

A large Norwegian family with malignant melanoma and mutation in the cell cycle gene *CDK4*



Anders Molven

**Section for Pathology, The Gade Institute
University of Bergen / Haukeland University Hospital
Bergen, Norway**

Gades institutt, Seksjon for patologi

(The Gade Institute, Section for Pathology)

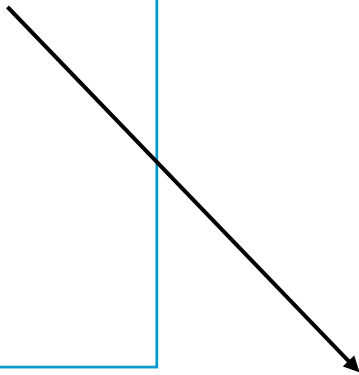
Universitetet i Bergen

- **10 + 2 scientific positions**
- **ca. 30 people**
- **RESEARCH**
- **TEACHING**

**+ Sections for virology,
bacteriology and
immunology**

Haukeland Universitetssykehus

- **35 000 biopsies**
- **52 000 cytological samples**
- **autopsies**
- **ca. 90 people**
- **28 MDs**
- **DIAGNOSTICS**



What could be of interest?

**Histopathologic &
cytopathologic
knowledge incl.
immunohisto-
chemistry**

**A large archive of
tissue blocks**

**Instruments
and animal facility**

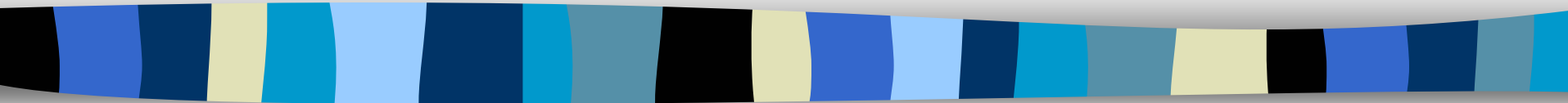
**Research on
tumor biology**

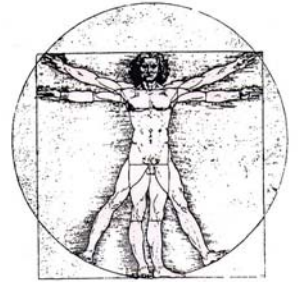
We have a very large collection of tissue blocks extending back to the 1930's!



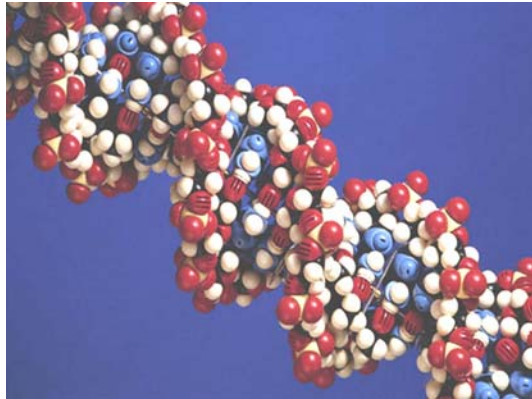
- 1) Retrospective studies**
- 2) Studies of inherited diseases**

A short introduction to malignant melanoma of the skin





Which organ does cancer affect??



Cancer is a disease of the genome!

1) Somatic mutations



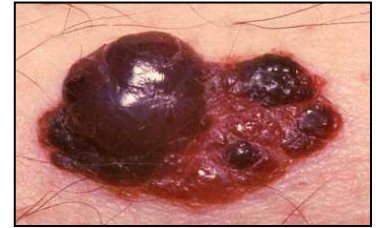
Sporadic cancers

2) Germ line mutations



**Inherited cancer
syndromes**

Malignant melanoma:



- Cancer of the skin's pigmented cells (melanocytes)
- Increasing incidence (NB! sun exposure)

The ABCD-rule:

- Asymmetry
- Border
- Colour
- Diameter

Malignant melanoma in Norway (1)

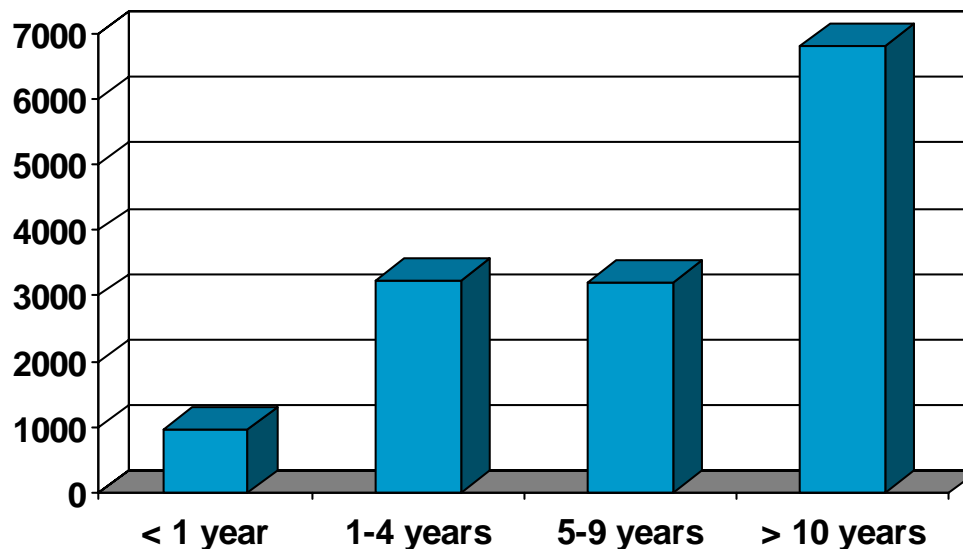


■ In 2003 there were

- 1008 new cases of cutaneous MM (466 M, 542 F)
- 243 deaths from the disease (132 M, 111 F)

■ At the end of the year there were

- 14217 persons alive with the diagnosis



Source:
The Norwegian Cancer Registry:
Cancer in Norway 2003

Malignant melanoma in Norway (2)



190 Melanoma of skin

Fig. 3.1.18 Age-adjusted incidence rates 1953-2003

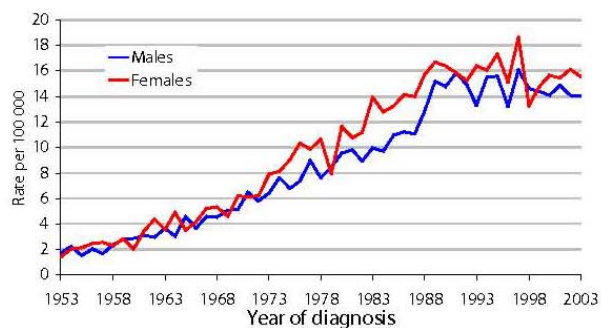


Fig. 3.2.18 Age-specific incidence rates 1999-2003

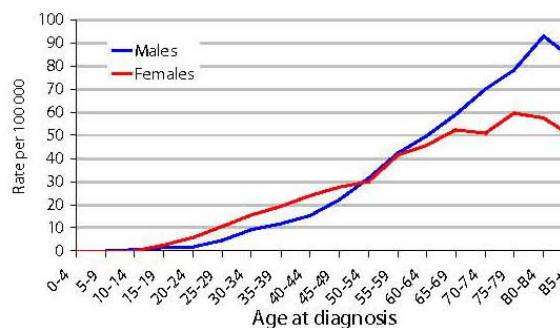


Fig. 3.3.18 Relative risk by county 1999 - 2003, males

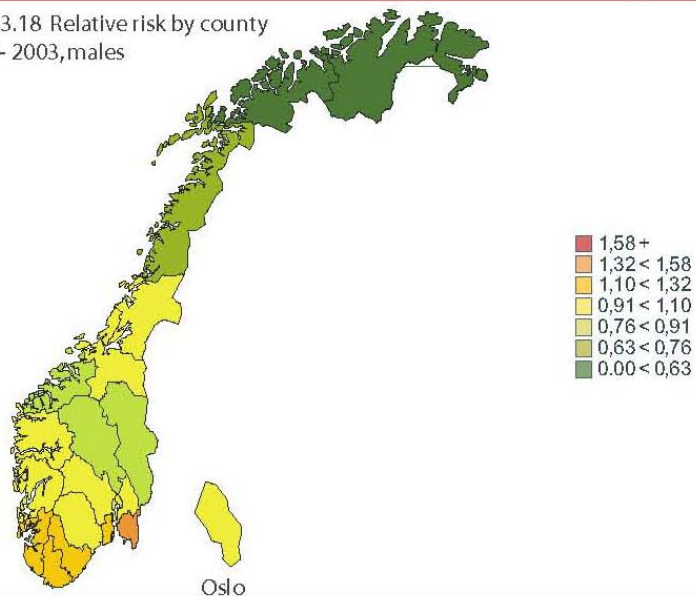
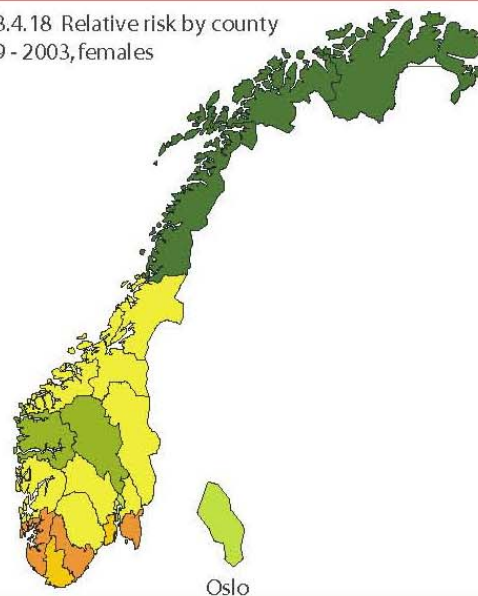
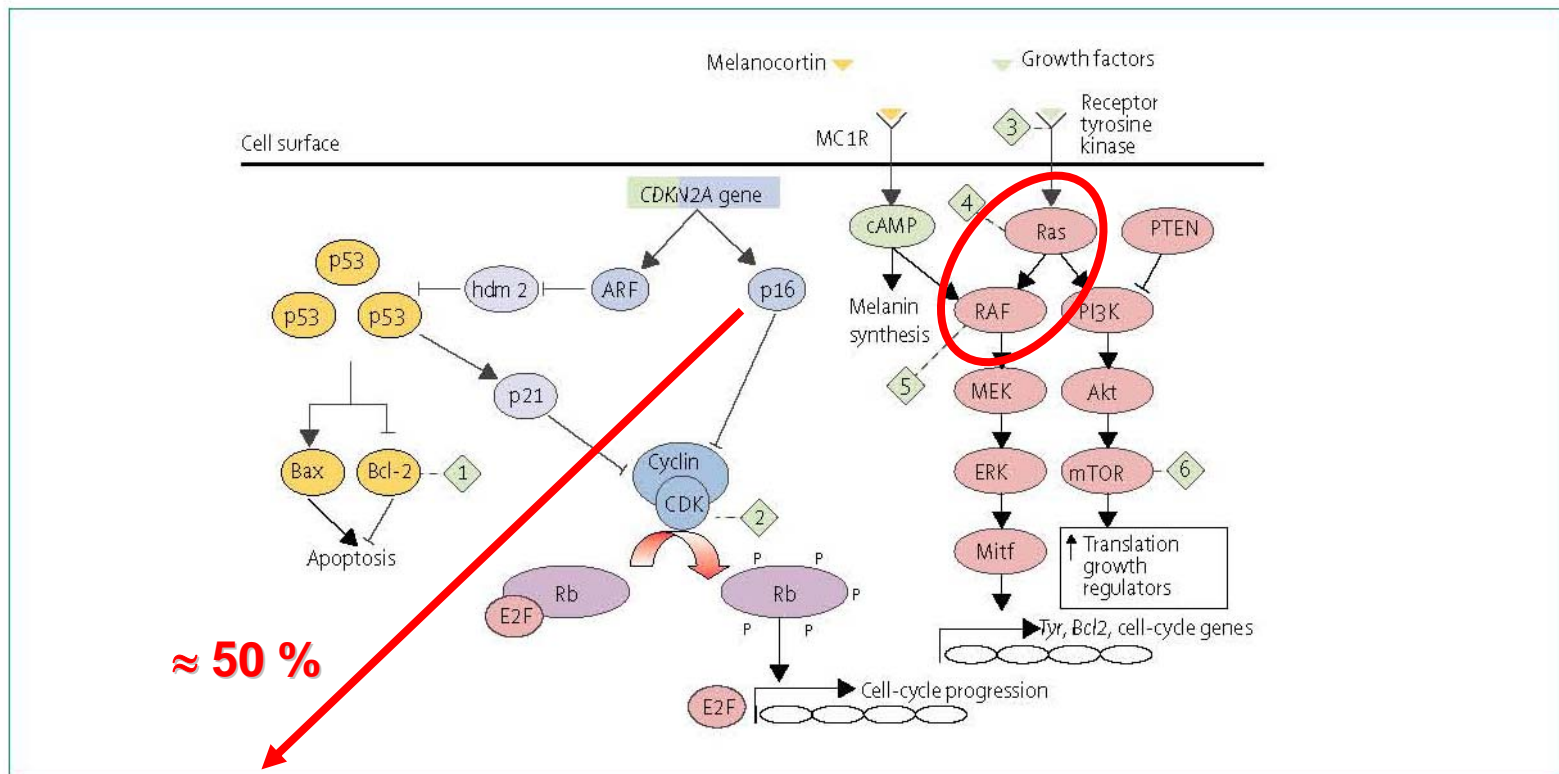


Fig. 3.4.18 Relative risk by county 1999 - 2003, females



Somatic mutations in melanoma (1)



- Deletions (LOH)
- Hypermethylation of the promoter
- Point mutations

Thompson et al. (2005). Lancet 365: 687-701.

Somatic mutations in melanoma (2)



letters to nature

Mutations of the *BRAF* gene in human cancer

Helen Davies^{1,2}, Graham R. Bignell^{1,2}, Charles Cox^{1,2}, Philip Stephens^{1,2}, Sarah Edkins¹, Shella Clegg¹, Jon Teague¹, Hayley Woffendin¹, Matthew J. Garnett¹, William Bottomley¹, Neil Davis¹, Ed Dicks¹, Rebecca Ewing¹, Yvonne Floyd¹, Kristian Gray¹, Sarah Hall¹, Rachel Hawes¹, Jalme Hughes¹, Vivian Kesmides¹, Andrew Menzies¹, Catherine Mould¹, Adrian Parker¹, Claire Stevens¹, Stephen Watt¹, Steven Hooper¹, Rebecca Wilson¹, Hiran Jayatilake¹, Barry A. Gusterson³, Colin Cooper⁴, Janet Shipley⁵, Darren Hargrave⁶, Katherine Pritchard-Jones⁷, Norman Makhlouf⁸, Georgia Chenevix-Trench⁹, Gregory J. Riggins¹⁰, Darrell D. Bigner¹⁰, Giuseppe Palmieri¹¹, Antonio Cossu¹², Adrienne Flanagan¹³, Andrew Nicholson¹⁴, Judy W. C. Ho¹⁵, Suet Y. Leung¹⁶, Siu T. Yuen¹⁶, Barbara L. Weber¹⁷, William F. Seligier¹⁸, Timothy L. Darrow¹⁹, Hugh Paterson¹, Richard Marais¹, Christopher J. Marshall¹, Richard Wooster^{1,6}, Michael R. Stratton^{1,6} & P. Andrew Futreal¹

¹Cancer Genome Project, The Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, CB10 1SA, UK

²Cancer Research UK Centre for Cell and Molecular Biology, Chester Beatty Labs, Institute of Cancer Research, London SW3 6JB, UK

³Section of Cancer Genetics, ⁴Section of Molecular Carcinogenesis, and ⁵Section of Paediatrics, Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey SM2 5NG, UK

⁶Department of Pathology, Western Infirmary, University of Glasgow, S11 6NT, UK

⁷Department of Biology, YCR Cancer Research Unit, University of York, York YO10 5YW, UK

⁸Queensland Institute of Medical Research, RBH Post Office Herston, Queensland 4029, Australia

⁹Department of Pathology, and ¹⁰Department of Surgery, Duke University Medical Centre, Durham, North Carolina 27710, USA

¹¹Institute of Molecular Genetics, C.N.R., Loc. Tramariglia, Alghero 07040, Italy

¹²Department of Pathology, University of Sassari, Azienda USL1, Sassari 07100, Italy

¹³Royal Free & University College Medical School, London WC1E 6JJ, UK

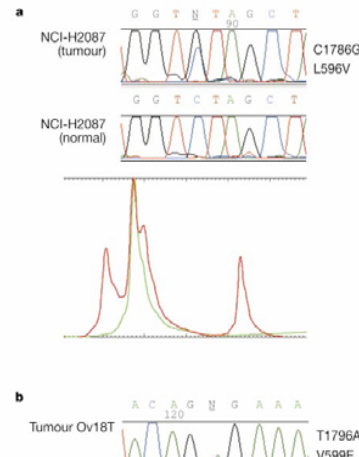
¹⁴Royal Brompton Hospital, London SW3 6NP, UK

¹⁵Department of Surgery, and ¹⁶Department of Pathology, The University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Hong Kong

¹⁷Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA

¹⁸These authors contributed equally to this work

phoblastoid cell lines from the same individuals were screened for sequence variants through the coding exons and intron-exon junctions of the *BRAF* gene using a capillary-based modified heteroduplex method followed by direct sequencing of polymerase chain reaction products. (Exon 1, containing 135 base pairs (bp) of coding sequence, failed to amplify despite the use of five different primer sets.) Three single-base substitutions were detected. Two were in *BRAF* exon 15: T1796A leading to a substitution of valine by glutamic acid at position 599 (V599E) in the melanoma cell line Colo-829, and C1786G leading to L596V in the NSCLC cell line NCI-H2087 (Fig. 1). A further mutation was found in exon 11: G1403C leading to G468A in the NSCLC cell line NCI-H1395. None of the three changes were present in the lymphoblastoid cell lines from the same individuals, indicating that the variants were somatically acquired mutations.



- Cancer Genome Project: A screen for alterations in the MAP kinase signalling pathway
- *BRAF* is mutated at high frequency in malignant melanomas and at lower frequencies in other human cancers

Davies et al. (2002). Nature 427: 949-954.

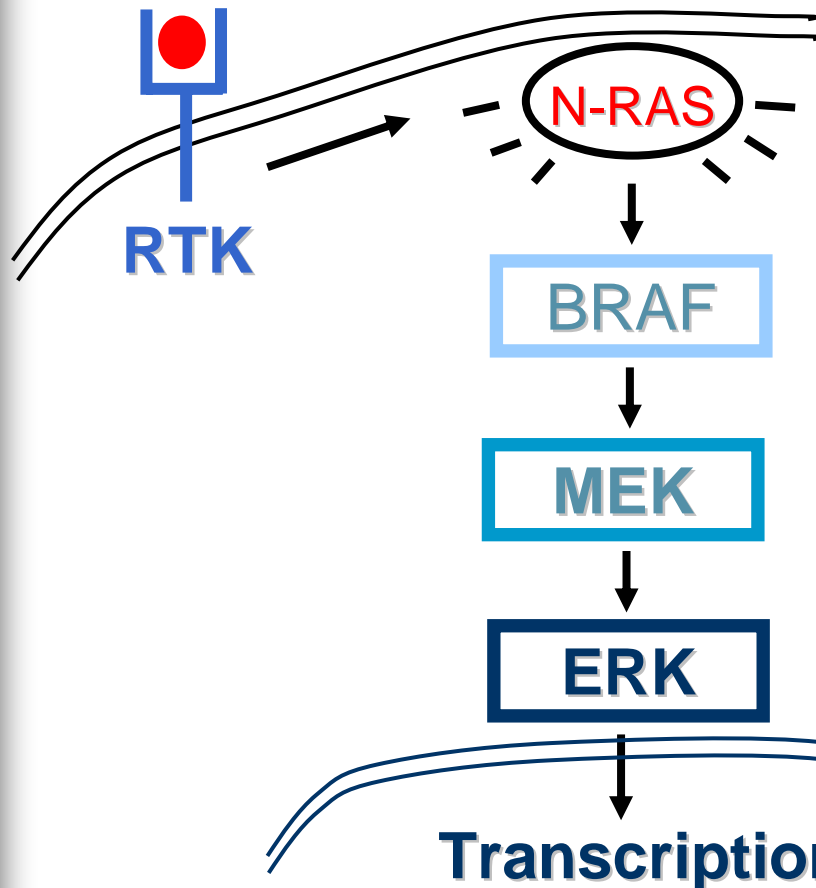
Somatic mutations in melanoma (3)



Curtin et al. (2005). NEJM 353: 2135-2147.

Some lessons:

i) MM exhibit specific point mutations in this pathway



≈ 20 %

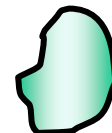
≈ 50 %

ii) They are mutually exclusive

iii) Their frequencies vary according to MM subgroups

iv) *BRAF/NRAS*-negative tumors show amplification/overexpression of *CDK4/cyclinD1*

Cyclin D1



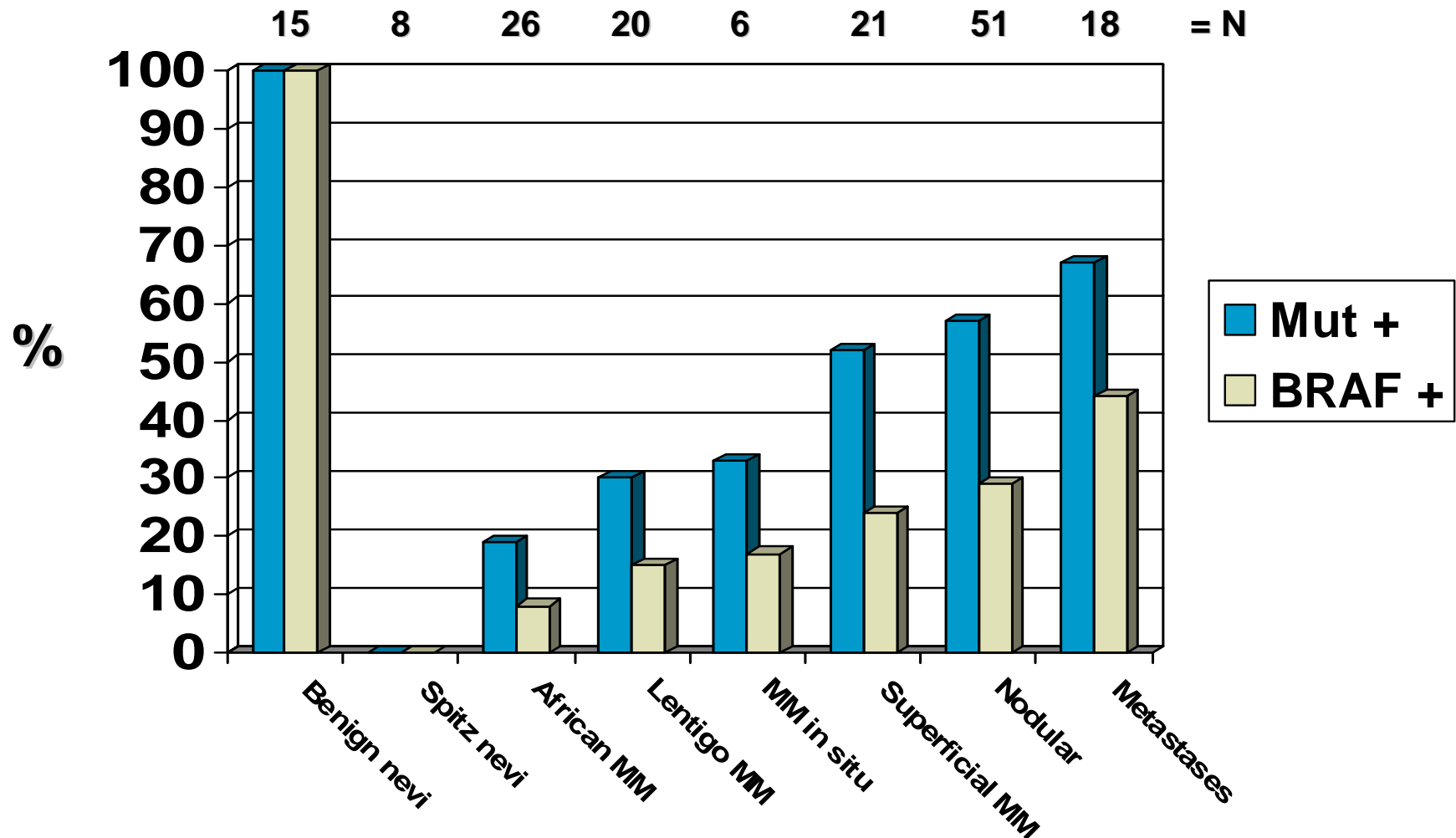
Cell proliferation

Somatic mutations in melanoma (4)



- A material of 51 primary, nodular melanomas
 - also 18 paired metastases
- *NRAS/BRAF* mutations in 56 % of the primary tumors
 - 29 % in *BRAF* (44 % in the metastases)
 - 27 % in *NRAS* (22 % in the metastases)
- No correlation between mutation status and
 - vertical tumor thickness
 - tumor cell proliferation (Ki-67)
 - patient survival

Somatic mutations in melanoma (5)



Somatic mutations in melanoma (6)



- The study supports that *BRAF* mutations are associated with intermittent sun exposure
- A different mutation spectrum in the African melanomas
 - 1 in *BRAF* exon 11
 - 1 in *BRAF* exon 15 (V600E)
 - 3 in *NRAS* exon 1
- *EGFR* exon 18-21 mutations not found in any subgroup

The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

MAY 20, 2004

VOL. 350 NO. 21

Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib

Thomas J. Lynch, M.D., Daphne W. Bell, Ph.D., Raffaella Sordella, Ph.D., Sarada Gurubhagavatula, M.D., Ross A. Okimoto, B.S., Brian W. Brannigan, B.A., Patricia L. Harris, M.S., Sara M. Haserlat, B.A., Jeffrey G. Supko, Ph.D., Frank G. Haluska, M.D., Ph.D., David N. Louis, M.D., David C. Christiani, M.D., Jeff Settleman, Ph.D., and Daniel A. Haber, M.D., Ph.D.

**A large Norwegian family with
malignant melanoma and
mutation in the cell cycle gene *CDK4***



**Or: The doctor
who never gave up**

Inherited malignant melanoma (1):

- About 10 % of melanoma patients report at least one other relative with the disease
 - random clustering
 - common environmental factors (sun exposure)
 - common susceptibility genes
- "Real" inherited MM:
 - caused by a high-penetrant, high-risk allele in the family
 - autosomal dominant inheritance
 - about 20 % of melanoma families carry a mutation in the *CDKN2A*-locus (encodes the tumor suppressor p16)
 - three families are known to carry a mutation in the oncogene *CDK4*
 - accounts for 1-2 % of all MM-cases ???

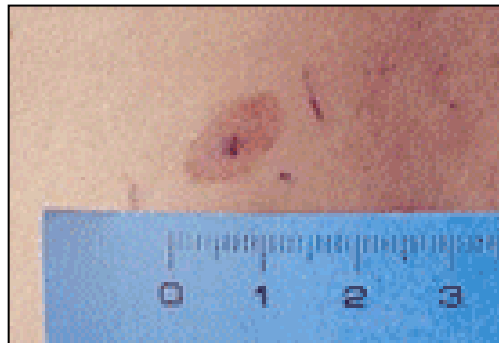
Inherited malignant melanoma (2):

■ Hallmarks:

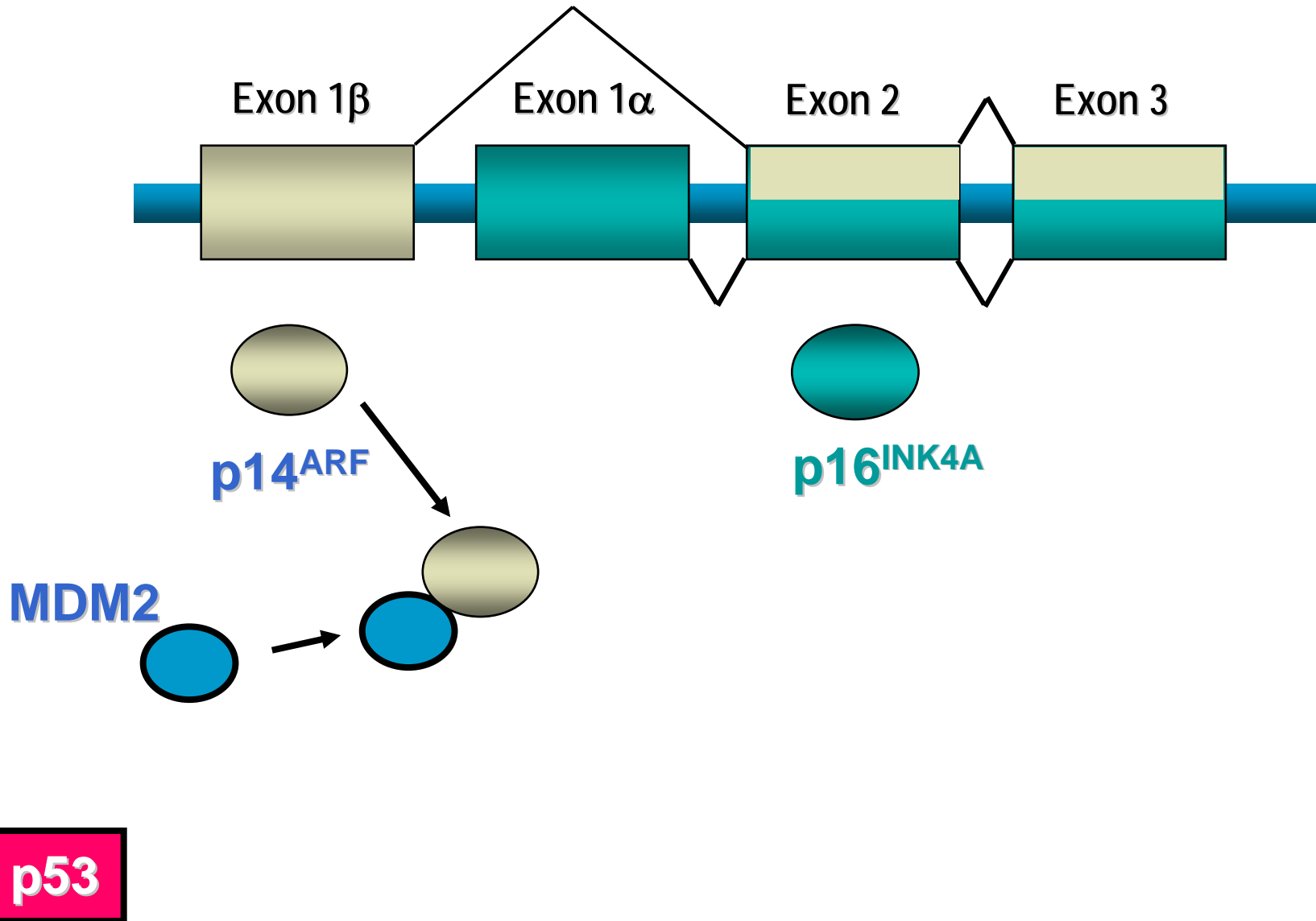
- more than one primary tumor in the same person
- lower age of onset
- in some cases a predisposition for pancreatic cancer
- atypical nevi

Atypical nevi:

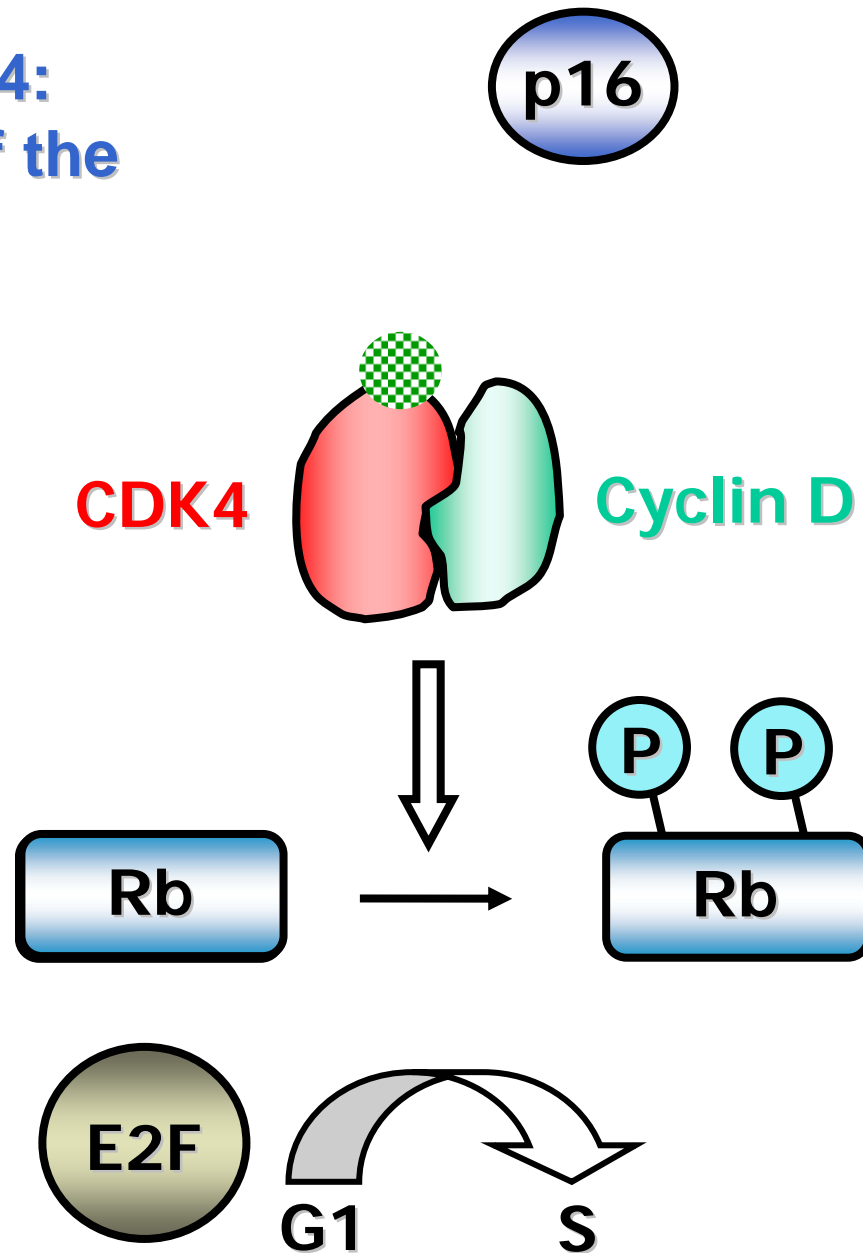
- Asymmetry
- Fuzzy borders
- Varying colour
- Diameter > 5 mm



The *CDKN2A* locus:



p16 and CDK4: Regulation of the cell cycle



FAMILIÆR FOREKOMST AV MALIGN MELANOMER

Av MAGNE GRIMSTVEDT

T. norske Lægeforen. 1969, 89, 1900–1902.

- **1967:** Dr. Magne Grimstvedt in Haugesund, Norway is contacted by a 32 year old man who has a "suspicious nevus" on his ear
- It is revealed that there are several other cases of malignant melanoma in the close family of the patient
- **1969:** Dr. Grimstvedt publishes a first description of the family and notes the presence of atypical nevi in some family members

Familier forekomst av kutane maligne melanomer ble først beskrevet av Ca w l e y (5) i 1952. Siden har flere andre forfattere omtalt det samme (1, 9, 12, 14–16 og andre).

Også familier opptræder av malignt melanom i øyet er beskrevet en rekke ganger (2, 5).

Familier opptræder av malignt melanom både i hud og i øye ble først beskrevet av L y n c h & K r u s h i 1968, ellers kan man ikke finne denne kombinasjonen beskrevet tidligere (10).

Her skal omtales en familie hvor moren døde av malignt melanom i 1936. Hennes mann lever ennå og er frisk, 82 år gammel. De hadde 8 barn, som alle er undersøkt med henblikk på malignt melanom. Fem av barna hadde sykdommen, én i øyet, de øvrige i huden. Dessuten hadde ett et premalignt melanom (fig. 1).

Eget materiale

Kasus 1: Moren: Hun lå i Haugesund sykehus 5/2–6/2–1936, 45 år gammel, under diagnosen melano-sarcoma cutis et hepatitis et glandularum. Av journalen fremgår det at hun i de siste 3 årene periodvis hadde vært plaget av dyspepsi. Så lenge hun kunne huske, hadde hun hatt en «vorte» i huden i furen mellom høyre labium majus og låret. I forbindelse med graviditet vel 1 år før innleggelsen fikk hun årebetenelse og ulcus cruris på høyre legg, og samtidig merket hun for første gang at «vorten» ble ømfintlig og begynte å vokse. De siste 3–4 måneder før innleggelsen begynte tumor å vokse, og der kom lignende knuter i høyre og venstre lyskeregion. Hun hadde følt seg noe slapp, men gikk i sitt vanlige arbeid og ga det siste barnet bryst til noen uker før innleggelsen.

Ved undersøkelsen fantes pasienten tynn, blek og medtatt. I høyre labium majus fantes en omtrent knyttnevestor, ulcererende tumor, bestående av små, faste, blålige, konfluerende knuter. Herfra strakte det seg en sammenhengende infiltrasjon av lignende knuter fremover og utover i høyre lyske, og i venstre lyske føltes lignende knuter. Intraabdominalt palperes en tversgående tumor til høyre for umbilicus.

Hun ble utskrevet uten noen behandling og døde ca. 4 måneder senere.

Kasus 2. Faren: Han lever i beste velgående, 82 år gammel. Der er intet slektskap mellom ham og hans avdøde kone. I hans familie er der ingen kjente tilfelle av maligne melanomer. Selv har han ikke hatt noen alvorlig sykdom. Ved undersøkelse av ham kan der ikke påvises noe tegn til malignt melanom.

Kasus 3: Dette er den eldste sønnen, som nå er 51 år gammel. I 1956 hadde han ulcus duodeni og i 1968 ulcus ventriculi. Våren 1964 merket han stadig avtagende syn på høyre øye, uten noen bestemt skygge for synsfeltet. Det gikk 1 år før han søkte øyelege, hvorefter han straks ble innlagt i Haukeland sykehus, øyevædelingen, hvor han lå i tiden 26/2–4/3–1965 under diagnosen: melanoma maligna chorioidea o.d. Øyet ble fjernet, og den histologiske diagnose viste: malignt melanom. Ved undersøkelse av denne pasient nå finnes ingen tegn til residiv eller metastaser. Han har ingen tegn til kutane melanomer, og heller ikke mange føflekker. Det er fjernet 3 nævi fra forskjellige steder på huden. Den histologiske undersøkelse viste benigne nævuscelltumores (O. Scott-Knudsen, Laboratorium for Patologi, Det Norske Radiumhospitalet).

Kasus 4: Dette er en 49 år gammel kvinne, som er gift og har 3 barn. I 1949 ble hun operert for appendicitt, ellers har hun tidligere vært frisk. Hun lå i Haugesund sykehus, kir. avd., 12/12–15/12–1958 for nævus malignus brachii sin. Hun hadde da i ca. 2 år hatt en nesten svart, dominerende tumor i huden på venstre overarm. Den hadde vokst jevnt og hadde klødd en del. Der dannet seg et sår, som blødde litt.

Ved innkomsten fantes bortsett fra nevnte tumor intet patologisk. Der ble utført exstirpatio tumoris, og den histologiske undersøkelse viste malign pigmentert nævuscelltumor (J. E f s k i n d, Laboratorium for Patologi, Det Norske Radiumhospitalet). Hun ble etter operasjonen innlagt i Radiumhospitalet, hvor hun fikk strålebehandling. Hun har senere gått til kontroll, og der har ikke vært residiv eller tegn til metastaser.

I 1966 ble det fjernet en nævistumor på høyre overarm. Den histologiske undersøkelse viste nævus av junctional type uten tegn til malignitet (E. G l ü c k, Gades Institutt, Bergen). I oktober 1968 ble det fjernet en noe mørk nævistumor på volarsiden av venstre underarm. Den histologiske undersøkelse viste overfladisk nævuscelltumor med lett atyp, oppfattet som en mulig premalign tilstand (R. S e l j e l i d, Laboratorium for Patologi, Det Norske Radiumhospitalet).

Kasus 5: Dette er en 47 år gammel, ugift mann, som har reist til sjøs som kokk. Han har tidligere vært frisk. Han har tallrike føflekker, som han mener kom i årene 1947–1948, etter at han hadde ligget og solt seg i tropene, og for 10 år siden måtte han slutte å sole seg av den grunn. I 10–12 år har han angivelig hatt 2 adskilte, sorte hudtumores på venstre skulder og en tilsvarende på ryggen. De 2 på venstre skulder som satt ganske nær hverandre, kom etter hans mening som følge av at han fikk noe kokende fett på dette sted. Der kom et skorpebelagt sår, og han hadde en skorpe her i over 1 år.

Ved undersøkelse av denne pasient fantes 3 adskilte, primære melanomer. To av dem satt ganske nær hverandre, bare adskilt med en hudbro på ca. 1/2 cm. Det var ingen tegn til lymfeknutesvulst eller til metastaser for øvrig. Pasienten hadde videre en mengde føflekker, de fleste lokalisert til

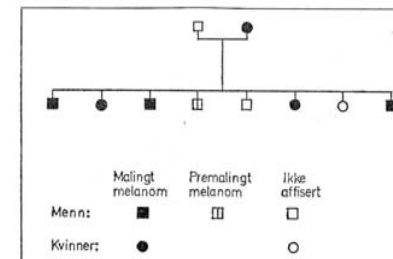


Fig. 1

Slektstavle som viser forekomsten av maligne melanomer i familien

- **1970-80s:** More than one hundred family members are traced and studied. Grimstvedt collects urine and blood samples and contacts researchers in Oslo
- **1992:** He publishes a more extensive description of the family
- **2002:** A collaboration is established with the Gade Institute, Bergen and new blood samples are collected

Dysplastisk nævussyndrom av familiær type

En familieundersøkelse

En familie med arvelig forekomst av dysplastisk nævussyndrom er fulgt gjennom 20 år og fem generasjoner. Hensikten har vært å se hvordan sykdommen arves og hvor ofte det utvikles malignt melanom fra slike føflekker, samt hva som eventuelt forårsaker denne forandringen. Videre har det vært ønsket å gi en nærmere beskrivelse av disse føflekkene. Undersøkelsen inkluderer 103 familiemedlemmer, og 59 av dem hadde dysplastisk nævussyndrom. Forekomsten var likt fordelt mellom de to kjønn. Føflekkene var aldri til stede ved fødselen. De debuterte ved barne- eller pubertetsalderen. Føflekkene atskilte seg fra vanlige føflekker ved å være uregelmessig begrenset til omgivelsene, og med store variasjoner fra føflekk til føflekk, spesielt var det fargevariasjoner. Hos ca. 20% av pasientene utviklet det seg malignt melanom fra en slik føflekk. Føflekkene ble arvet autosomt dominant, og kunne i sin tid utvikle seg til malignt melanom. Av betydning for denne utvikling har noen ganger vært solpåkverking. Aldersfaktoren synes også å spille en rolle. Pasienter med dysplastisk nævussyndrom er i faresonen for å få malignt melanom og bør passe seg for sol og nøye iakttå eventuelle forandringer av sine føflekker.

I 1969 beskrev forfatteren en familiær forekomst av maligne melanomer (1). Det ble påpekt at flere av pasientene med malignt mela-

Se redaksjonell kommentar side 868

Magne B. Grimstvedt
Strandgaten 113
5500 Haugesund

Grimstvedt MB.

Dysplastic nevus syndrome of familial type

A family study

Tidsskr Nor Lægeforen 1992; 112: 869-72

A family with heritable occurrence of dysplastic nevus syndrome has been studied through 20 years and five generations. The intention was to study how the disease is inherited, how often malignant melanomas developed from such moles, and which factors caused this change. 59 out of 103 family members had dysplastic nevus syndrome. Occurrence was distributed equally between males and females. The moles were not present at birth, but first appeared in childhood and adolescence. The moles differ clinically from common moles by being flat, irregularly coloured, and irregularly delimited in relation to the surroundings. There are also large variations between moles in the individual. 20% of the patients developed hereditary malignant melanoma from these particular moles. Dysplastic nevus syndrome was inherited autosomally dominant and might develop into malignant melanoma many years later in life. In some cases the development was provoked by sunshine. Patients who suffer from dysplastic nevus syndrome are in danger of developing malignant melanoma and should therefore be careful of exposure to sun and should regularly examine their moles for possible changes.

nom hadde noen eiendommelige føflekker, og særlig var det utpreget for én av dem, som hadde tallrike, spesielle føflekker, de fleste lokalisert til rygg og bryst. Flekkene trådte særlig tydelig frem etter at han hadde solt seg, mens han var sjømann og seilte på tropene. I samme artikkel ble det beskrevet lik-

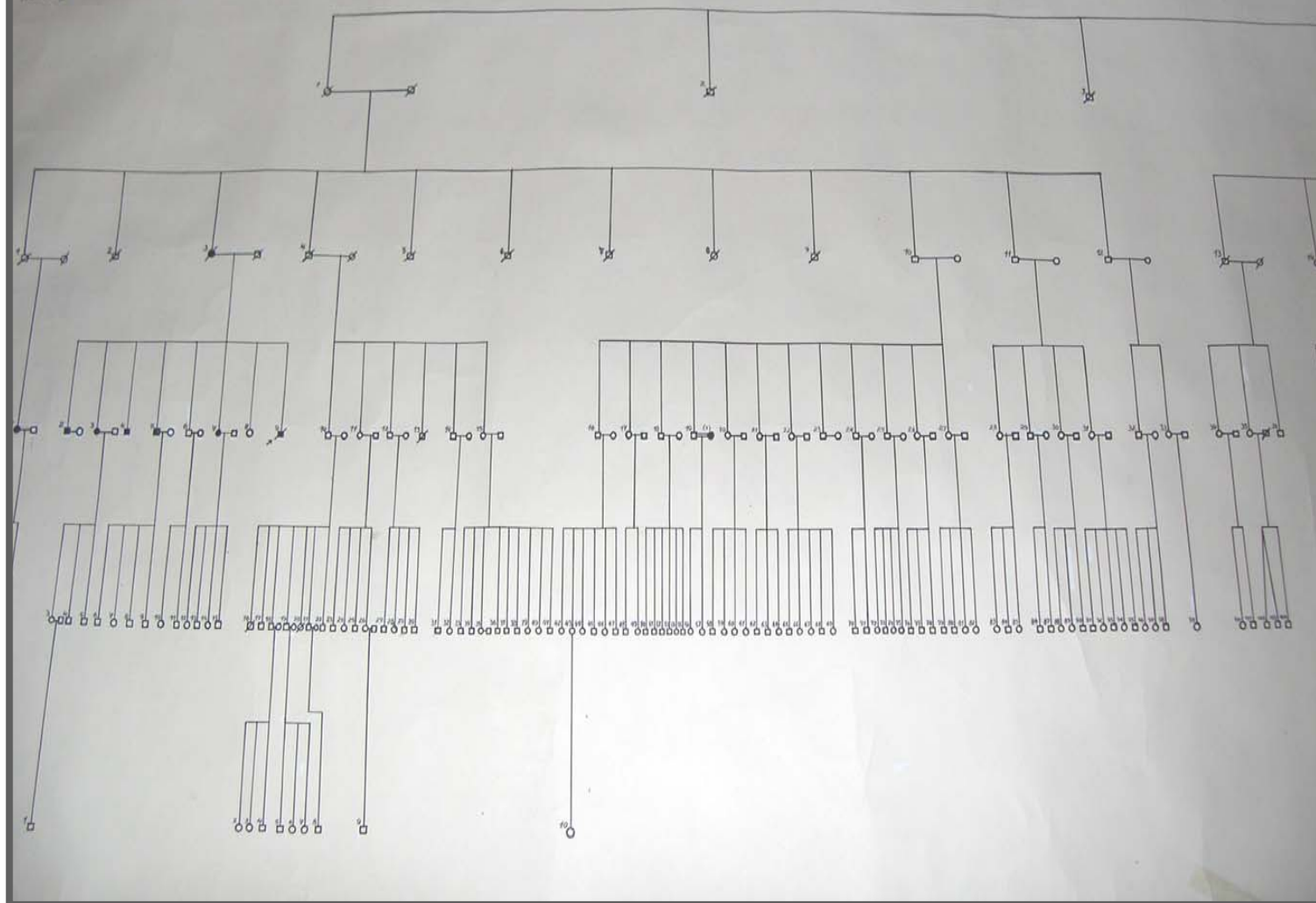
nende spesielle føflekker hos to barn av pasienter med malignt melanom. Den ene var en 19 år gammel mann, som hadde føflekker av liknende utseende og varierende størrelse. Den andre var en 17 år gammel kvinne med det samme føflekkemønster. I 1978 beskrev Clark og medarbeidere (2) spesielle føflekker, som de fant hos pasienter med hereditært malignt melanom og i pasientenes nærmeste familie. De kalte det først BK-mole syndrom etter navnene til den affiserte familie. Senere ble sykdommen kalt dysplastisk nævussyndrom. Noen kaller føflekkene dysplastiske nævi (3). I 1980 beskrev Elder og medarbeidere (4) sporadiske, ikke familiære tilfeller av dysplastisk nævussyndrom. Elder delte det dysplastiske nævussyndrom i én familiær og én sporadisk gruppe. Hensikten med det foreliggende arbeidet har vært:

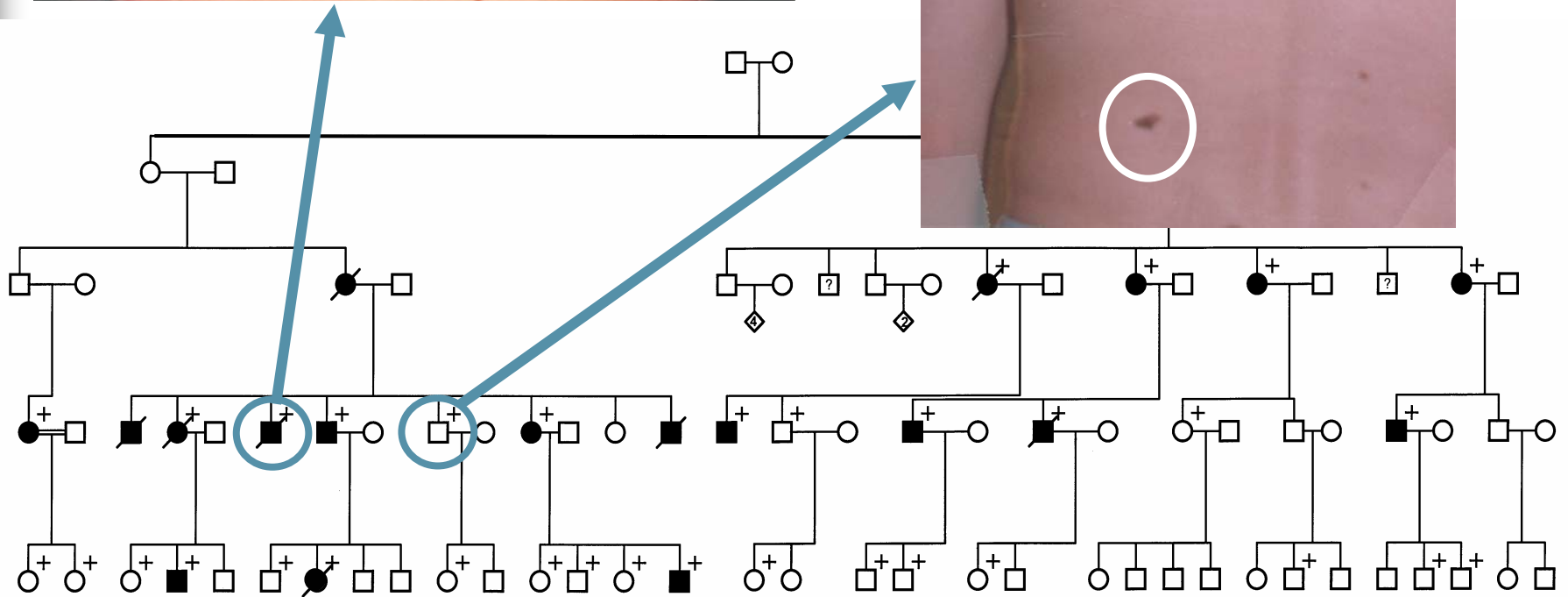
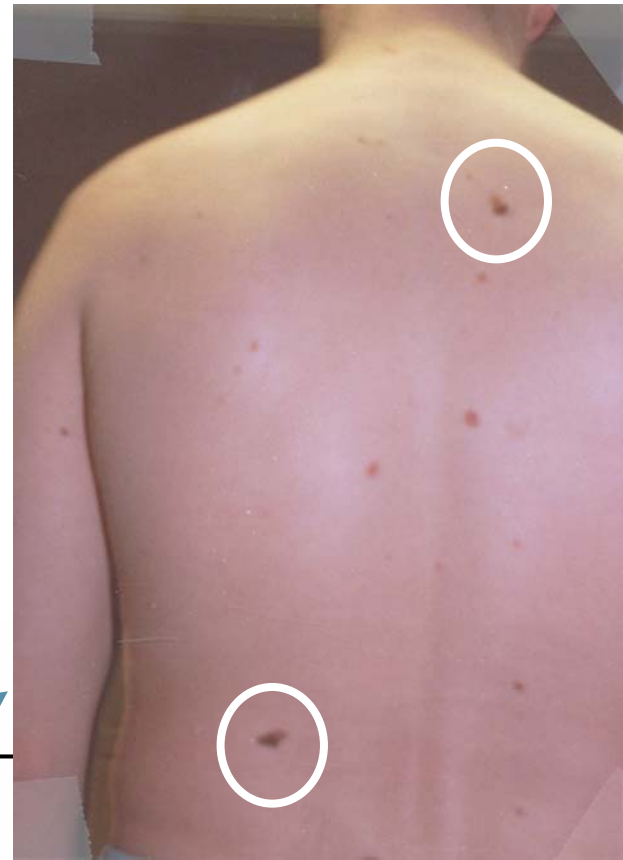
- Å beskrive forekomsten av dysplastisk nævussyndrom hos en familie som har vært fulgt gjennom 20 år
- Å beskrive det kliniske bilde av sykdommen i denne familie
- Å kartlegge risikoen for utvikling av malignt melanom ved denne tilstanden, etiologiske faktorer (arv og sol), og arvegang
- Å kartlegge hvordan dysplastisk nævussyndrom av familiær type kan tjene som markør for å finne ut hvem som er i faresonen for å få malignt melanom.

Materiale og metoder

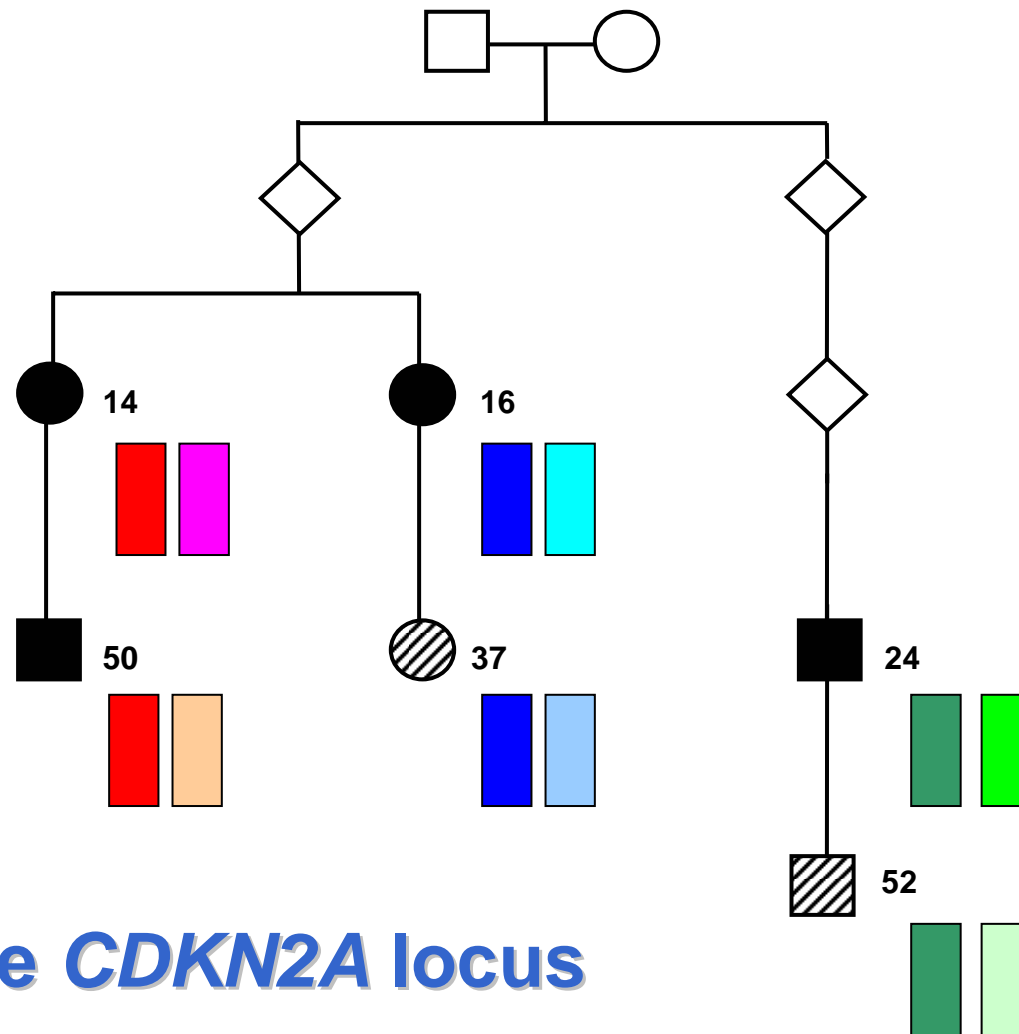
Her skal omtales en familie med opptreden av dysplastisk nævussyndrom av familiær type. Mange av familiemedlemmene har utviklet hereditært malignt melanom. Jeg beskrev de første tilfeller i 1969 (1) og har senere fulgt opp familien i 20 år. På den måten har jeg skaffet meg oversikt over medlemmer fra fem generasjoner. Stamforeldrene

Seiten $\begin{matrix} \circ & \circ & \circ \\ \circ & \circ & \circ \end{matrix}$
 Willingen $\begin{matrix} \circ & \circ \\ \circ & \circ \end{matrix}$
 Teil aus rechteckiger Seite H. H.
 Hubert $\begin{matrix} \circ & \circ \\ \circ & \circ \end{matrix}$



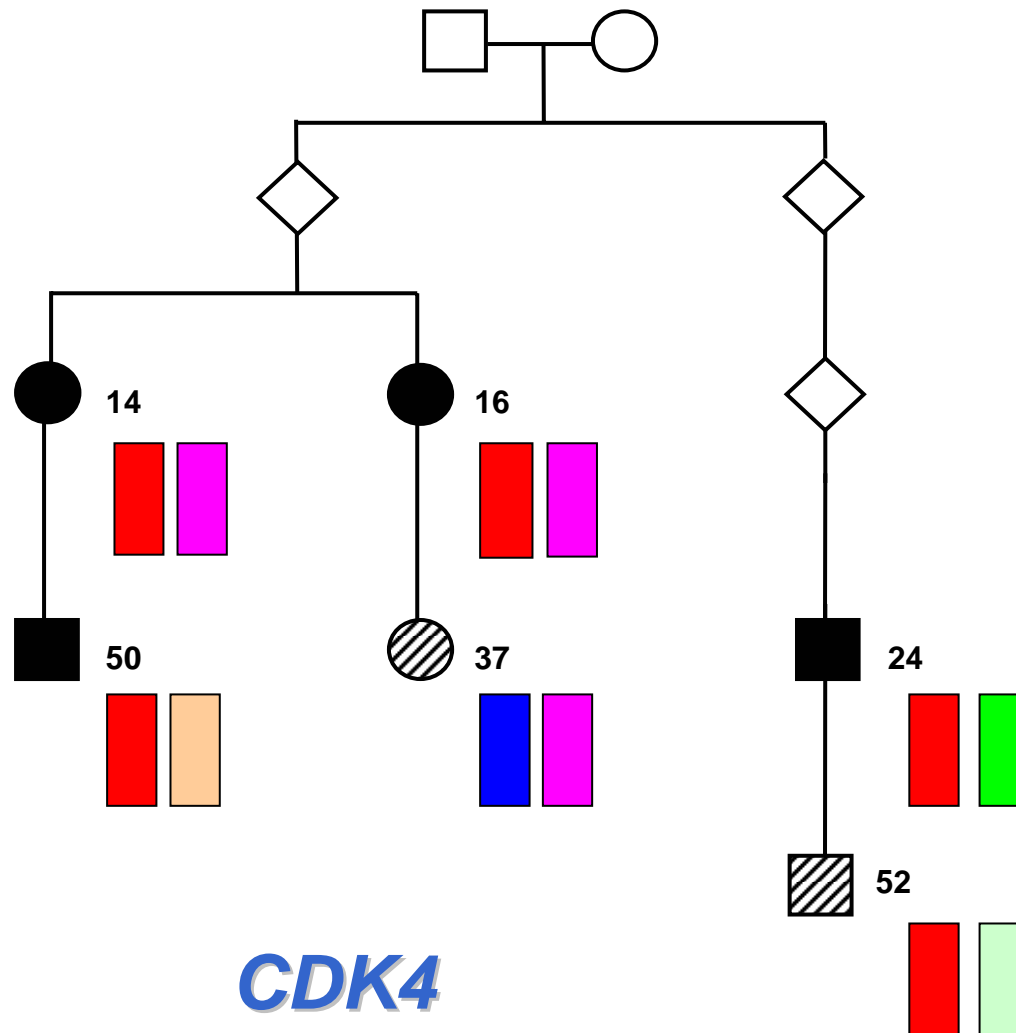


Analysis of cosegregation:

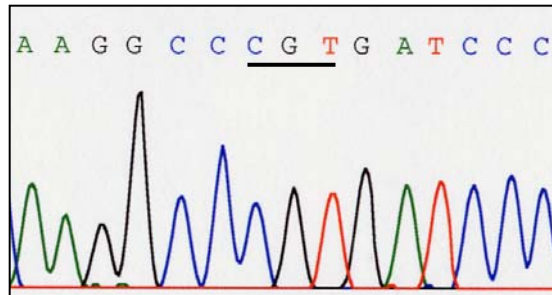


The *CDKN2A* locus

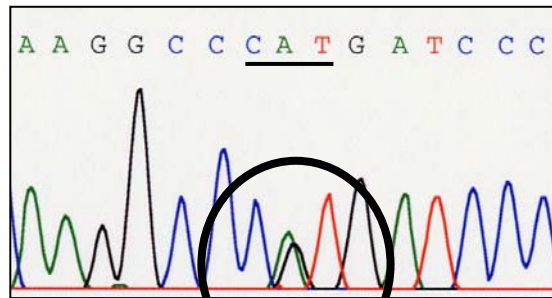
Analysis of cosegregation:



The family carries a *CDK4* mutation:



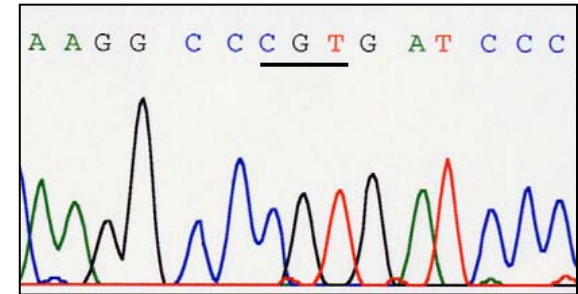
Normal
family
members



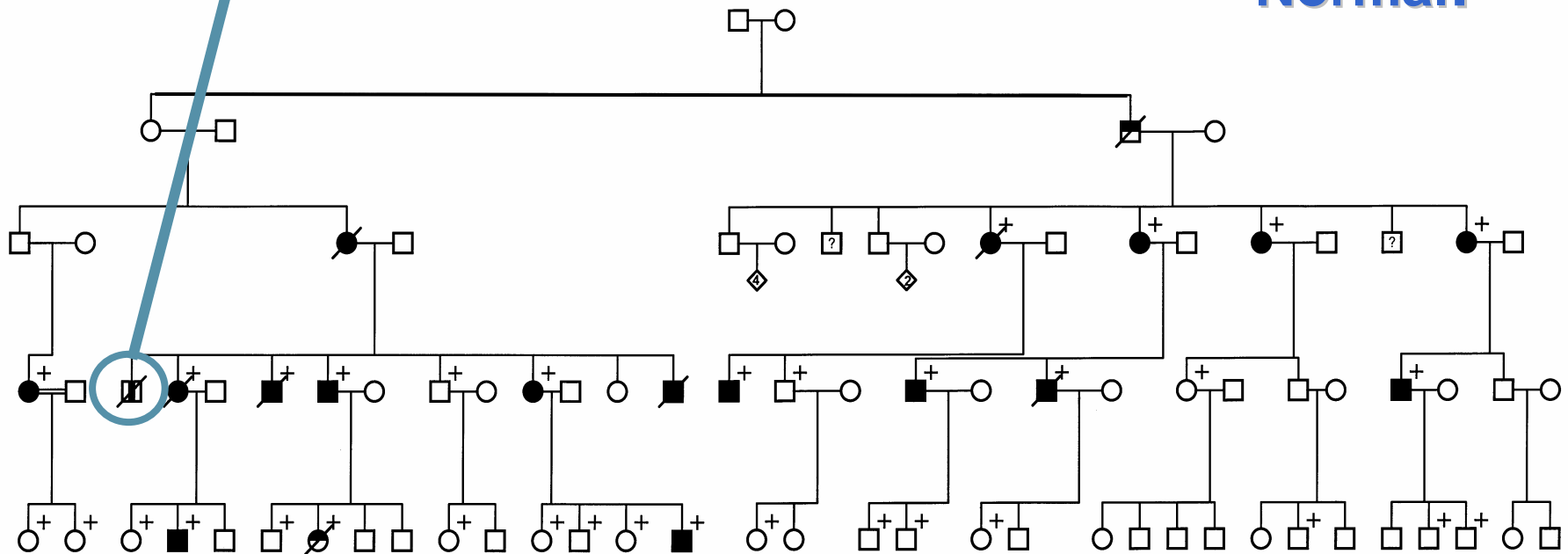
Family
members
with MM

Arg24His

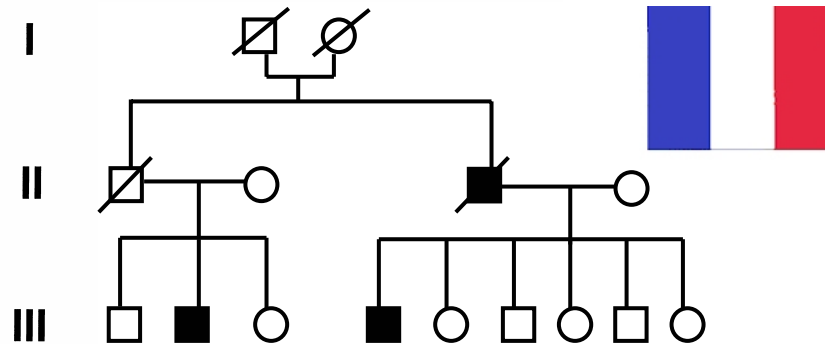
A case of eye melanoma in the family:



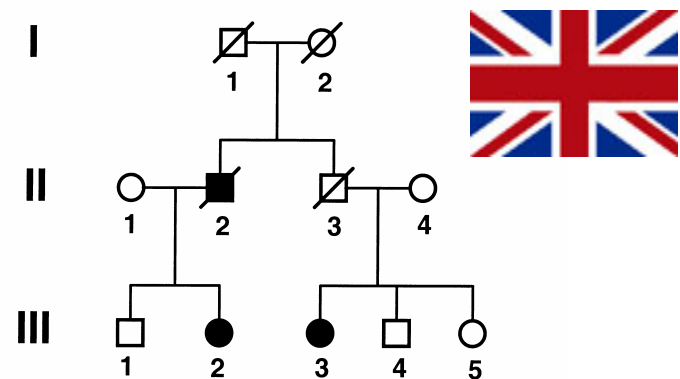
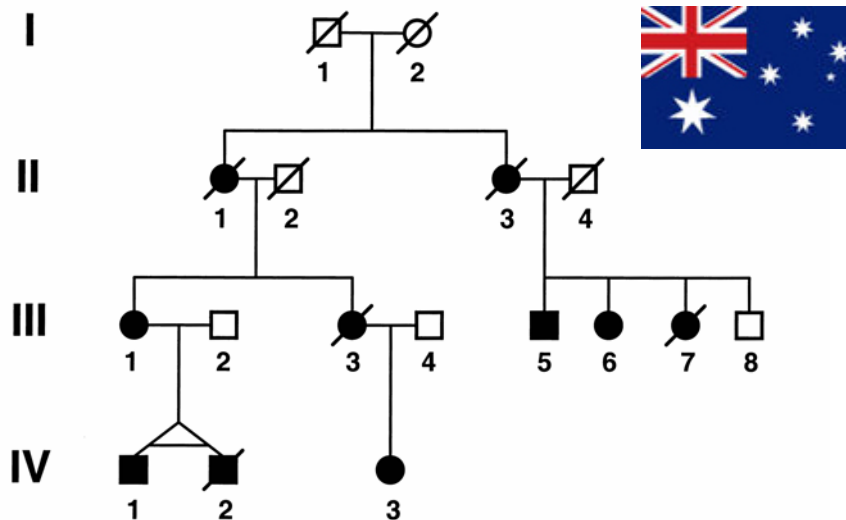
Normal!



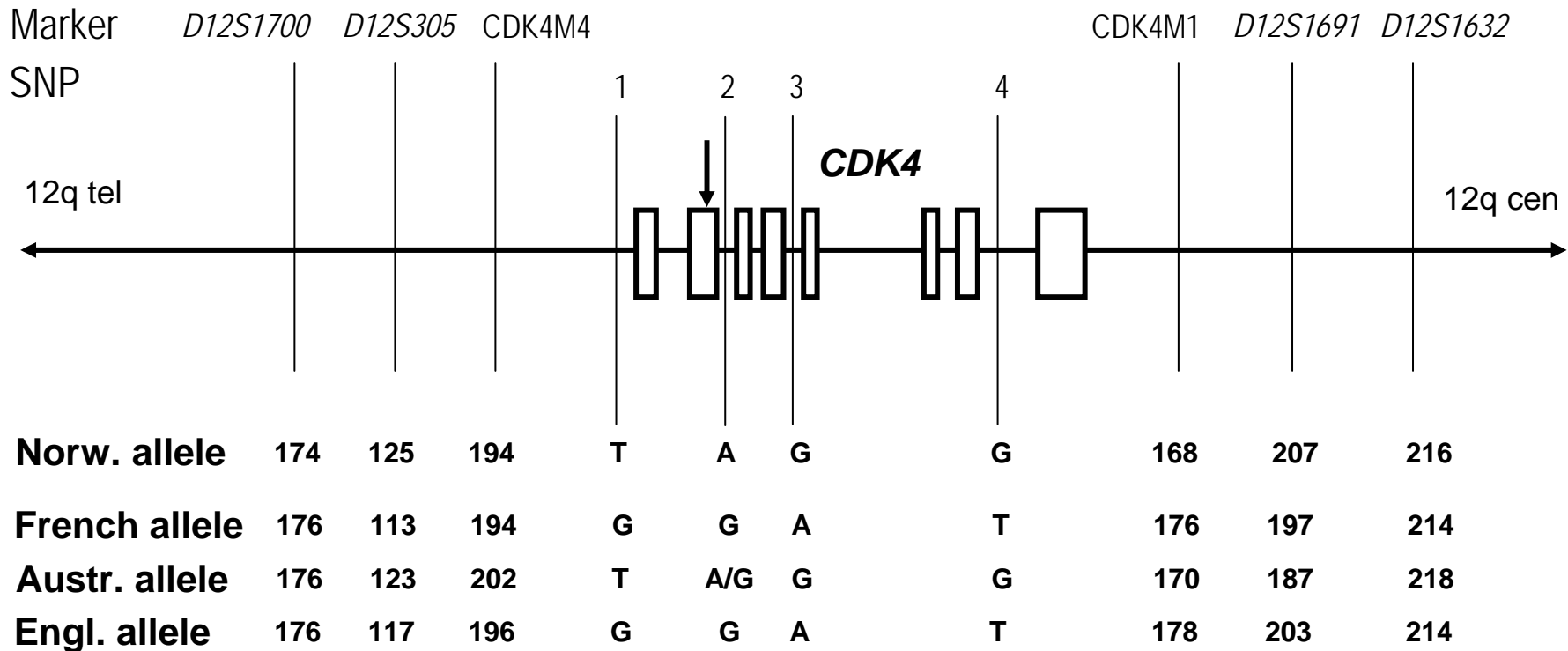
The *CDK4* mutation Arg24His has previously been found in a French family:



Soufir et al. (1998).
Human Molecular Genetics 7: 209-216



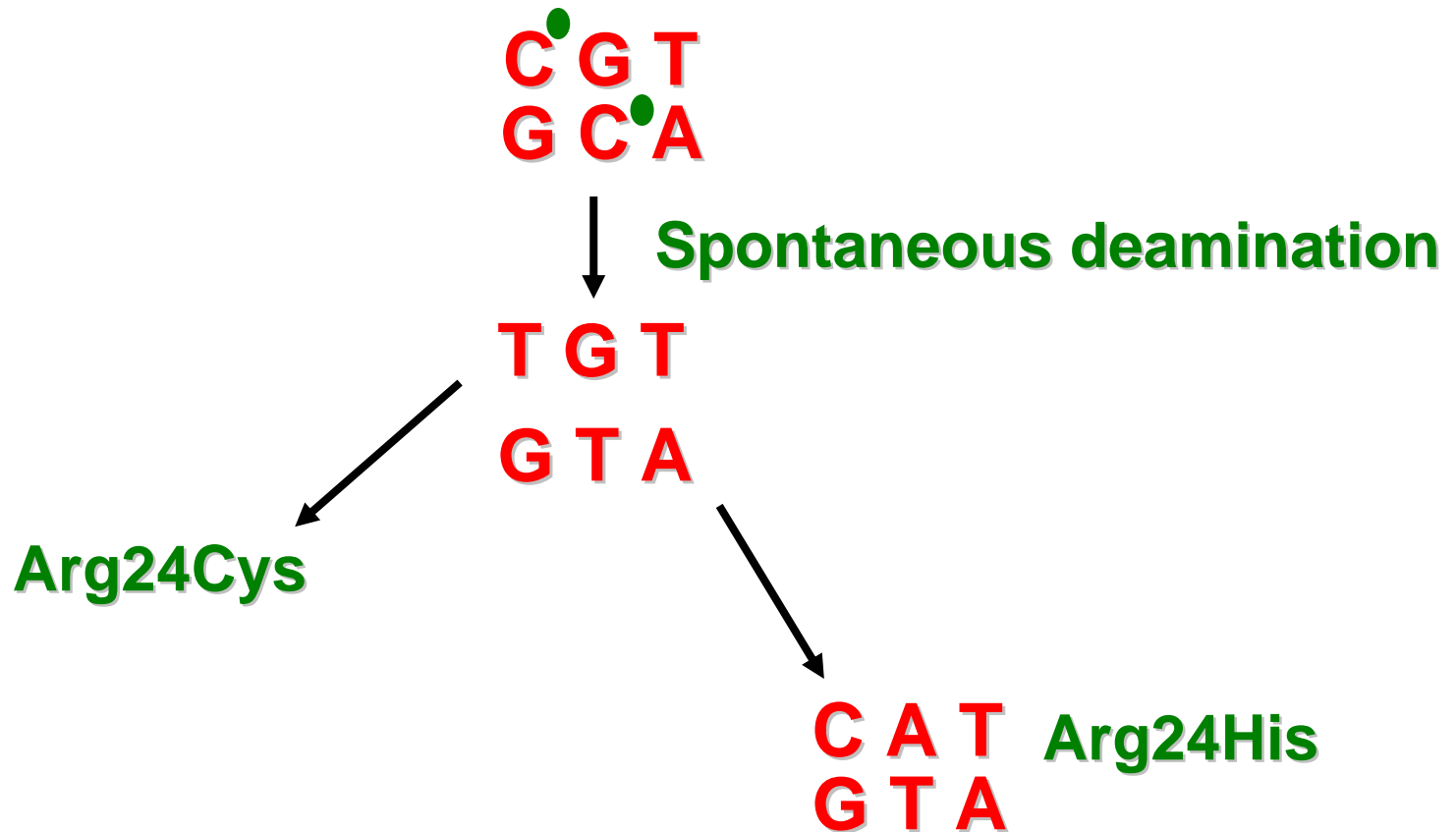
A common origin?



Arg24His

Arg24Cys

Why only codon 24?



- Mutational hotspot probably because of cytosine methylation
- Negative selection?

Acknowledgements:

- Magne B. Grimstvedt (Haugesund)
- Solrun Steine (Bergen)
- Lars A. Akslen (Bergen)
- Marie-Francoise Avril (France)
- Nick Hayward (Australia)
- Mark Harland (England)

Molven et al. (2005).

Genes, Chromosomes and Cancer 44: 10-18.

Further work:

Hudavdelingen og Senter for medisinsk
genetikk og molekylærmedisin,
Haukeland Universitetssykehus

- The family has been offered
 - genetic counselling
 - gene testing
 - evaluation and follow-up by a dermatologist

- Clinical characterization
 - frequency of atypical nevi?
 - penetrance?
 - enhanced risk for other cancers?

■ Molecular characterization

- **Biological samples (blood, normal skin, normal nevi, atypical nevi, melanomas) are collected from the family**

■ Questions

- **Can gene variants that influence the risk for atypical nevi and/or malignant melanoma in this family be identified?**
- **Is the pattern of somatic mutations in the mutation carriers' nevi and melanomas different from that of sporadic lesions?**
- **Can general gene expression changes be identified in skin biopsies/cultured fibroblasts from mutation carriers?**
- **Why do the CDK4 mutation carriers “only” get malignant melanoma?**

