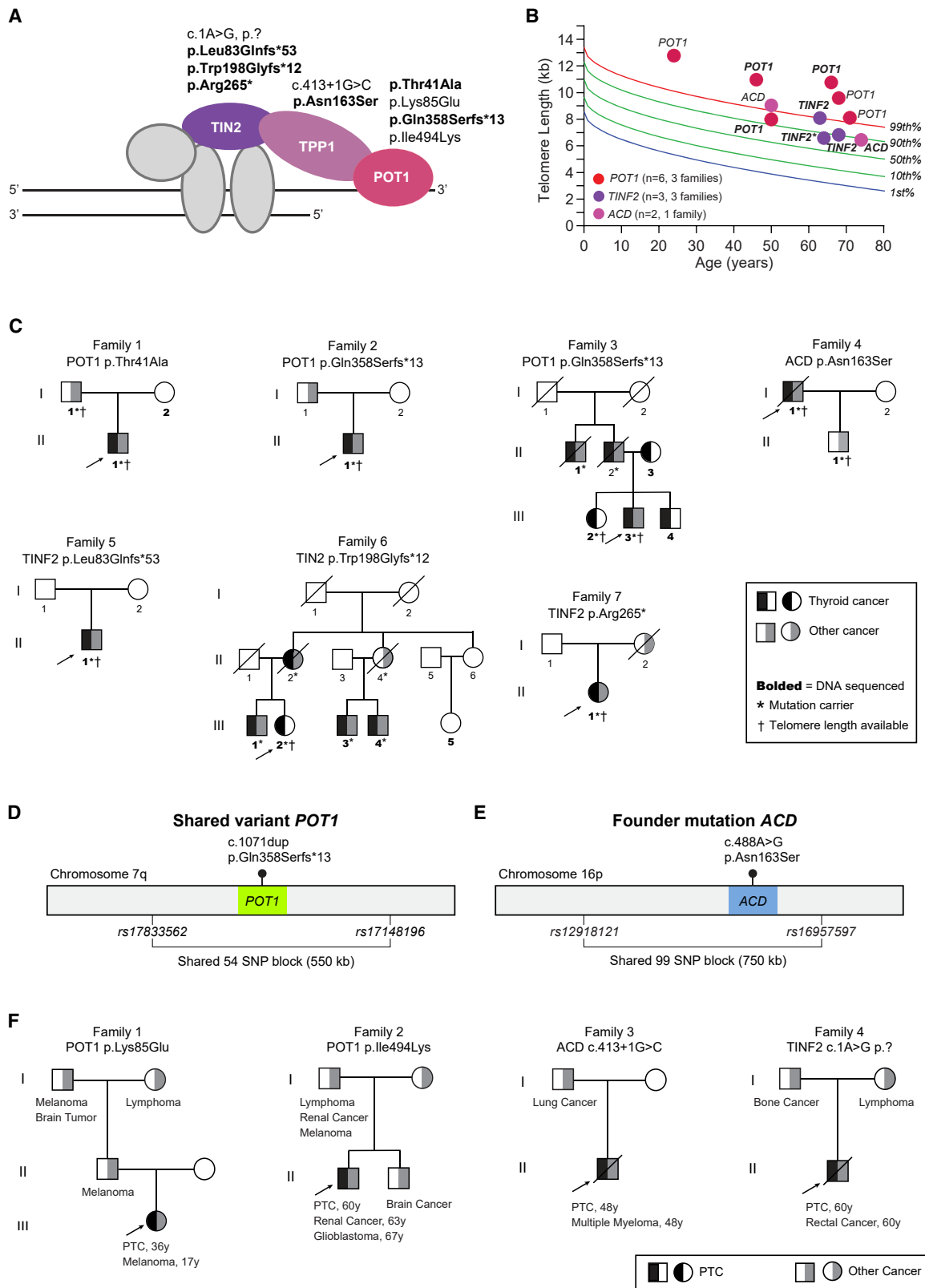


Figure 1. Telomere gene variants in PTC probands along with telomere length

(A) Scheme shows interactions of three telomere-binding proteins, TIN2, TPP1, and POT1 (encoded by *TINF2*, *ACD*, and *POT1*, respectively). Variants identified in two PTC cohorts are shown above, and cohort 1 variants ($n = 7$ unique) are in bold text.

(B) Lymphocyte telomere length is shown for the seven probands from cohort 1, alongside four of their first-degree relatives who carry the same variants. Each dot represents one individual's lymphocyte telomere length plotted relative to a clinically used nomogram; percentile lines (derived and validated in Alder *et al.*²²) are labeled. Mutant genes are noted, and probands are marked by bolded

(legend continued on next page)

Tumor sequencing

We examined the somatic landscape of tumors by using a targeted panel that included genes implicated in solid malignancies ($n = 439$, including the *TERT* promoter). Library preparation and sequencing were performed in the Johns Hopkins Genomics Lab (in two batches in 2021 and 2023). Prior to library preparation, samples were treated with NEBNext FFPE DNA repair mix (New England BioLabs) so that formalin-induced DNA damage would be minimized. Libraries were sequenced on Illumina NovaSeq with NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v.1.5. Mean depth of sequencing coverage was $473\times$ (range 128–956), and mean on-target sequencing reads with $>150\times$ coverage was 77%. FASTQ files were aligned to hg19 (GRCh37) with Burrows-Wheeler Aligner v.0.7.17. Variants were called with an in-house caller and HaplotypeCaller (GATK 3.3). Queried candidate genes included the known thyroid cancer drivers and the core *TERT* promoter, including the sites canonically altered in cancer: -124 bp (chr5:1,295,228C>T coordinate), -146 bp (chr5:1,295,250C>T), and -57 bp (chr5:1,295,161) upstream from the ATG translation start site (coordinates are for hg19).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed retrospectively, and p values (all two sided) were calculated in GraphPad Prism.

Results

A subset of individuals with PTC carry rare, deleterious germline variants in telomere-maintenance genes

We examined the sequence of candidate telomere genes (*POT1*, *TINF2*, *ACD*, and *TERF2IP*, and the *TERT* promoter [*TERTp*]), all linked to familial cancer in 200 consecutively selected individuals. These individuals represented 189 families and were selected for features that enrich for germline susceptibility. Such features included familial, multifocal, and young-onset PTC (Table S1). One-quarter had familial PTC, and a small subset had a history of melanoma (13%) or either leukemia or lymphoma (7%) (Table S1). We identified nine individuals (4.5%) from seven families with rare heterozygous pathogenic or likely pathogenic variants (Figures 1A–1C; Table S3). They were located in three genes: *POT1* ($n = 3$), *TINF2* ($n = 5$), and *ACD* ($n = 1$) (Table S3). Two unrelated probands shared the *POT1* c.1071dup (p.Glu358Serfs*13) variant and its flanking single-nucleotide polymorphisms (SNPs), suggesting a potential founder effect (Figure 1D). The other *POT1* variant encoded c.121A>G (p.Thr41Ala), which disrupts a highly

conserved residue and is defective for telomeric DNA binding *in vitro*.²⁶ The three *TINF2* variants were all truncating. *TINF2* c.248_249del (p.Leu83Glnfs*53) was not reported in gnomAD (v.2.1.1), whereas *TINF2* c.793C>T (p.Arg265*) was recently reported as a founder variant in Danish individuals with multiple primary melanoma and ultra-long telomere length,²⁷ and *TINF2* c.591del (p.Trp198Glyfs*12) was identified in three individuals who were from the same family identified by He et al.¹¹ and who all also fulfilled selection criteria. *ACD* c.488A>G (p.Asn163Ser) was also a familial melanoma founder variant described in Australian and Danish families,²¹ and the proband with PTC shared the identical haplotype block (Figure 1E).

Persons with deleterious variants have long telomere length

We recruited eight probands and measured lymphocyte telomere length by flowFISH and found that in five individuals, its length placed it in greater than the 90th age-adjusted percentile, in three individuals with telomere length above the 99th percentile (Figure 1B). For another two individuals, telomere length fell right below the 90th percentile: one carried *TINF2* c.793C>T (p.Arg265*), the recently described founder variant that is both found in familial melanoma and documented in association with ultra-long telomere length.²⁷ This individual also had a history of multiple myeloma and had undergone autologous bone-marrow transplantation for history of a hematologic malignancy, conditions known to secondarily shorten telomere length.^{28,29} The second individual carried the the founder *ACD* variant and had a first-degree relative with telomere length falling above the 99th percentile (Figure 1B). The last individual had telomere length below the 90th percentile with no other evidence of pathogenicity, and this variant (*TERF2IP* c.650C>A [p.Pro217Gln]), and others in individuals we could not assess for telomere length, were classified as variants of uncertain significance (Table S4A).

To test whether long telomere length co-segregated with the variants we prioritized, we recruited four additional individuals from three families and found that all four who shared variants identified in the probands also had long telomere length falling above the 99th percentile (the probability of this by chance alone is less than 1×10^{-8} , Figure 1B). Overall, the pedigrees were consistent with

gene name. One 65-year-old with a *TINF2* variant (marked by *) had undergone autologous bone-marrow transplantation for multiple myeloma, and her telomere length fell right below the 90th percentile.

(C) Pedigrees of probands from cohort 1 with each variant shown above. Symbols are defined in the key and distinguish individuals with PTC and other malignancies, as well as those for whom DNA sequencing and telomere length were available. Family 3 individual II.2 and family 6 individuals II.2 and II.4 are obligates for harboring the variant. Family 3 shows a non-carrier who developed PTC at age 40.

(D) Scheme of *POT1* variant shared between families 2 and 3 in panel C with flanking shared SNP block from a total 1 Mb queried.

(E) Chromosomal position of founder *ACD* missense variant identified in family 4. The associated haplotype block is shared with two familial melanoma kindreds previously identified in Australia and Denmark.²¹

(F) Personal and family cancer history of four individuals identified in cohort 2 shows multiple malignancies; age at diagnosis is noted where available. The variant identified is shown above, and the key is in the lower corner. Clinical histories for individuals in the pedigrees shown in panels C and F are further detailed in Table S5.

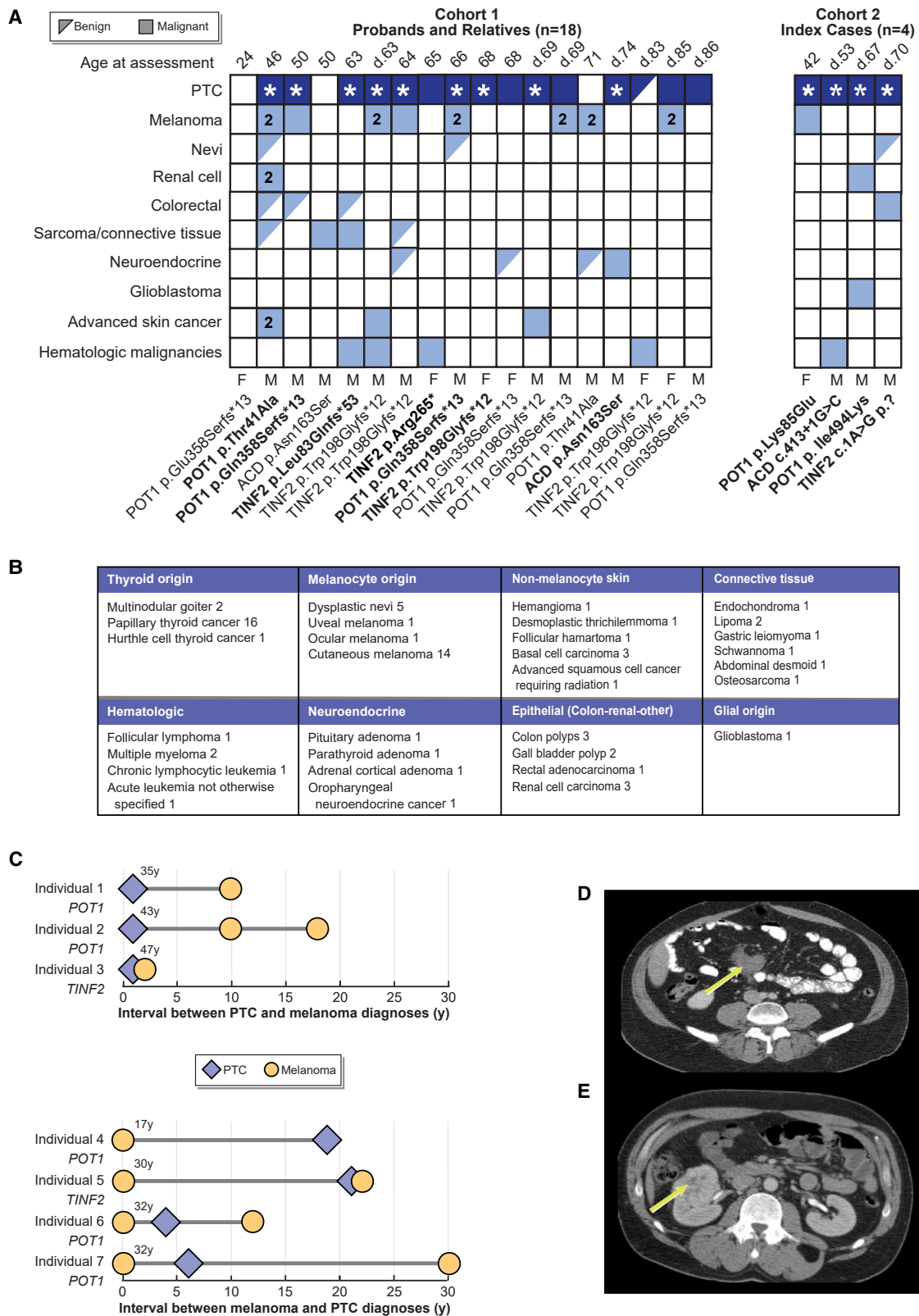


Figure 2. Clinical characteristics of PTC and co-occurring malignancies

(A) Chart shows germline variant relative to age at last assessment and cancer history in participants identified from cohorts 1 and 2. The 18 individuals in cohort 1 include seven probands and 11 of their relatives. Variants are shown below, and bolded variants denote the index case from each family. Full squares denote malignant disease, and triangles denote benign neoplasms. An asterisk denotes multifocal or bilateral PTC, and in all cases where no asterisk is shown, multifocality status is unknown. The oldest individual died at 86 from Hurthle cell cancer. M denotes males; F denotes females.

(legend continued on next page)

an autosomal-dominant, cancer-prone syndrome that showed propensity for multiple cancers including but not limited to PTC (Figures 1C and 2A).

Prevalence of telomere-lengthening variants in unselected PTC

To test whether the findings are generalizable to other individuals with PTC, we examined the prevalence of variants in *POT1*, *TINF2*, and *ACD* in a group of 270 individuals who were unselected for family history or co-occurring cancers. In this cohort, 2.5% fulfilled familial PTC criteria (clinical characteristics in Table S2). We identified four individuals (1.5%) who carried rare variants that fulfilled the pre-specified criteria of pathogenicity: *POT1* ($n = 2$), *TINF2* ($n = 1$), and *ACD* ($n = 1$) (Figures 1A and 1E). None of these variants had been reported in the gnomAD v.2.1.1 database, and all of them had high pathogenicity scores (CADD 23–34, i.e., top 0.1–1 percentile of predicted pathogenic variants, Table S3). One *POT1* missense variant altered p.Lys85, a conserved residue that is somatically mutant in many cancers, including angiosarcoma and T cell lymphoma-leukemia (Table S3B). *TINF2* c.1A>G (p.?) altered the start site, and the *ACD* variant disrupted a canonical +1 splice site (Table S3B). All four individuals had additional non-PTC malignancies, including melanoma, renal cell carcinoma, glioblastoma, and multiple myeloma (Figures 1E and 2A). Their family history also supported a familial cancer-prone syndrome; first-degree relatives were affected by melanoma and glioblastoma (Figure 1E). Other individuals with PTC in this cohort had suspicious variants, but they fell outside our strict filtering thresholds. For example, two individuals (ages 47 and 62 at PTC diagnosis), who also had second malignancies, carried *POT1* c.1127A>G (p.Gln376Arg), a variant that had been previously reported in familial chronic lymphocytic leukemia (CLL [MIM: 151400]).³⁰ Table S4 lists these and other variants that were designated as having uncertain significance.

Individuals with PTC and telomere-lengthening variants are prone to non-PTC malignancies, including melanoma and lymphoid cancers

To test whether the 22 individuals we identified with pathogenic variants have distinguishing clinical features, we examined the cancer history; the mean age was 64, and this group represented an aggregate of 1,396 person-years (Figure 2A; Table S5). Mean age at diagnosis of thyroid cancer was 48 (range 28–86 years), and remarkably, all the PTCs

with data available were multifocal (Figure 2A; Table S5). Moreover, 78% were male, a preponderance distinct from the known female dominance seen in sporadic PTC, although this enrichment was not statistically significant relative to the populations studied (relative risk 1.39 (95% CI, 0.96–1.76), $p = 0.08$, Fisher's exact test, 15 of 22 males with pathogenic or likely pathogenic variants vs. 230 of 470 males in cohorts 1 and 2 with PTC).

Nearly all the individuals we identified with PTC also had second malignancies (15 of 18, 83%). Cancer was the uniform cause of death (8 of 8 cases), and non-PTC cancers were the culprit in most cases (6 of 8, Table S5). Melanoma was the most common second cancer (9 of 22, 41%), and in 67% (6 of 9), multiple primary melanoma developed—both cutaneous and ocular (Figures 2A and 2B). The combined history of PTC and melanoma increased the likelihood of identifying a germline pathogenic long-telomere-associated variant with a relative risk of 4.54 [(95% confidence interval 1.70–11.23), $p = 0.009$, Fisher's exact test, 5 of 22 vs. 10 of 200 in cohort 1]. We examined the onset of melanoma relative to PTC and found they were often separated by years and that cases were equally divided between an initial diagnosis of PTC or melanoma, while being rarely coincident (Figure 2C). First-degree relatives of PTC probands also had melanoma, further supporting a recognizable syndromic co-occurrence (Figures 1E and 2A).

The most common non-melanoma tumors were hematologic malignancies (23%, 5 of 22 individuals). They were predominantly of B cell origin: multiple myeloma ($n = 2$), chronic lymphocytic leukemia ($n = 1$), or follicular lymphoma ($n = 1$) (Table S5). Mesenchymal tumors included osteosarcoma and abdominal desmoid (Figure 2D), epithelial tumors included rectal cancer and multifocal renal clear-cell carcinoma (Figure 2E), and there were cases in which PTC co-occurred with glioblastoma and neuroendocrine carcinoma. A range of benign neoplasms spanning tissues in addition to multinodular goiter also occurred and included hemangioma, hamartoma, lipoma, schwannoma, leiomyoma, pituitary adenoma, and multiple polyps in the colon and gallbladder (Figure 2B), consistent with the pan-neoplasia-prone state associated with long telomere length.¹⁰

Genetic anticipation of cancer diagnosis is associated with longer telomere length in offspring

Telomere length is highly heritable and influenced by parental telomere length.³¹ In the autosomal-dominant

(B) Table detailing neoplasms depicted in (A) and ordered from benign to malignant by affected tissue. Numbers refer to the number of affected individuals in (A) (of 22) with the diagnosis. Of note, (A) and (B) do not include breast or prostate cancer diagnoses, which were not queried.

(C) Swimmer plots show relative onset of PTC (purple) and melanoma (gold) diagnosis divided by preceding (top panel) or succeeding (bottom) timeline. Ages refer to the age at first diagnosis of PTC or melanoma.

(D) Computed tomography (CT) image of abdominal desmoid (marked by arrow) seen in an individual with PTC and history of follicular lymphoma. This individual carried a *TINF2* mutation, and the desmoid tumor was identified incidentally during follow-up lymphoma screening.

(E) CT image of a right-kidney tumor in an individual who had PTC and then developed hematuria. Two synchronous renal-cell carcinomas were identified at the time of nephrectomy.

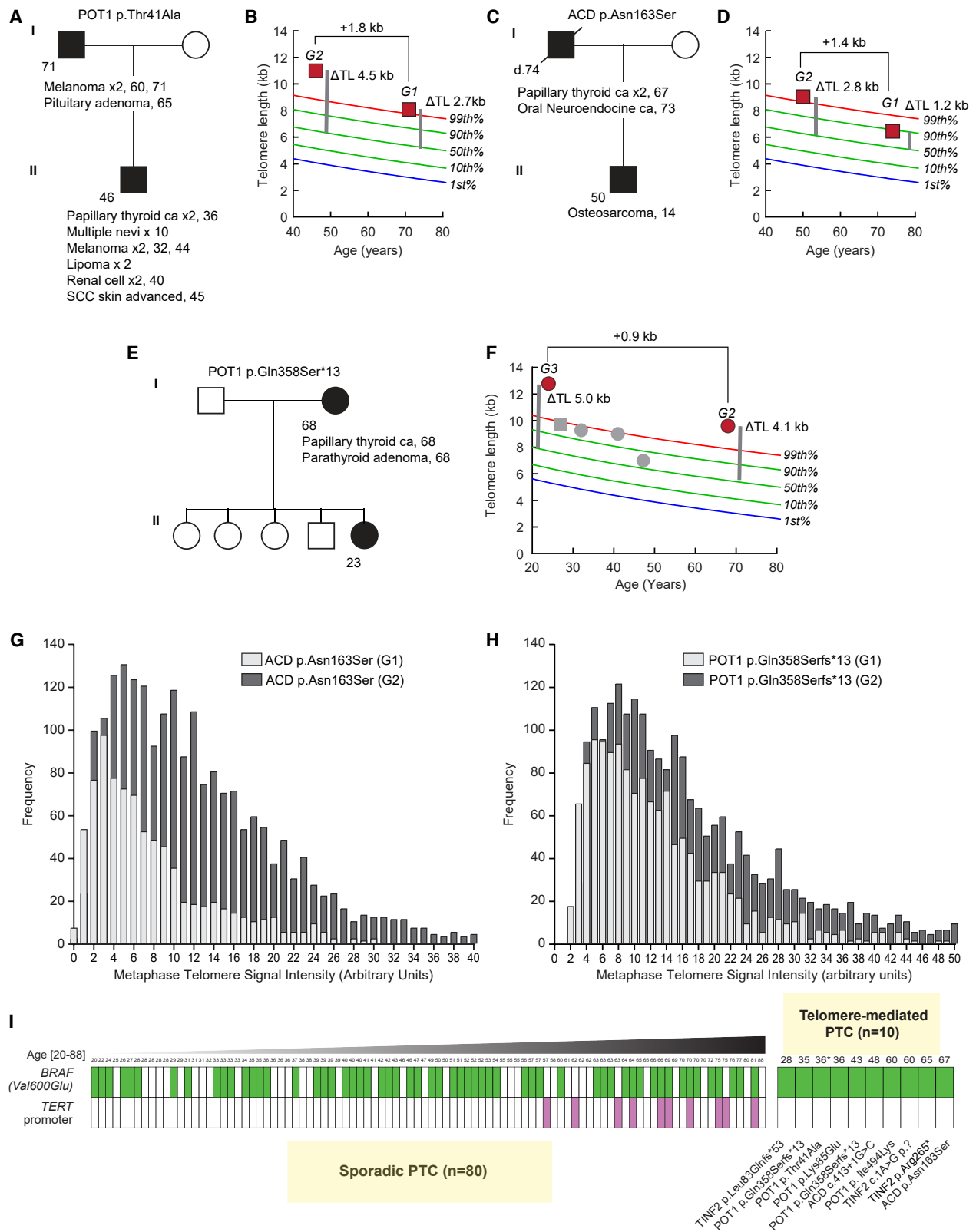


Figure 3. Genetic anticipation in three multi-generation pedigrees

(A) Pedigree of parent-offspring pair showing earlier age of onset and increased number of cancer diagnoses in the second generation; the variant gene is shown above. "x2" refers to two diagnoses; the age at detection is noted.

(B) Lymphocyte telomere length for individuals in (A) shows an increased absolute as well as delta telomere length (i.e., difference from the age-adjusted 50th percentile) in the second generation.

(C) Parent-offspring pair showing earlier age of cancer diagnosis.

(legend continued on next page)

short telomere syndromes, telomere shortening is acquired in successive generations because telomere attrition occurs in the germline.^{25,32,33} This pattern has been suggested to be more prominent when the parent of origin is male because of the highly replicative context of the male germline in mammals.³⁴ We recently reported genetic anticipation of cancer in individuals with pathogenic *POT1* variants¹⁰ but did not have access to samples from parent-child pairs where the father harbored the variant. Here we examined the telomere length and cancer phenotypes across three parent-child pairs for whom telomere length was also available and found an earlier onset and, at times, an increased number of cancers in two families with *POT1* and *ACD* variants (Figures 3A–3F). In the family with *POT1* variant c.121A>G (p.Thr41Ala), the proband developed PTC, melanoma, and renal cell cancer by age 46, and his 71-year-old father subsequently developed melanoma and a pituitary adenoma after age 60 (Figures 3A and 3B). In the family with the *ACD* c.488A>G (p.Asn163Ser) variant, a 74-year-old father developed PTC and an oral cavity neuroendocrine carcinoma after the age of 67, whereas his son developed osteosarcoma at age 14 (Figures 3C and 3D). In the third family, the offspring harboring the *POT1* variant remained unaffected at age 23 (Figure 3E). Thus, the genetic anticipation is independent of the altered gene and can manifest in discordant cancer diagnoses.

To test whether anticipation was mediated by telomere lengthening, we compared the average telomere length across generations and found it was longer in all three parent-child pairs we studied (+1.4 kb; +1.8 kb absolute gain in offspring of male parent and +0.9 kb in offspring of a female parent; Figures 3A–3F). The lengthening was not explained by the younger age at which telomere length was measured in the offspring, as they also had a larger deviation from the age-adjusted median than did their parents (i.e., larger delta telomere length in Figures 3B, 3D, and 3F). These observations need to be examined in larger groups and are most likely influenced also by the nature of the variant (i.e., hypomorphic vs. null). Nonetheless, they support the idea that the sex of the parent of origin and the inherited telomere length might be a determinant of the cancer phenotype in these long-telomere-associated syndromes.

Telomerase elongation of the shortest telomeres is preserved in the setting of telomere-lengthening variants

Our studies so far had shown an elongation of the average telomere length, but the shortest telomeres drive the senescence phenotype *in vitro* and *in vivo* because they signal the DNA damage response.^{34,36} We thus tested whether telomere-lengthening germline variants affected the preference of telomerase to elongate the shortest telomeres and whether the elongation is ordered for all telomeres or is random. We performed Q-FISH on metaphases derived from *in-vitro*-stimulated lymphocytes from two parent-child pairs. As with the flow-cytometry-based analysis, we found a longer mean telomere length in successive generations (Figures 3G and 3H). The distributions showed a shift towards higher-intensity signals for telomeres of all lengths (Figures 3G and 3H). Importantly, telomere length followed a homogeneous distribution (Figures 3G and 3H), as has been seen with telomerase expression in other settings,^{25,36} and the distribution was not bimodal or random, consistent with preservation of fundamental homeostatic mechanisms. These data support a model wherein heterozygous variants in *POT1* (and most likely in the other disease-associated shelterin-encoding genes) remove a negative regulation on telomerase elongation, but telomerase retains its preferential elongation mechanisms and its repeat addition pattern is not random.

Germline telomere maintenance obviates somatic telomere-maintenance mechanisms

Cancers maintain their immortality by acquiring somatic telomere-maintenance mechanisms, and in thyroid cancers, *TERT* gain-of-function variants are the only known mechanism, seen in up to 15%–40% of tumors with the higher prevalence noted in poorly differentiated thyroid cancers.³⁷ The prevalence of these *TERT* promoter variants is associated with increasing age and might have a higher incidence in males (TCGA data in Figure 3I).^{35,38} To assess the somatic landscape of the long-telomere-associated subset of PTC, we used a clinical pipeline to examine the sequences of 439 genes, including the known somatic drivers of PTC, in 10 tumors (9 from males and 1 from a female) from 10 unrelated families (Figure 3I). All 10 tumors (100%) had only a single driver variant at *BRAF* c.1799T>A (p.Val600Glu) (Figure 3I), a higher proportion than the

(D) Lymphocyte telomere length for individuals in (C) shows longer telomere length in the second generation.

(E) Pedigree for an affected parent and offspring. This pedigree is an extension of the one shown for family 3 (individual III.2) in Figure 1C.

(F) Telomere length for individuals who do not carry the variant in the second generation (denoted in gray) falls on the upper end of the normal range in three of four persons. For (A), (C), and (E), the shaded squares indicate individuals, and the pathogenic variant is shown above.

(G and H) Quantitative fluorescence *in situ* hybridization (FISH) from metaphases derived from peripheral-blood mononuclear cells for the parent-child pairs in (C) and (F) shows a rightward shift of mean telomere signal intensity and retrained shape of the distribution. For each individual, 12–21 metaphases were quantified.

(I) Somatic co-variant table of PTC cases relative to *BRAF* p.Val600Glu variants and *TERT* promoter variants. Data on the left are shown for males who were sequenced in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database.³⁵ On the right, a summary of the somatic-variant landscape in 10 PTCs is shown above the germline variant status. Nine of these individuals are male, and one is female.

55%–70% prevalence seen in unselected PTC cases.^{35,38} Specifically, there were no other driver variants detected in *TP53*, *ATM*, *RET*, mismatch repair, or other RAS pathway genes (Figure S1). Moreover, none of the tumors had a *TERTp* variant, and there were no variants detected in other cancer-associated telomere-maintenance genes, including *POT1* and the alternative lengthening of telomeres (ALT) genes, *ATRX* and *DAXX*. These observations raise the compelling possibility that the germline telomere-maintenance mutation lowers the threshold to malignancy by obviating a need for a somatic mechanism, in addition to supporting the longevity of somatic oncogenic mutations.

Discussion

Here we report deleterious germline variants in multiple telomere-maintenance genes as underlying the risk of a syndromic subtype of PTC. Despite the locus heterogeneity, longer telomere length is their convergent mechanism. Our thresholds for variant filtering were conservative, and further functional characterization, including by telomere length measurement, might uncover a larger proportion that is explained by the loci we identified here. Because multiple loci regulate telomere length, it is also possible that variants in other telomere-maintenance genes will contribute further to an understanding of PTC monogenic heritability.

In this genetically grouped subset of individuals with PTC, recurrent clinical patterns emerged with a high penetrance of non-PTC cancers, including melanoma and discordant cancer phenotypes, in affected relatives who carry identical germline variants. The data we report have some clinical implications. Individuals with PTC should be queried for a personal and family history of melanoma, sarcoma, and hematologic and other malignancies so that the risk of a germline telomere gene variant and yield of genetic testing can be estimated. Moreover, probands and their affected family members who carry these variants should be considered for pre-emptive screening for melanoma and other malignancies, although the precise protocols remain unclear given the variable phenotype and ubiquitous nature of involved organs. Panel testing that includes the genes we identified, *POT1*, *TINF2* and *ACD*, and possibly the two other candidates, *TERF2IP* and the *TERT* promoter, given their known convergent functional consequences, may be useful in some contexts, although additional data will be needed to determine the role of telomere length measurement in variant interpretation, as well as the utility of screening for early detection and prevention. The possibility and prevalence of genetic anticipation might also complicate genetic counseling, and additional data are needed to clarify the bedside implications of this work. At the very minimum, genetic counseling and targeted testing for individuals with suspicious history for a

long telomere syndrome should be offered, and a low threshold for evaluation should be standard for individuals who have pathogenic variants and develop localized complaints, especially with advancing age.

The data we present have implications for our understanding of the genetic basis of sporadic PTC because common SNPs that influence telomerase gene expression, including at the *TERT* and telomerase RNA (*TERC*) loci, have been identified in genome-wide association studies. These loci are associated with risk for PTC across multiple ancestries, including Chinese and European populations.^{20,39,40} The same SNPs are associated with long telomere length in addition to risk for multiple malignancies.³¹ Our discovery provides biologic insights into epidemiologic observations linking thyroid cancer with an increased risk for melanoma, lymphoma, renal cell cancer, and other cancers.⁴¹ Familial PTC has also been linked in some cases with multinodular goiter⁴² and genetic anticipation.⁴³ Our data identify long telomere length as a potentially unifying mechanism for these observations and suggest that a long telomere syndrome has clinically recognizable features, including a syndromic co-occurrence of PTC with melanoma, sarcoma, and hematologic malignancies.

The shared BRAF p.Val600Glu oncogene driver in the long-telomere PTC subset resembles the predominance of clonal JAK2 p.Val617Phe gain-of-function variants we identified in the blood of individuals with pathogenic *POT1* variants and ultra-long telomere length.¹⁰ Long telomere length supports oncogene-mediated clonal evolution in hematopoietic progenitors.¹⁰ In animal models, long telomere length is associated with worse outcomes in multiple tumor-prone mice that develop oncogene-driven cancers⁴⁴ (and reviewed in McNally *et al.*³¹). These aggregate observations support a model wherein long telomere length extends the longevity of BRAF p.Val600Glu somatic events to promote PTC evolution. Finally, the absence of somatic telomere-maintenance mechanisms in the tumors of this small PTC subset we studied raises the possibility that the germline telomere-elongating variant bypasses the need for an acquired somatic telomere-maintenance mechanism, thus lowering the threshold to malignant evolution.

Data code and availability

Pathogenic and likely pathogenic variants identified in this study are deposited in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), and a link to this study is posted in the database.

Supplemental information

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2024.04.006>.

Acknowledgments

We are grateful to all the subjects, families, and their providers. We acknowledge the late Dr. Albert de la Chapelle and his efforts at understanding the genetic basis of PTC; these efforts included the recruitment of families who participated in this study. This work was supported by The Ohio State University Comprehensive Cancer Center (OSUCCC) Biospecimen Services Shared Resource (BSSR) Biorepository and Johns Hopkins Genomics, including the Genetic Resources Core Facility, Cytogenetics Laboratory, and Molecular Diagnostics Laboratory. The Endocrine Neoplasia Repository at OSU is supported by NIH grants P50CA168505 and P01CA124570, and OSUCCC is supported by NIH grant P30CA016058. Work in the Armanios lab is supported by NIH grants R01CA25027 and R01HL119476, the Commonwealth Foundations, the Turock Scholars Fund at the Telomere Center at Johns Hopkins and a gift from the Gable Family. Emily A. DeBoy was supported by NIH grant T32GM136577. The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins is supported by NIH grant P30CA006973.

Author contributions

E.A.D. performed the cohort 1 targeted sequencing, analyzed the somatic and telomere-length data, and wrote the first draft of the manuscript with M.A. A.N. analyzed sequence data for cohort 2, prepared relevant tables, and performed the metaphase telomere analysis. S.L. analyzed sequence analyses, including for founder data, with E.A.D. S.S.I. performed variant analyses with E.A.D. and A.N. M.H.S. and M.G.R. provided clinical insights and interpreted the tumor somatic data. P.B. designed and performed the clinical cohort selection, recruited participants, and assessed the phenotype and genetic data. MA designed the study, oversaw the project, and wrote the final manuscript. All the authors reviewed and approved the manuscript.

Declaration of interests

M.A. has a pending provisional patent application on the use of telomere length to assess cancer risk.

Received: November 26, 2023

Accepted: April 11, 2024

Published: April 29, 2024

References

- Nosé, V. (2011). Familial thyroid cancer: a review. *Mod. Pathol.* *24*, S19–S33.
- Elisei, R., Romei, C., Cosci, B., Agate, L., Bottici, V., Molinaro, E., Sculli, M., Miccoli, P., Basolo, F., Grasso, L., et al. (2007). RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 4725–4729.
- Jimenez, C., and Gagel, R.F. (2004). Genetic testing in endocrinology: lessons learned from experience with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2). *Growth Horm. IGF Res.* *14*, S150–S157.
- Capezzone, M., Robenshtok, E., Cantara, S., and Castagna, M.G. (2021). Familial non-medullary thyroid cancer: a critical review. *J. Endocrinol. Invest.* *44*, 943–950.
- Tomsic, J., Fultz, R., Liyanarachchi, S., He, H., Senter, L., and de la Chapelle, A. (2016). HBP2 G534E Variant in Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS One* *11*, e0146315.
- Pereira, J.S., da Silva, J.G., Tomaz, R.A., Pinto, A.E., Bugalho, M.J., Leite, V., and Cavaco, B.M. (2015). Identification of a novel germline FOXE1 variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMT). *Endocrine* *49*, 204–214.
- He, H., Bronisz, A., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Li, W., Huang, Y., Akagi, K., Saji, M., Kula, D., Wojcicka, A., et al. (2013). SRGAP1 is a candidate gene for papillary thyroid carcinoma susceptibility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, E973–E980.
- Capezzone, M., Cantara, S., Marchisotta, S., Busonero, G., Formichi, C., Benigni, M., Capuano, S., Toti, P., Pazaitou-Panayiotou, K., Caruso, G., et al. (2011). Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with familial and sporadic papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E1852–E1856.
- Schratz, K.E., Flasch, D.A., Atik, C.C., Cosner, Z.L., Blackford, A.L., Yang, W., Gable, D.L., Vellanki, P.J., Xiang, Z., Gaysinskaya, V., et al. (2023). T cell immune deficiency rather than chromosome instability predisposes patients with short telomere syndromes to squamous cancers. *Cancer Cell* *41*, 807–817.e6.
- DeBoy, E.A., Tassia, M.G., Schratz, K.E., Yan, S.M., Cosner, Z.L., McNally, E.J., Gable, D.L., Xiang, Z., Lombard, D.B., Antonarakis, E.S., et al. (2023). Familial Clonal Hematopoiesis in a Long Telomere Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *388*, 2422–2433.
- He, H., Li, W., Comiskey, D.F., Jr., Liyanarachchi, S., Nieminen, T.T., Wang, Y., DeLap, K.E., Brock, P., and de la Chapelle, A. (2020). A truncating germline mutation of TINF2 in individuals with thyroid cancer or melanoma results in longer telomeres. *Thyroid* *30*, 204–213.
- Schmutz, I., Mensenkamp, A.R., Takai, K.K., Haadsma, M., Spruijt, L., de Voer, R.M., Choo, S.S., Lorbeer, F.K., van Grinsven, E.J., Hockemeyer, D., et al. (2020). TINF2 is a haploinsufficient tumor suppressor that limits telomere length. *Elife* *9*, e61235.
- Kim, W.T., Hennick, K., Johnson, J., Finnerty, B., Choo, S., Short, S.B., Drubin, C., Forster, R., McMaster, M.L., and Hockemeyer, D. (2021). Cancer-associated POT1 mutations lead to telomere elongation without induction of a DNA damage response. *EMBO J.* *40*, e107346.
- Armanios, M. (2022). The Role of Telomeres in Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* *23*, 363–381.
- Wang, Y., Liyanarachchi, S., Miller, K.E., Nieminen, T.T., Comiskey, D.F., Jr., Li, W., Brock, P., Symer, D.E., Akagi, K., DeLap, K.E., et al. (2019). Identification of Rare Variants Predisposing to Thyroid Cancer. *Thyroid* *29*, 946–955.
- Pierini, T., Nardelli, C., Lema Fernandez, A.G., Pierini, V., Pelanera, F., Nofrini, V., Gorello, P., Moretti, M., Arniani, S., Roti, G., et al. (2020). New somatic TERT promoter variants enhance the Telomerase activity in Glioblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* *8*, 145.
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S.E., Riat, H.S., Ritchie, G.R.S., Thormann, A., Flicek, P., and Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* *17*, 122.
- Lefter, M., Vis, J.K., Vermaat, M., den Dunnen, J.T., Taschner, P.E.M., and Laros, J.F.J. (2021). Mutalyzer 2: next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics* *37*, 2811–2817.
- Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O’Roak, B.J., Cooper, G.M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* *46*, 310–315.

20. Gudmundsson, J., Thorleifsson, G., Sigurdsson, J.K., Stefansdottir, L., Jonasson, J.G., Gudjonsson, S.A., Gudbjartsson, D.F., Masson, G., Johannsdottir, H., Halldorsson, G.H., et al. (2017). A genome-wide association study yields five novel thyroid cancer risk loci. *Nat. Commun.* *8*, 14517.
21. Aoude, L.G., Pritchard, A.L., Robles-Espinoza, C.D., Wadt, K., Harland, M., Choi, J., Gartside, M., Quesada, V., Johansson, P., Palmer, J.M., et al. (2015). Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *107*, dju408.
22. Alder, J.K., Hanumanthu, V.S., Strong, M.A., DeZern, A.E., Stanley, S.E., Takemoto, C.M., Danilova, L., Applegate, C.D., Bolton, S.G., Mohr, D.W., et al. (2018). Diagnostic utility of telomere length testing in a hospital-based setting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *115*, E2358–E2365.
23. Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.K., and Tanke, H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 685–691.
24. Meeker, A.K., Gage, W.R., Hicks, J.L., Simon, I., Coffman, J.R., Platz, E.A., March, G.E., and De Marzo, A.M. (2002). Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am. J. Pathol.* *160*, 1259–1268.
25. Armanios, M., Chen, J.L., Chang, Y.P.C., Brodsky, R.A., Hawkins, A., Griffin, C.A., Eshleman, J.R., Cohen, A.R., Chakravarti, A., Hamosh, A., and Greider, C.W. (2005). Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 15960–15964.
26. Schratz, K.E., Gaysinskaya, V., Cosner, Z.L., DeBoy, E.A., Xiang, Z., Kasch-Semenza, L., Florea, L., Shah, P.D., and Armanios, M. (2021). Somatic reversion impacts myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia evolution in the short telomere disorders. *J. Clin. Invest.* *131*, e147598.
27. Jensen, M.R., Jelsig, A.M., Gerdes, A.M., Hölmich, L.R., Kainu, K.H., Lorentzen, H.F., Hansen, M.H., Bak, M., Johansson, P.A., Hayward, N.K., et al. (2023). *TINF2* is a major susceptibility gene in Danish patients with multiple primary melanoma. *HGG Adv.* *4*, 100225.
28. Armanios, M. (2023). Familial Clonal Hematopoiesis in a Long Telomere Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *389*, 1535–1536.
29. Schratz, K.E., Haley, L., Danoff, S.K., Blackford, A.L., DeZern, A.E., Gocke, C.D., Duffield, A.S., and Armanios, M. (2020). Cancer spectrum and outcomes in the Mendelian short telomere syndromes. *Blood* *135*, 1946–1956.
30. Speedy, H.E., Kinnersley, B., Chubb, D., Broderick, P., Law, P.J., Litchfield, K., Jayne, S., Dyer, M.J.S., Dearden, C., Follows, G.A., et al. (2016). Germ line mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *128*, 2319–2326.
31. McNally, E.J., Luncsford, P.J., and Armanios, M. (2019). Long telomeres and cancer risk: the price of cellular immortality. *J. Clin. Invest.* *129*, 3474–3481.
32. Parry, E.M., Alder, J.K., Qi, X., Chen, J.J.L., and Armanios, M. (2011). Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. *Blood* *117*, 5607–5611.
33. Vulliamy, T., Marrone, A., Szydlo, R., Walne, A., Mason, P.J., and Dokal, I. (2004). Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in *TERC*. *Nat. Genet.* *36*, 447–449.
34. Armanios, M., Alder, J.K., Parry, E.M., Karim, B., Strong, M.A., and Greider, C.W. (2009). Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 823–832.
35. (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* *159*, 676–690.
36. Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., and Greider, C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* *107*, 67–77.
37. Liu, R., and Xing, M. (2016). *TERT* promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, R143–R155.
38. Li, C.H., Prokopec, S.D., Sun, R.X., Yousif, F., Schmitz, N., PCAWG Tumour Subtypes and Clinical Translation, Boutros, P.C., PCAWG Consortium, Biankin, A.V., Boutros, P.C., et al. (2020). Sex differences in oncogenic mutational processes. *Nat. Commun.* *11*, 4330.
39. Ge, M., Shi, M., An, C., Yang, W., Nie, X., Zhang, J., Lv, Z., Li, J., Zhou, L., Du, Z., and Yang, M. (2016). Functional evaluation of *TERT-CLPTM1L* genetic variants associated with susceptibility of papillary thyroid carcinoma. *Sci. Rep.* *6*, 26037.
40. Codd, V., Wang, Q., Allara, E., Musicha, C., Kaptoge, S., Stoma, S., Jiang, T., Hamby, S.E., Braund, P.S., Bountziouka, V., et al. (2021). Polygenic basis and biomedical consequences of telomere length variation. *Nat. Genet.* *53*, 1425–1433.
41. Kim, C., Bi, X., Pan, D., Chen, Y., Carling, T., Ma, S., Udelsman, R., and Zhang, Y. (2013). The risk of second cancers after diagnosis of primary thyroid cancer is elevated in thyroid microcarcinomas. *Thyroid* *23*, 575–582.
42. Liao, S., Song, W., Liu, Y., Deng, S., Liang, Y., Tang, Z., Huang, J., Dong, D., and Xu, G. (2013). Familial multinodular goiter syndrome with papillary thyroid carcinomas: mutational analysis of the associated genes in 5 cases from 1 Chinese family. *BMC Endocr. Disord.* *13*, 48.
43. Capezzone, M., Marchisotta, S., Cantara, S., Busonero, G., Brilli, L., Pazaitou-Panayiotou, K., Carli, A.F., Caruso, G., Toti, P., Capitani, S., et al. (2008). Familial non-medullary thyroid carcinoma displays the features of clinical anticipation suggestive of a distinct biological entity. *Endocr. Relat. Cancer* *15*, 1075–1081.
44. Feldser, D.M., and Greider, C.W. (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* *11*, 461–469.

The American Journal of Human Genetics, Volume 111

Supplemental information

Telomere-lengthening germline variants

predispose to a syndromic

papillary thyroid cancer subtype

Emily A. DeBoy, Anna M. Nicosia, Sandya Liyanarachchi, Sheila S. Iyer, Manisha H. Shah, Matthew D. Ringel, Pamela Brock, and Mary Armanios

Figure S1

Papillary Thyroid Cancers (n=10)												
		Age	28	35	36*	36	43	48	60	60	65	67
MAPK Pathway	<i>BRAF p.Val600Glu</i>											
	<i>HRAS, KRAS, NRAS</i>											
	<i>RET</i>											
Telomere maintenance	<i>TERT_p</i>											
	<i>POT1</i>											
	<i>ATRX, DAXX</i>											
DNA repair	<i>ATM</i>											
	<i>TP53</i>											
	<i>CHEK2</i>											
	<i>BRCA1/2</i>											
	<i>MLH1</i>											
	<i>MSH2</i>											
Tumor Mutation Burden (per Mb)			indeterminate	0.88	5.28	indeterminate	0.88	indeterminate	indeterminate	indeterminate	indeterminate	0.00
			<i>TINF2 p.Leu83Glnfs*53</i>	<i>POT1 p.Gln358Serfs*13</i>	<i>POT1 p.Thr41Ala</i>	<i>POT1 p.Gln358Serfs*13</i>	<i>POT1 p.Lys85Glu</i>	<i>ACD c.413+1G>C</i>	<i>POT1 p.Ile494Lys</i>	<i>TINF2 c.1A>G p.?</i>	<i>TINF2 p.Arg265*</i>	<i>ACD p.Asn163Ser</i>

Chart shows genes specifically examined in a solid tumor somatic panel (clinical pipeline). Ages are shown on top and below each name is the germline variant identified. The genes listed to the left have been implicated in telomere maintenance and papillary thyroid cancer biology. *TERT* promoter mutations were absent as summarized in Figure 3I. Tumor mutation burden estimates are based on analysis of the 400 genes sequenced, and where noted as indeterminate, the quality of the reads fell below the threshold of reliability for assessing single nucleotide somatic variant calls.

Table S1: Clinical characteristics of Cohort 1 subjects selected from the Ohio State University Endocrine Neoplasia Repository and Familial Papillary Thyroid Cancer (PTC) Study (recruited 1999-2019)

Characteristic	Number
Total participants with PTC	200
Number of unique families	189
Age at papillary thyroid cancer diagnosis, median (range)	39 (9-88)
Men	138
Women	62
Family history (1st or 2nd degree relatives with PTC)	
0	101
1 (2 total PTC cases in a family)	49
≥2 (3 or more PTC cases in a family)	50
Age range distribution	
<29	45
30-49	99
50-69	46
>70	10
Focality of papillary thyroid cancer	
Single focus	20
Multifocal	179
Unknown	1
Co-occurring malignancies	
PTC with melanoma (includes melanoma in situ/nevi)	27 (incl. 22)
PTC with leukemia/lymphoma	13

Table S2. Clinical characteristics of consecutively recruited subjects with papillary thyroid cancer (PTC) with existing exome data (Cohort 2, recruited 2013-2019)

Characteristic	Number
Total participants with PTC	270
Age at PTC diagnosis median (range)	45y (16-85y)
Men Women Unknown	92 177 1
Age range distribution	
<29	40
30-49	122
50-69	88
>70	20
Family history (1st or 2nd degree relatives with PTC)	
0	211
1 (2 total PTC cases in a family)	22
≥2 (3 or more PTC cases in a family)	7
Unknown	30
Focality of papillary thyroid cancer	
Single focus	115
Multifocal PTC	124
Unknown	31
PTC with melanoma (includes melanoma in situ)	9

Table S3A. Pathogenic and likely pathogenic variants identified in candidate telomere genes within Cohort 1 and their prevalence in germline control databases (gnomAD) as well as somatic tumor databases (COSMIC) (identified in 7 probands)

Gene	Genomic GRCh37/hg19 position	Coding	Protein	gnomAD v2.1.1 (MAF)	COSMIC	CADD score	Previously reported?
<i>ACD</i> NM_001082486 NP_001075955	chr16:67693137T>C	c.488A>G	p.Asn163Ser [†]	7.07 x 10 ⁻⁵	-	n/a*	Ref 1
<i>POT1</i> NM_015450 NP_056265	chr7:124482952G>GA	c.1071dup	p.Gln358Serfs*13	3.64 x 10 ⁻⁵	-	-	Ref 2
<i>POT1</i> NM_015450 NP_056265	chr7:124532323T>C	c.121A>G	p.Thr41Ala	0	-	22.3	Ref 3
<i>TINF2</i> NM_001099274 NP_001092744	chr14:24710239del	c.591del	p.Trp198Glyfs*12	0	-	-	Ref 4
<i>TINF2</i> NM_001099274 NP_001092744	chr14:24711144_24711145del	c.248_249del	p.Leu83Glnfs*53	0	-	-	-
<i>TINF2</i> NM_001099274 NP_001092744	chr14:24709893G>A	c.793C>T	p.Arg265*	0	Skin squamous cell carcinoma	Late truncation	Ref 5

Table S3B. Pathogenic and likely pathogenic variants in *POT1*, *ACD* and *TINF2* in PTC Cohort 2

Gene	Genomic GRCh38 position	Coding	Protein	gnomAD v3.1.2 (MAF)	COSMIC	CADD score	Previously reported?
<i>ACD</i> NM_001082486 NP_001075955	chr16:67659536C>G	c.413+1G>C	-	0	-	34.0	-
<i>POT1</i> NM_015450 NP_056265	chr7:124870913T>C	c.253A>G	p.Lys85Glu	0	Several cancers with p.K85N and p.K85R somatic mutations**	32.0	-
<i>POT1</i> NM_015450 NP_056265	chr7:124835303A>T	c.1481T>A	p.Ile494Lys	0	-	25.5	-
<i>TINF2</i> NM_001099274 NP_001092744	chr14:24242332T>C	c.1A>G	p.?	0***	-	23.1	-

Abbreviations: CADD, Combined Annotation-Dependent Depletion; MAF, mean allele frequency

[†]This same *ACD* variant was previously reported as Asn249Ser in Aoude et al.2015 (reference 2) due to differences in annotation.

**ACD* CADD score assessment is confounded due to alignment errors related to overlapping isoforms and is therefore noted as not applicable

**Reported as somatically altered in chronic lymphocytic leukemia, Adult T cell leukemia/lymphoma, and lung adenocarcinoma

***The same start loss is present due to SNV in different nucleotide (MAF of 6.57x10⁻⁶)

CADD scores obtained from CADD v1.6 tool with higher scores are associated with a higher probability of deleterious effect. For Single Nucleotide Variants (SNVs), the scaled scores are ranked relative to all possible substitutions of the human genome such that scores ≥20 indicate the top 1% of most deleterious possible substitutions and scores ≥30 indicate the 0.1% most deleterious. Databases accessed on November 22, 2022.

Table S4A. Rare variants of uncertain significance identified in 5 candidate telomere genes (Cohort 1)

Gene	Genomic GRCh37/hg19	Coding	Protein	gnomAD v2.1.1 (MAF)	COSMIC	CADD score	Interpretation comment
<i>ACD</i> NM_001082486 NP_001075955	chr16:67694282G>C	-	-	8.43e-6	-	16.3	In an older annotation of the long isoform this variant encodes p.Arg34Gly
<i>ACD</i> NM_001082486 NP_001075955	chr16:67692949C>A	c.527G>T	p.Arg176Leu	4.38e-5	Endometrium** Large intestine**	14.8	CADD <20
<i>POT1</i> NM_015450 NP_056265	chr7:124475396T>C	c.1442A>G	p.Glu481Gly	3.89e-5	-	22.3	Unable to recruit participant for TL measurement
<i>TERF2IP</i> NM_018975 NP_061848	chr16:75682430C>A	c.650C>A	p.Pro217Gln	3.19e-5	-	20.3	TL <90%ile in single proband
<i>TERF2IP</i> NM_018975 NP_061848	chr16:75690222A>G	c.913A>G	p.Lys305Glu	8e-6	Stomach**	14.9	CADD <20
<i>TERF2IP</i> NM_018975 NP_061848	chr16:75690258A>G	c.949A>G	p.Ile317Val	7.97e-6	Stomach**	15.5	CADD <20
<i>TINF2</i> NM_001099274 NP_001092744	chr14:24709044C>G	c.1315G>C	p.Val439Leu	3.19e-5	-	2.2	CADD<20 Co-occurs with POT1 c.1071dupT in one individual

Table S4B. Variants of uncertain significance identified in three telomere genes (Cohort 2)

Gene	Genomic GRCh38	Coding	Protein	gnomAD v3.1.2 (MAF)	COSMIC	CADD score	Interpretation comment
<i>ACD</i> NM_001082486.2 NP_001075955.2	chr16:67660003C>T	c.142G>A	p.Ala48Thr	-	-	13.67	CADD <20
<i>ACD</i> NM_001082486.2 NP_001075955.2	chr16:67658218G>A	c.974C>T	p.Thr325Ile	1.97E-05	-	15.68	CADD <20
<i>ACD</i> NM_001082486.2 NP_001075955.2	chr16:67658041G>A	c.1151C>T	p.Pro384Leu	3.29E-05	Endometrioid carcinoma**	n/a	CADD <20
<i>POT1</i> NM_015450.3 NP_056265.2	chr7:124853013C>A	c.828G>T	p.Arg276Ser	-	-	9.4	Suspicious clinical history: 67 year old with multifocal PTC, pituitary adenoma, nevi; CADD <20
<i>TINF2</i> NM_001099274.3 NP_001092744.1	chr14:24242326T>G	c.7A>C	p.Thr3Pro	-	-	16.7	CADD <20

*ACD CADD score assessment confounded due to alignment errors related to overlapping isoforms

**Another missense change is present at the same amino acid in cancer databases

***An additional variant *POT1* chr7:124842843T>C (GRCh38), c.1127A>G, p.Gln376Arg which was previously identified in familial CLL(1), was identified in two individuals but did not pass our stringent MAF filter

Abbreviations: CADD, Combined Annotation-Dependent Depletion; TL, telomere length; MAF, mean allele frequency

CADD scores were obtained from the CADD v1.6 tool. Higher CADD scores are associated with a higher probability of deleterious effect. For Single Nucleotide Variants (SNVs), the scaled scores are ranked relative to all possible substitutions of the human genome such that scores ≥ 20 indicate the top 1% of most deleterious possible substitutions and scores ≥ 30 indicate the 0.1% most deleterious. CADD score <20 for missense variants not previously reported were not included in the final confirmed analysis and were listed as variants of uncertain significance.

Table S5. Clinical features of PTC and cause of death among individuals with telomere-related mutations

Age at last Assessment	M/F	Mutant gene	PTC age at diagnosis	Multifocality	Melanoma	Other malignancy
24	F	<i>POT</i>	-	-	-	
46	M	<i>POT1</i>	36	Yes	Yes	Multifocal renal cell carcinoma, advanced skin SCC
50	M	<i>POT1</i>	35	Yes	-	
50	M	<i>ACD</i>	-	-	-	Osteosarcoma
63	M	<i>TINF2</i>	28	Yes	-	Desmoid, Follicular lymphoma
d.63 (<i>acute leukemia</i>)	M	<i>TINF2</i>	Unknown	Yes	Yes	Acute leukemia NOS
64	M	<i>TINF2</i>	48	Yes	Yes	-
65	F	<i>TINF2</i>	36	Unknown	-	Multiple myeloma
66	M	<i>POT1</i>	43	Yes	Yes	Check
68	F	<i>TINF2</i>	47	Yes	-	-
68	F	<i>POT1</i>	68	-	-	-
d.69 (<i>unknown cause</i>)	M	<i>TINF2</i>	Unknown	Yes	-	Basal cell cancer, prostate cancer
d.69	M	<i>POT1</i>	38	-	Yes	-
71	M	<i>POT1</i>	-	-	Yes	-
d.74 (<i>metastatic neuroendocrine tumor</i>)	M	<i>ACD</i>	67	Yes	-	Oropharyngeal neuroendocrine tumor
d.83 (<i>CLL</i>)	F	<i>TINF2</i>	49	Unknown	Yes	Chronic lymphocytic leukemia
d.85 (<i>metastatic PTC</i>)	F	<i>TINF2</i>	82	Yes	-	
d.86 (<i>Hurthle cell carcinoma</i>)	M	<i>POT1</i>	86	-	-	-
42*	F	<i>POT1</i>	35	Yes	Yes	
d.53* (<i>multiple myeloma</i>)	M	<i>ACD</i>	48	Yes	-	Multiple myeloma
d.67* (<i>GBM</i>)	M	<i>POT1</i>	60	Yes	-	Renal cell cancer, glioblastoma
d.70* (<i>rectal cancer</i>)	M	<i>TINF2</i>	60	Yes	-	Rectal cancer

*Denotes the 4 probands from Cohort 2

**Multifocality was defined as multiple foci or bilateral disease

Supplementary References

1. H. E. Speedy *et al.*, Germ line mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **128**, 2319-2326 (2016).
2. L. G. Aoude *et al.*, Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst* **107** (2015).
3. C. D. Robles-Espinoza *et al.*, POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet* **46**, 478-481 (2014).
4. K. E. Schratz *et al.*, Somatic reversion impacts myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia evolution in the short telomere disorders. *The Journal of clinical investigation* **131** (2021).
5. H. He *et al.*, A truncating germline mutation of TIN2 in individuals with thyroid cancer or melanoma results in longer telomeres. *Thyroid* 10.1089/thy.2019.0156 (2020).
6. M. R. Jensen *et al.*, TIN2 is a major susceptibility gene in Danish patients with multiple primary melanoma. *HGG Adv* **4**, 100225 (2023).

