

Μελέτη γονοτύπησης περιστατικών οικογενούς μελανώματος για τα γονίδια CDKN2A και CDK4 με τη μέθοδο Whole Exome Sequencing (πλήρης αλληλούχιση εξωνίων)

Αικατερίνη Κυπραίου¹, Artomov Mkykta^{2,3}, Njauw Ching- Ni Jenny², Φανή Καραγιάννη¹, Κυριακή Αντωνοπούλου¹, Ελισάβετ Κοδέλα¹, Μιχαέλα Πλάκα¹, Αγγελική Πολυδώρου⁴, Βασιλική Χασάπη⁴, Όθωνας Παπαδόπουλος¹, Χριστίνα Αντωνίου¹, Ευάγγελος Ευαγγέλου^{5,6}, Mark Daly^{2,3}, Hensin Tsao^{2,3}, Αλέξανδρος Στρατηγός¹, Ειρήνη Στεφανάκη¹.

¹ Πανεπιστημιακή Κλινική Δερματικών και Αφροδίσιων Νόσων, Νοσοκομείο “Α. Συγγρός”, Αθήνα, Ελλάδα

² Τμήμα Δερματολογίας, Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital Cancer Center, Massachusetts General Hospital, Boston, MA

³ Broad Institute, MIT, Boston

⁴ Δερματολογική Κλινική ΕΣΥ, Νοσοκομείο Ανδρέας Συγγρός

⁵ Department of Epidemiology and Biostatistics, Imperial College London, London, UK

⁶ Τμήμα Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα.

Περίληψη: Περίπου 10% των μελανωμάτων είναι οικογενή. Στα περιστατικά αυτά εμπλέκονται γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας, μεταξύ των οποίων τα κυριότερα είναι το γονίδιο του αναστολέα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 2A (CDKN2A) και το γονίδιο της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (CDK4). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συχνότητα και το είδος των μεταλλάξεων αυτών των δύο γονιδίων σε 49 ασθενείς με οικογενές μελάνωμα από το αρχείο των ασθενών του Νοσοκομείου «Α. Συγγρός», με τη μέθοδο Whole Exome Sequencing (πλήρης αλληλούχιση εξωνίων). Από τους 49 ασθενείς, οι 20 εμφάνιζαν μετάλλαξη στο γονίδιο CDKN2A και 1 ασθενής στο γονίδιο CDK4. Το ποσοστό των μεταλλάξεων του CDKN2A στους ασθενείς μας είναι σημαντικά υψηλότερο από αντίστοιχα ποσοστά που έχουν αναφερθεί σε άλλους πληθυσμούς, επιβεβαιώνοντας τον κύριο ρόλο αυτού του γονιδίου στα περιστατικά οικογενούς μελανώματος στον Ελληνικό πληθυσμό.

Λέξεις ευρητηρίου: Οικογενές μελάνωμα, πλήρης αλληλούχιση εξωνίων, γονοτύπηση, γενετικό τεστ

Abstract: Approximately 10% of melanomas are familial. In these cases, high penetrance genes such as CDKN2A and CDK4 are implicated. In the present study, we aimed to evaluate the percentage and types of mutations in CDKN2A and CDK4 genes in a cohort of 49 familial melanoma patients from A. Sygros Hospital. Twenty of these

patients carried mutations in CDKN2A and one patient in CDK4, highlighting the key role of CDKN2A in familial melanoma Greek cases.

Keywords: Familial melanoma, Whole Exome Sequencing, genotyping, genetic test

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μελάνωμα είναι μία σύνθετη νόσος και στην παθογένειά της συμμετέχουν κλινικοί, επιδημιολογικοί, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Περίπου 10% των ασθενών με μελάνωμα έχει τουλάχιστον έναν συγγενή με μελάνωμα και το 1% δύο ή και περισσότερους πάσχοντες συγγενείς¹. Οι οικογενείς περιπτώσεις της νόσου έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας CDKN2A, CDK4, POT1, TERT, MITF και BAP1. Μεταξύ αυτών, το γονίδιο του αναστολέα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 2A (CDKN2A) αποτελεί το πρώτο και το πιο συχνό γονίδιο που συσχετίστηκε με την οικογενή μορφή της νόσου^{2, 3}. Το CDKN2A βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και εκφράζει, μέσω εναλλακτικού ματίσματος, διαφορετικές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων την p16INK4A (p16) και την p14ARF (p14)⁴. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p16 αναστέλλει τη δράση των κινάσων CDK4 και CDK6 οι οποίες φωσφορυλιώνουν τη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB) για την προώθηση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S⁵ (σχήμα 1). Η πρωτεΐνη p14 έχει επίσης ογκοκατασταλτική δράση μέσω αναστολής της πρωτεΐνης MDM2, που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της δράσης της pRB και κατά συνέπεια, όπως και στην περίπτωση της p16, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου⁶.

Οι μεταλλάξεις που έχουν παρατηρηθεί μέχρι τώρα στην p16 είναι κυρίως μη συνώνυμες μεταλλάξεις που αφορούν όλο το μήκος του γονιδίου^{2, 3, 7}, ενώ σπανιότερα συναντάμε μεταλλάξεις στον υποκινητή (c.-34G>T) που δημιουργούν ένα κωδικόνιο έναρξης ή μια μετάλλαξη σε εσώνιο (IVS2-105A>G), τα οποία επηρεάζουν το μάτισμα^{8,9}. Στην περίπτωση της p14 συναντάμε κυρίως ελλείψεις, ενθέσεις και μεταλλάξεις που αφορούν σε θέσεις του ματίσματος¹⁰⁻¹³.

Μεταλλάξεις στο CDKN2A κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και παρατηρούνται στο 10% οικογενειών με 2 περιστατικά, ενώ σε οικογένειες που έχουν 3 ή και περισσότερα άτομα με μελάνωμα το αντίστοιχο ποσοστό κυμαίνεται σε 30-40%¹⁴. Το CDKN2A είναι επίσης το κύριο γονίδιο που σχετίζεται με πολλαπλά πρωτοπαθή μελανώματα¹⁵. Η συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου CDKN2A στον γενικό πληθυσμό είναι πολύ χαμηλή όπως φαίνεται από αντίστοιχες μελέτες. Η πρώτη από αυτές τις μελέτες στο Queensland υπολόγισε ότι το ποσοστό αυτό είναι 0,2%¹⁶ ενώ σε μια πιο πρόσφατη μελέτη από πληθυσμό της ίδιας περιοχής το

ποσοστό ήταν 1,2%⁴. Αντίστοιχη μελέτη με δείγματα από Βόρεια Αφρική, Ευρώπη και Αυστραλία υπολόγισε το ποσοστό αυτό στο 2%¹⁷ ενώ προηγούμενη δική μας μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό (hospital-based population) στο 5%¹⁸.

Στα πλαίσια της διερεύνησης και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τα οικογενή περιστατικά του μελανώματος η επόμενη ανακάλυψη ήταν στο γονίδιο της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (CDK4) στο χρωμόσωμα 12¹⁹⁻²¹, που όμως μέχρι στιγμής αφορά πολύ μικρότερο αριθμό οικογενειών παγκοσμίως¹⁹⁻²¹. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις αφορούν στο κωδικόνιο 24, με κάποιες οικογένειες να φέρουν είτε την p.R24C αντικατάσταση²¹ είτε την p.R24H²⁰. Η αργινίνη στη θέση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της p16 με την CDK4 οδηγώντας στην καταστολή της τελευταίας. Η αλλαγή αυτή αναιρεί την καταστολή της CDK4 και οδηγεί στην ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου. Οι παραπάνω μεταλλάξεις p.R24C or p.R24H στο CDK4 έχουν παρατηρηθεί σε οικογένειες από διάφορες χώρες που έχουν διαφορετικούς απλότυπους¹⁹⁻²¹, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη θέση αποτελεί mutational hotspot²².

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εμπλουτίσουμε την αρχική μας μελέτη γονοτύπησης των οικογενών περιστατικών για τα γονίδια CDKN2A και CDK4¹⁸ με τη μέθοδο Whole Exome Sequencing (πλήρης αλληλούχισης εξωνίων) προκειμένου να ανιχνεύσουμε όλες τις μεταλλάξεις στα γονίδια CDKN2A, CDK4 που εμπλέκονται στην αιτιολογία του μελανώματος στον ελληνικό πληθυσμό.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Από 49 άτομα με οικογενές μελάνωμα απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα με τη χρήση κατάλληλου κιτ (QIAamp DNA blood mini kit, Qiagen). Κάθε δείγμα DNA φωτομετρήθηκε (Quant-iT dsDNA HS Assay kit, Invitrogen) προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα του. Η συγκέντρωση σε κάθε δείγμα υπολογίστηκε σε συνολικά 750ng DNA.

Η πλήρης αλληλούχιση εξωνίων πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Broad Institute του MIT. Οι αναλύσεις των αλληλουχιών που προέκυψαν από τη μελέτη των εξωνίων έγιναν με το λογισμικό GATK-3.0 (διαθέτει Haplotype Caller) που επιτρέπει την ταυτόχρονη σύγκριση μεγάλου αριθμού αλληλουχιών ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα λάθους και αυξάνοντας το ποσοστό εντοπισμού ακόμα και σπάνιων πολυμορφισμών. Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα 49 οικογενή δείγματα του ελληνικού πληθυσμού αναλύθηκαν ταυτόχρονα με 37.000 επιπλέον δείγματα του Broad Institute. Η χρήση τέτοιων μεγάλων κοορτών αυξάνει πολύ την πιθανότητα εντοπισμού νέων και ιδιαιτέρως σπάνιων πολυμορφισμών με αξιόπιστο τρόπο, όπως απαιτεί η διαχείριση δεδομένων τεράστιου όγκου όπως αυτά. Για ακόμη πιο ακριβή αποτελέσματα, με τη χρήση κατάλληλου φίλτρου (GQ>20; DP>10)

αποκλείστηκαν από τις αναλύσεις τα δείγματα με ελλιπή δεδομένα αλληλούχισης σε ποσοστό μεγαλύτερο του 5%.

Με το λογισμικό PLINK/SEQ έγινε ένας αδρός ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων καθώς και υπολογισμός των συχνοτήτων των αλληλίων στον πληθυσμό μας. Για τον υπολογισμό της συχνότητας των αλληλίων στον πληθυσμό χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα της βάσης ExAC. Η τελευταία περιλαμβάνει 67.000 δείγματα με στοιχεία πλήρης αλληλούχισης εξωνίων και αποτελεί την πιο σύγχρονη, μεγάλη και ελεύθερα προσβάσιμη βάση καταγραφής της συχνότητας των αλληλίων. Ως δεδομένα αναφοράς χρησιμοποιήσαμε μη-Φιλανδικά Ευρωπαϊκά δείγματα από τη βάση ExAC (~33.000) για τον υπολογισμό των αθροιστικών συχνοτήτων των αλληλίων που αφορούν τα γονίδια κινδύνου.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή Βιοηθικής του Νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός και από την Ακαδημαϊκή Επιτροπή του Νοσοκομείου της Μασαχουσέτης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πληθυσμός μας αποτελείται από 49 άτομα (20 άνδρες, 29 γυναίκες) με οικογενές μελάνωμα που ανήκουν σε 40 διαφορετικές οικογένειες. Πέντε από αυτούς τους ασθενείς εμφάνιζαν πολλαπλά μελανώματα. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Το ποσοστό των ασθενών με οικογενές μελάνωμα που φέρουν μεταλλάξεις στο CDKN2A είναι 40,82% (20/49 ασθενείς), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το CDK4 είναι 2,04% (1/49 ασθενείς) (Πίνακας 2). Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στην περίπτωση του CDKN2A είναι η p. A148T (6 ασθενείς), η p.R24P (4 ασθενείς) και η p.W110X (επίσης 4 ασθενείς), ενώ ένα περιστατικό έχει γονότυπο p. A148T/ p.W110X. Στην περίπτωση του CDK4 γονιδίου ένα περιστατικό φέρει την μετάλλαξη p. R24H (Πίνακας 2). Τα αποτελέσματα από αυτή την αλληλούχιση επιβεβαίωσαν την αυξημένη συχνότητα της μετάλλαξης p.A148T¹⁸.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε σχέση με την ηλικία των ασθενών, έδειξε ότι η ηλικία σχετίζεται στατιστικά σημαντικά (pvalue=0,023) με την εμφάνιση μεταλλάξεων (Πίνακας 3). Συγκεκριμένα, η πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων μειώνεται κατά 0,954 φορές για κάθε χρόνο αύξησης της ηλικίας. Ανάλυση των αποτελεσμάτων λαμβάνοντας υπόψη τον φωτότυπο των ασθενών δεν βρήκε συσχέτιση μεταξύ εμφάνισης μεταλλάξεων και φωτότυπου (pvalue=0,493) (Πίνακας 4).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

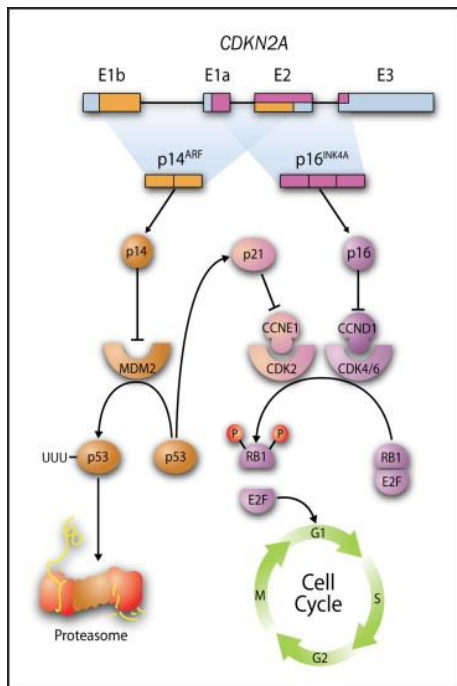
Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη ερευνητική προσπάθεια ανίχνευσης με τη μέθοδο exome sequencing πολυμορφισμών στα γονίδια CDKN2A και CDK4 στον

Ελληνικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν τον πρωταρχικό ρόλο που διαδραματίζει το γονίδιο CDKN2A στην αιτιοπαθογένεια του οικογενούς μελανώματος στον πληθυσμό μας και επιβεβαιώνουν τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης μας σε οικογενή περιστατικά μελανώματος με τη μέθοδο Sanger sequencing. Η ανάλυσή μας δείχνει ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων του CDKN2A σε Έλληνες ασθενείς με οικογενές μελάνωμα, το οποίο υπερβαίνει κατά πολύ αντίστοιχα ποσοστά μεταλλάξεων του γονιδίου σε πληθυσμούς άλλων εθνικοτήτων^{7, 14}. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τα προηγούμενα ευρήματα μας¹⁸ και υποδεικνύουν πως ο γενετικός έλεγχος σε άτομα με επιβαρυσμένο οικογενειακό ιστορικό για μελάνωμα είναι σημαντικός για τον ελληνικό πληθυσμό.

Επίσης επιβεβαιώνεται η εμφάνιση μελανώματος σε μικρότερη ηλικία σε φορείς μεταλλάξεων του CDKN2A σε σχέση με άτομα που δεν φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου ($p=0.11$), όπως έχει ήδη αναφερθεί σε μελέτες που έγιναν σε άλλους πληθυσμούς²³. Η μέση ηλικία διάγνωσης μελανώματος σε φορείς μεταλλάξεων του CDKN2A παγκοσμίως κυμαίνεται μεταξύ της ηλικίας των 30 και 40 ετών, ενώ σε οικογένειες χωρίς CDKN2A μεταλλάξεις είναι μεταξύ 40-50 ετών. Στις ΗΠΑ η μέση ηλικία διάγνωσης μελανώματος σε φορείς CDKN2A μεταλλάξεων είναι 35 ετών²⁴ σε σύγκριση με μέση ηλικία 59 έτη στον γενικό πληθυσμό.

Σε αντίθεση με την ηλικία, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του φωτότυπου και της ύπαρξης μεταλλάξεων στο CDKN2A στον πληθυσμό που μελετήσαμε.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας από τη μελέτη αλληλούχισης εξωνίων στη σειρά των ασθενών μας υποδεικνύει τον «εμπλουτισμό» σε μεταλλάξεις του CDKN2A σε περιστατικά Ελλήνων ασθενών με οικογενές μελάνωμα. Παρ' όλα αυτά, η πλειονότητα των ασθενών που εξετάσαμε δε φέρουν κάποια ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στα γονίδια CDKN2A και CDK4. Ήδη σύγχρονες μελέτες αλληλούχισης εξωνίων σε μεγάλο αριθμό οικογενών δειγμάτων εμπλέκουν νέα γονίδια και υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα της νόσου^{25, 26}. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω μοριακές αναλύσεις προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος και άλλων γονιδίων και στον δικό μας πληθυσμό.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του γονιδίου CDKN2A ²⁷.

Πίνακας 1. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά 49 ασθενών με οικογενές μελάνωμα

	Διάμεσος (Ενδοτεταρτημοριακό εύρος)
Ηλικία	49 (33,5-60)
	Συχνότητα (Ποσοστό)
Φύλο	
Άνδρας	20 (40,82%)
Γυναίκα	29 (59,18%)
Χρώμα μαλλιών	
Ξανθά	7 (14,29%)
Κόκκινα	1 (2,04%)
Ανοιχτά καστανά	16 (32,65%)
Σκούρα καστανά	19 (38,78%)
Μαύρα	5 (10,20%)
Ελλείπουσες τιμές	1 (2,04%)
Χρώμα ματιών	
Μπλέ	8 (16,33%)
Πράσινα	11 (22,45%)
Ανοιχτά καστανά	10 (20,41%)
Σκούρα καστανά	18 (36,73%)
Ελλείπουσες τιμές	2 (4,08%)
Χρώμα δέρματος	
Ανοιχτόχρωμο	32 (65,31%)
Ελαφρά μελαχρινό	16 (32,65%)
Ελλείπουσες τιμές	1 (2,04%)
Ικανότητα μαυρίσματος	
Δεν μαυρίζω καθόλου	7 (14,29%)
Μαυρίζω λίγο	22 (44,90%)
Μαυρίζω μέτρια	11 (22,45%)
Μαυρίζω έντονα	7 (14,29%)
Ελλείπουσες τιμές	2 (4,08%)
Φωτότυπος	
I	1 (2,04%)
II	25 (51,02%)
III	13 (26,53%)
IV	9 (18,37%)
Ελλείπουσες τιμές	1 (2,04%)

Πίνακας 2. Μεταλλάξεις των CDKN2A και CDK4 σε σύνολο 49 ασθενών με οικογενές μελάνωμα μετά από αλληλούχιση των εξωνίων τους.

Γονίδιο	Γονιδιακή Θέση	Μετάλλαξη	Αριθμός Μεταλλάξεων	Ποσοστό ασθενών/μετάλλαξη
CDKN2A	Exon 2 chr9:21971028	W110X (rs1213389)	4	8,2%
CDKN2A	Exon 1a chr9:21974758.. 21974759	AC to A	1	2,04%
CDKN2A	Exon 1a chr9:21974783.. 21974784	W15X (rs13867767 40)	1	2,04%
CDKN2A	chr9:21968222	rs375628411	1	2,04%
CDKN2A	Exon 2 chr9:21970916	A148T (rs3731249)	6	12,25%
CDKN2A	Exon 2 chr9:21971057	G101R (rs10489409 4)	2	4,08%
CDKN2A	Exon 2 chr9:21971099	-	1	2,04%
CDKN2A	Exon 1a chr9:21974756	R24P (rs10489409 7)	4	8,2%
CDK4	Exon 2 chr12:58145430	R24H	1	2,04

Πίνακας 3. Συσχέτιση συχνότητας εμφάνισης μεταλλάξεων με την ηλικία κατά τη διάγνωση.

	OR¹	95% Διάστημα εμπιστοσύνης	P value
Ηλικία	0,954	0,917-0,993	0,023
¹ Λόγος σχετικών πιθανοτήτων. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από την εφαρμογή μοντέλου λογαριθμικής παλινδρόμησης.			

Πίνακας 4. Συσχέτιση συχνότητας εμφάνισης μεταλλάξεων με τον φωτότυπο.

CDKN2A	Φωτότυπος		Σύνολο
	I,II	III, IV	
Καμία μετάλλαξη	14	14	28
Τουλάχιστον μία μετάλλαξη	12	8	20
Pvalue=0,493			

Βιβλιογραφία

1. Law MH, Macgregor S, Hayward NK. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. *J Invest Dermatol*. 2012;132(7):1763-74.
2. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet*. 1994;8(1):15-21.
3. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature genetics*. 1994;8(1):23-6.
4. Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD, Wadt K, Harland M, Choi J, et al. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(2).
5. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med*. 2009;7:86.
6. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998;92(6):725-34.
7. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res*. 2006;66(20):9818-28.
8. Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, Mantelli M, Bianchi-Scarra G, Goldstein AM, et al. Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28(1):45-57.
9. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, et al. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet*. 1999;21(1):128-32.
10. Harland M, Taylor CF, Chambers PA, Kukulizch K, Randerson-Moor JA, Gruis NA, et al. A mutation hotspot at the p14ARF splice site. *Oncogene*. 2005;24(28):4604-8.
11. Mistry SH, Taylor C, Randerson-Moor JA, Harland M, Turner F, Barrett JH, et al. Prevalence of 9p21 deletions in UK melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44(3):292-300.
12. Randerson-Moor JA, Harland M, Williams S, Cuthbert-Heavens D, Sheridan E, Aveyard J, et al. A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Hum Mol Genet*. 2001;10(1):55-62.
13. Rizos H, Puig S, Badenas C, Malveyh J, Darmanian AP, Jimenez L, et al. A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene*. 2001;20(39):5543-7.
14. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*. 2007;44(2):99-106.
15. Puig S, Malveyh J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*. 2005;23(13):3043-51.
16. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, et al. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(5):446-52.
17. Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Krickler A, Marrett LD, et al. Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(20):1507-15.
18. Nikolaou V, Kang X, Stratigos A, Gogas H, Latorre MC, Gabree M, et al. Comprehensive mutational analysis of CDKN2A and CDK4 in Greek patients with cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*. 2011;165(6):1219-22.

19. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet.* 2013;50(4):264-70.
20. Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombled J, Spatz A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet.* 1998;7(2):209-16.
21. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature genetics.* 1996;12(1):97-9.
22. Molven A, Grimstvedt MB, Steine SJ, Harland M, Avril MF, Hayward NK, et al. A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and CDK4 mutation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005;44(1):10-8.
23. Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, Banks KC, Asgari MM, Bergman W, et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(4):677 e1-14.
24. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(12):894-903.
25. Robles-Espinoza CD, Velasco-Herrera Mdel C, Hayward NK, Adams DJ. Telomere-regulating genes and the telomere interactome in familial cancers. *Mol Cancer Res.* 2015;13(2):211-22.
26. Shi J, Yang XR, Ballew B, Rotunno M, Calista D, Fargnoli MC, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nature genetics.* 2014;46(5):482-6.
27. Calbo J, Mazo A. p16INK4a as a tumor suppressor with herapeutic applicability. *Drugs Fut.* 2003; 28(2): 153.