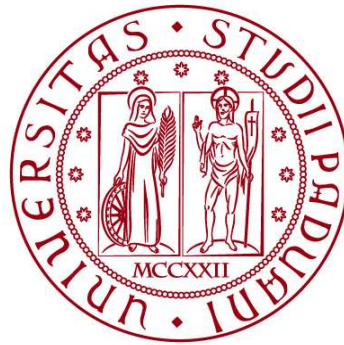


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Implicazioni del gene MAX nella neoplasia endocrina
multipla**

**Tutor: Gianluca Occhi
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Gloria Gatto

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Ringraziamenti

Prima di procedere con la trattazione vorrei dedicare alcune righe alle persone che mi hanno accompagnata in questo percorso. In primis ringrazio il mio relatore Gianluca Occhi per l'infinita disponibilità e pazienza dimostrate, per avermi fornito consigli utili e suggerimenti che mi hanno permesso di arrivare alla stesura di questo elaborato. Voglio ringraziare in particolare i miei genitori, a cui voglio dedicare la mia tesi, i quali mi hanno permesso di affrontare questi studi sostenendomi per l'intera durata di questo viaggio che senza di loro non mi sarebbe stato possibile intraprendere. Li ringrazio per non aver mai dubitato delle mie capacità e per la loro costante presenza, perché il loro aiuto e supporto si sono rivelati per me fondamentali. Ringrazio di cuore i miei nonni, che mi hanno incoraggiata ad ogni esame ed infine Arianna, Aurora, Ilaria, Laura e Syria che sono state spettatrici di questa mia riuscita e si sono rivelate delle vere amiche rimanendomi sempre vicine.

Indice

| | |
|---|-----------|
| 1.0 Abstract | 5 |
| 2.0 Introduzione..... | 6 |
| 2.1 <i>La neoplasia endocrina multipla.....</i> | <i>6</i> |
| 2.2 <i>Il gene MAX e l'asse MYC/MAX/MXD1.....</i> | <i>7</i> |
| 3.0 Materiali e metodi..... | 8 |
| 3.1 <i>Analisi genetica della linea germinale.....</i> | <i>8</i> |
| 3.2 <i>Genotipizzazione del tumore.....</i> | <i>9</i> |
| 3.3 <i>Immunoistochimica di MAX.....</i> | <i>10</i> |
| 3.4 <i>Immunoistochimica di GHRH.....</i> | <i>11</i> |
| 3.5 <i>Studi funzionali.....</i> | <i>11</i> |
| 4.0 Risultati..... | 14 |
| 4.1 <i>Analisi genetiche della linea germinale, genotipizzazione del tumore ed analisi dell'espressione genica.....</i> | <i>14</i> |
| 4.2 <i>Immunoistochimica di MAX.....</i> | <i>15</i> |
| 4.3 <i>Immunoistochimica di GHRH.....</i> | <i>15</i> |
| 4.4 <i>Studi funzionali.....</i> | <i>16</i> |
| 5.0 Discussione..... | 17 |
| 6.0 Bibliografia..... | 20 |
| 7.0 Appendice..... | 20 |

1.0 Abstract

L'obiettivo di questo lavoro è indagare la possibilità che mutazioni a carico del gene *MAX* siano responsabili dell'insorgere di feocromocitomi e paragangliomi (PPGL), tumori neuroendocrini ipofisari ed una serie di altri tumori endocrini e non endocrini, riassumibili in una nuova forma di neoplasia endocrina multipla (MEN), di tipo quinto. Per la prima volta si vanno ad associare queste mutazioni in *MAX* anche a neuroblastomi e ganglioneuromi che condividono la stessa origine dei paragangliomi e feocromocitomi dalle cellule della cresta neurale, oltre che all'associazione con adenomi alle paratiroidi, condrosarcomi ed adenocarcinomi polmonari.

Nello specifico, sono stati considerati individui appartenenti a due diverse famiglie, A e B, che presentano varianti germinali a livello di questo gene e hanno sviluppato queste tipologie di tumori.

Al fine di questa indagine sono state eseguite analisi quali la fenotipizzazione, il sequenziamento della linea germinale e del tumore, ed applicate tecniche come l'immunoistochimica ed il western blot. I risultati ottenuti attraverso questi studi hanno permesso di suggerire il gene *MAX* come agente causante la neoplasia endocrina multipla.

2.0 Introduzione

2.1 La neoplasia endocrina multipla

La sindrome della neoplasia endocrina multipla, MEN, comporta l'insorgenza di diverse tipologie di tumori endocrini, sia benigni che maligni, con localizzazione diversa all'interno dell'organismo. In particolare, possiamo distinguere quattro diverse tipologie di MEN, associate a mutazioni genetiche in almeno quattro geni diversi tutti localizzati a livello degli autosomi. Nella maggior parte dei casi si manifestano in forma sporadica, mentre in circa il 10-20% dei casi si possono trasmettere come tratti autosomici dominanti all'interno di nuclei familiari.

La neoplasia endocrina multipla di tipo 1 (MEN1) è caratterizzata dall'insorgenza di tumori che riguardano le cellule delle isole pancreatiche, le ghiandole paratiroidi a livello del collo e l'ipofisi anteriore, detta anche adenoipofisi, localizzata invece all'interno della scatola cranica, in corrispondenza di una rientranza dell'osso sfenoide. Inoltre, questa tipologia di neoplasia endocrina multipla viene spesso associata ad una inattivazione germinale dell'oncosoppressore *MEN1* (Newey PJ) situato nel cromosoma 11 codificante per una proteina, la menina, che ha un ruolo di regolazione della trascrizione, della divisione cellulare e della proliferazione (McDonnell JE, Gild ML, et al.). La mutazione germinale è la principale causa dell'insorgenza della sindrome con conseguente trasmissione alle generazioni future dell'allele mutato con una probabilità di 0.5; solo con una frequenza del 5-10% è riconducibile a mutazioni de novo. I casi di MEN1 sono 1 ogni 30000 persone e la penetranza è del 98%, tuttavia la predizione del fenotipo sulla base del genotipo non è possibile a priori in quanto non sembra esserci una vera e propria correlazione. Nel caso della neoplasia endocrina multipla di tipo 2a (MEN2a) invece si sviluppano: carcinoma midollare della tiroide, MTC, che ha origine nelle cellule parafollicolari tiroidee, feocromocitoma, un tumore delle cellule cromaffini responsabili della secrezione di catecolamine nella ghiandola surrenale e iperparatiroidismo, ovvero l'aumento della secrezione dell'ormone paratiroideo PTH da parte delle cellule paratiroidi. La frequenza è pari a 1:25000 persone. Anche nella forma 2b, i pazienti sviluppano comunemente MTC aggressivo nella fase iniziale e in circa il 50% dei casi i pazienti sviluppano feocromocitomi. A MEN2b si associano spesso neuromi mucosali della lingua, delle labbra e della palpebra e deformità muscolo-scheletriche. MEN2a e MEN2b sono causate da mutazioni nel proto-oncogene *RET*, localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma 10, e la maggior parte dei casi di MEN2b si riscontrano a seguito di

una sostituzione aminoacidica in posizione 918 (da metionina a treonina). Per quanto concerne la neoplasia endocrina multipla di tipo 4, segnalata per la prima volta nel 2006, i pazienti sviluppano perlopiù gli stessi tumori riscontrabili nella MEN di tipo 1, che mantengono tuttavia delle dimensioni più modeste ed una criticità minore (McDonnell JE, Gild ML, et al.), talvolta in associazione a tumori delle ghiandole surrenali, all'apparato riproduttore e ai reni. Questo disturbo è invece il risultato di diverse mutazioni in *CDNK1B*, la cui proteina controlla la progressione del ciclo cellulare nella fase G1, tuttavia, essendo di più recente scoperta i dati disponibili non sono molti.

2.2 Il gene *MAX* e l'asse *MYC/MAX/MXD1*

Più recentemente è stato individuato un altro gene, il gene *MAX*, (MYC associated factor X), situato nel cromosoma 14, la cui mutazione nella linea germinale potrebbe essere causa di un'altra forma di MEN che comporta la comparsa nei pazienti degli stessi tumori endocrini delle MEN descritte in precedenza, e altri tumori non endocrini, in particolare con origine dalle creste neurali. Nello specifico, in uno studio condotto su tre pazienti con feocromocitoma familiare (PCC) non correlati e privi di mutazioni nei geni associati a MEN è stata dimostrata la presenza di mutazioni germinali in *MAX*, perdita di eterozigosi nell'allele wildtype e l'assenza della proteina nel tumore. Sulla base di queste osservazioni, in questo studio è stato proposto che *MAX* agisca come un oncosoppressore.

Il gene *MAX* codifica per una proteina costitutivamente espressa, ovvero un fattore di trascrizione implicato nell'asse *MYC/MAX/MXD1*. La relazione tra i prodotti dei geni coinvolti nell'asse comporta la regolazione della proliferazione cellulare, del differenziamento, dell'angiogenesi e dell'apoptosi. Inoltre, la sua mancata regolazione è stata associata all'insorgenza di molti tumori nell'uomo (Cascón A, Robledo M). Il ruolo principale di *MAX* all'interno di questo asse è quello di oncosoppressore. Interagendo con il suo partner *MYC*, un proto-oncogene, *MAX* forma un eterodimero che può andarsi a legare nella regione promotrice di un gene, nello specifico in una sequenza di DNA target chiamata Enhancer box o E-box e questo porta all'attivazione della trascrizione; al contrario, il dimero che si forma tra *MAX* e i membri della famiglia *MXD1* ovvero *MXD1*, *MXD3*, *MXD4*, *MNT* ed *MGA* hanno l'effetto opposto ed in particolare di impedire la trascrizione legandosi allo stesso E-box.

Altri studi hanno descritto la presenza di mutazioni nel gene *MAX* anche a livello del motivo helix-loop-helix e lucine zipper con cui il

fattore di trascrizione MAX si lega al DNA ed è in grado di dare origine e stabilità ai dimeri che con esso si formano; in effetti mutazioni in questa regione cruciale sono responsabili della genesi di tumori in quanto MAX non è più in grado di regolare correttamente la trasformazione cellulare che dipende da MYC (Cascon A, Robledo M), portando ad una sua sovraespressione di fatto ricorrente in molti tumori.

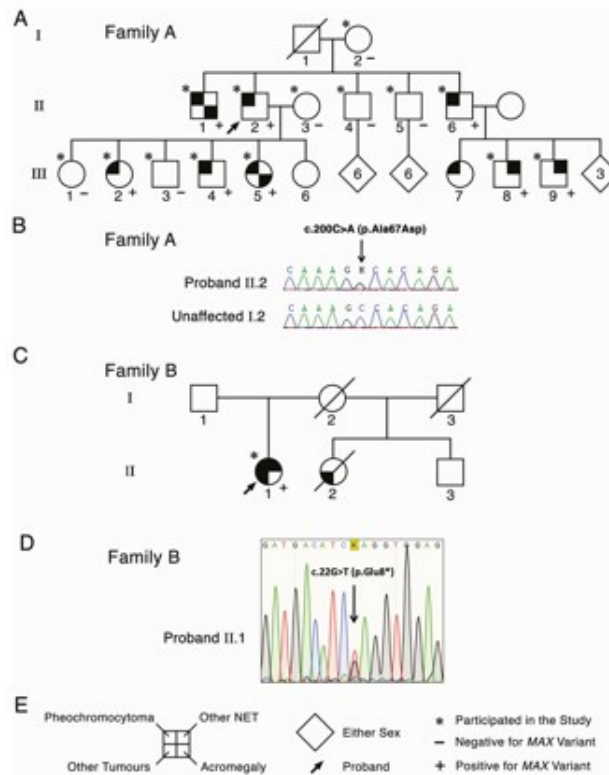
3.0 Materiali e Metodi

3.1 Analisi genetica della linea germinale

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando un kit (Qiagen) dalla saliva e dal sangue dei pazienti. Il sequenziamento dell'esoma nella famiglia A è stato eseguito prendendo come riferimento l'individuo II.2 affetto da feocromocitoma. Sono state trovate delle nuove varianti eterozigoti nelle regioni codificanti che sono state poi confermate tramite il sequenziamento Sanger, ovvero una tecnica che permette di comprendere quale sia la successione delle basi nel DNA.

Per dare inizio al sequenziamento è necessario avere innanzitutto un numero elevato di copie identiche di ssDNA, un primer ovvero un innesco che sia complementare ad una certa regione di DNA, una DNA polimerasi in grado di aggiungere gli oligonucleotidi a partire da questo innesco, dNTPs (deossinucleotidi) e i ddNTPs (dideoossinucleotidi) privi del gruppo ossidrilico al 3' necessario invece per l'aggiunta alla catena in nuova formazione del nucleotide successivo tramite legame fosfodiesterico. Vengono allestite quattro diverse reazioni, ciascuna che prevede l'aggiunta di una singola tipologia di ddNTPs che viene marcato con un isotopo radioattivo. In questo modo in ciascuna delle quattro provette presentanti ddNTPs diversi e i dNTPs la polimerasi va ad estendere il primer portando alla formazione di filamenti di lunghezze diverse a seconda di quando, in modo del tutto casuale, viene integrato il dideoossinucleotide. Si esegue successivamente una corsa elettroforetica su gel di acrilammide, in pozzetti adiacenti, con caratteristiche ideali per distinguere la lunghezza dei filamenti sulla base di un singolo nucleotide. A questo punto il gel viene trasferito in un supporto solido e analizzato mediante una lastra autoradiografica per risalire al ddNTP aggiunto per ultimo dall'enzima e di conseguenza, avendo ciascun frammento una lunghezza casuale diversa a causa dell'interruzione della polimerasi avvenuta, si è così in grado di risalire alla sequenza del DNA di interesse, complementare a quella ottenuta con questo metodo.

Nel caso della famiglia B invece è stato effettuato un sequenziamento Next-generation utilizzando un array di geni responsabili di feocromocitomi e paragangliomi e successivamente è stata eseguita un'analisi delle varianti a partire dal DNA estratto dall'individuo II.1.



In A e C sono riportati i pedigree delle due famiglie rispettivamente A e B, in B e D invece sono rappresentati gli elettroferogrammi risultanti dal sequenziamento. In E si trova la legenda.

3.2 Genotipizzazione del tumore

Per quanto riguarda la famiglia A il DNA è stato estratto dagli individui II.2, II.6 e III.5 da sezioni di tessuto di feocromocitoma e dagli individui III.8 e III.9 da neuroblastoma e ganglioneuroma, fissati in formalina ed inclusi in paraffina utilizzando un apposito kit. Successivamente sono stati eseguiti il sequenziamento Sanger e l'analisi di microarray.

La tecnologia dei microarray deriva dalla tecnica di Northern Blot. Questa tecnica consiste nell'utilizzare un supporto solido, spesso in vetro, su cui vengono depositati in posizioni precise e note delle sonde dette comunemente anche probe, oppure le stesse vengono direttamente sintetizzate nel supporto solido in maniera più precisa e riproducibile. Queste sonde risultano essere complementari ad un target che si vuole analizzare ovvero una miscela di acidi nucleici marcati con tag fluorescenti e corrispondono a geni specifici di cui si vuole analizzare l'espressione. Questa tecnica viene infatti

applicata per lo studio del livello di espressione del trascrittoma e quindi ad esempio la differente espressione in condizioni normali ed in condizioni patologiche di un gene oppure per verificare l'espressione di un gene a seguito di trattamento farmacologico, ma anche per esempio per l'individuazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), in quanto l'ibridazione tra l'acido nucleico target e la sonda può avvenire solo a seguito di perfetta complementarietà essendo quest'ultima di piccole dimensioni e permettere pertanto di risalire a seguito di rilevazione del segnale quale sia la sequenza dello SNP o permette di risalire alla presenza di duplicazioni o delezioni all'interno di una specifica sequenza target sulla base della rilevazione di un segnale preponderante derivante da un campione reference privo di mutazione (in questo caso si ha una delezione) od un target (la prevalenza di questo segnale indica la presenza di una duplicazione).

Non sono stati però eseguiti studi riguardanti la famiglia B in quanto non erano disponibili campioni di tessuto.

3.3 Immunoistochimica di MAX

L'immunoistochimica è una tecnica che permette di andare a rilevare la presenza di una specifica proteina all'interno di un tessuto di interesse grazie all'utilizzo degli anticorpi, quindi di osservarla nel suo contesto cellulare mantenendo inalterate le caratteristiche del tessuto. Gli anticorpi, infatti, sono in grado di legarsi agli antigeni, come in questo caso la proteina MAX, ed in particolare a delle regioni chiamate epitopi mediante legami non covalenti. Per rilevare la proteina di interesse dopo aver aggiunto l'anticorpo primario si aggiunge anche un secondo anticorpo, l'anticorpo secondario, in grado di riconoscere il primario. Questo secondo anticorpo viene reso rilevabile tramite la presenza di un fluoroforo oppure la rilevazione può avvenire, nel caso in cui l'anticorpo secondario sia legato ad un enzima, grazie alla metabolizzazione di un substrato da parte dell'enzima stesso che porta alla produzione di un prodotto colorato o rilascia luce. In genere si preferisce utilizzare un anticorpo secondario in quanto in questo modo si ha una sensibilità più elevata ed il segnale viene amplificato, cosa che invece non avverrebbe nel caso di un anticorpo primario marcato.

In questo lavoro la tecnica di immunoistochimica è stata utilizzata per analizzare il tessuto fissato in formalina e conservato in paraffina di neuroblastoma e ganglioneuroma degli individui della famiglia A e nel tessuto proveniente da adenoma paratiroideo e

adenocarcinoma polmonare dell'individuo della famiglia B. Per la tecnica è stato utilizzato un anticorpo policlonale c-17 anti-MAX ottenuto da coniglio ad una diluizione di 1:1000 dopo lo smascheramento dell'antigene mediante riscaldamento a 97°C per mezz'ora in una soluzione basica. I tessuti sono stati incubati per 30 minuti con l'anticorpo primario prescelto a temperatura ambiente, la rilevazione dell'anticorpo primario è stata eseguita tramite l'utilizzo di anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano che si legano in questo caso ad IgG che hanno origine da coniglio o topo. Le sezioni di tessuto sono state poi trattate con ematossilina per avere una controcolorazione. Situazioni in cui la colorazione era assente o diminuita in cellule neoplastiche e presente in cellule non neoplastiche sono state interpretate come assenza della proteina MAX, al contrario, la presenza di colorazione nelle cellule neoplastiche è stata interpretata come presenza della proteina MAX.

3.4 Immunoistochimica di GHRH

La tecnica di immunoistochimica è stata applicata per andare ad identificare la presenza dell'ormone di rilascio della somatotropina, GHRH, responsabile di stimolare il rilascio dell'ormone della crescita dall'ipofisi anteriore. A questo fine sono stati utilizzati anticorpi policlonali anti-GHRH di coniglio. In particolare, questa analisi è stata compiuta sull'individuo II.1 della famiglia B affetto da feocromocitoma. In effetti, l'eccessivo rilascio di un ormone di questo tipo sembra essere correlato all'insorgenza di adenomi ipofisari. Tra i peptidi che vengono prodotti dai feocromocitomi risulta esserci anche GHRH (Sano T, Saito H, et al.).

3.5 Studi funzionali

Il western blot è una tecnica utilizzata in biologia per verificare la presenza di una determinata proteina in una cellula a seguito della sua lisi, quindi per visualizzarla; in questo caso questa tecnica è stata usata per verificare, a seguito di separazione tra compartimento citoplasmatico e compartimento nucleare delle cellule PC12 contenenti il costrutto, in quale frazione le proteine MAX risultanti a seguito delle mutazioni sopramenzionate e marcate con l'opportuno tag fossero contenute. Le due miscele, quindi quella citoplasmatica e quella nucleare sono fatte migrare su gel di poliacrilammide, solitamente facendo un SDS page che permette di separare le proteine in un campo elettrico costante solo sulla base delle loro dimensioni e non della carica, evitando di colorare le stesse. A questo punto il gel deve essere trasferito su una membrana

di nitrocellulosa o di PVDF creando un sandwich con carta da filtro o spugna ed il tutto viene messo in uno specifico apparato che permette il trasferimento delle proteine per elettroforesi con campo elettrico perpendicolare al sandwich; a seguito della migrazione si esegue il blocking con albumina da siero bovino (BSA) o latte o gelatina per saturare la membrana ed evitare legami aspecifici dell'anticorpo. Infine, si può incubare con l'anticorpo primario diretto contro il tag della proteina di interesse, in questo caso DDK, in una soluzione specifica ovvero il tampone di binding. Successivamente si eseguono dei lavaggi per eliminare l'anticorpo non legato in eccesso e si procede con una seconda incubazione con anticorpo secondario diretto contro l'anticorpo primario che mi permetta la sua visualizzazione. Si può eseguire il western blot utilizzando esclusivamente un anticorpo primario marcato nel caso della detection diretta ma questo metodo risulta poco sensibile in quanto il segnale non viene amplificato come nel caso del metodo indiretto con anticorpo secondario marcato, in quanto questo anticorpo risulta legato ad un enzima che reagirà con un opportuno substrato andando così ad amplificare il segnale. Questa è tuttavia una procedura che richiede più tempo dato che devo incubare con due diversi anticorpi e per lo stesso motivo anche più costosa.

La valutazione dell'attività trascrizionale è stata eseguita tramite un saggio messo appunto da Comino-Méndez et al. che ha permesso di comprendere il ruolo ricoperto da MAX nell'inibire l'attività di MYC sull'E-box di CDK4, che è un target trascrizionale di c-MYC contenente sul promotore 4 siti di legame altamente conservati per MYC, inserendo anche in questo caso il costrutto ottenuto in cellule PC12 assieme al reporter della luciferasi di lucciola e renilla pRL_SV40, i lisati sono stati poi analizzati in triplicato per l'attività di queste due luciferasi e per MAX wt.

La valutazione della capacità di MAX di reprimere la trascrizione MYC-dipendente e su come la presenza di mutazioni missenso influisca sulla localizzazione della proteina MAX è stata fatta realizzando un costrutto per la variante riscontrata nella famiglia A (p.Ala67Asp) e per una seconda variante utilizzata come controllo in quanto emersa da studi precedenti (p.Met74Val) di Comino-Méndez et al, mentre non sono stati eseguiti studi di questo tipo sulla variante riscontrata nella famiglia B in quanto la mutazione che avviene nel primo esone è stato ritenuto non portasse alla formazione di un trascritto e/o alla sintesi della proteina MAX.

Nello specifico è stato utilizzato il vettore di espressione pcDNA3.1 in cui è stata inserita l'isoforma a di MAX e un tag C-terminale (DDK), tramite mutagenesi sito specifica sono state ottenute le due

varianti; pcDNA3.1 contenente solo DDK è stato invece utilizzato come controllo negativo.

Il reporter della luciferasi per valutare l'attività trascrizionale di MYC nell'E-box di CDK4 è stato generato in pGL3-basic. I costrutti sono stati transfettati in cellule PC12, naturalmente carenti di MAX, ovvero cellule derivanti da feocromocitoma della corteccia surrenale di ratto. Utilizzando il kit Qproteome Cell Compartment Kit i compartimenti citoplasmatici e nucleari sono stati separati ed è stato eseguito un western blot per verificare l'espressione di MAX wt e MAX mutante utilizzando un anticorpo anti-DDK contro il tag DDK. La completa separazione tra compartimento citoplasmatico e compartimento nucleare è stata controllata utilizzando rispettivamente anticorpi contro l' α -tubulina per quanto riguarda la frazione citoplasmatica, proteina che costituisce i microtubuli e quindi formante il citoscheletro della cellula, e l'anticorpo contro la lamina B1 per la frazione nucleare, dato che questa è una proteina che forma la lamina nucleare.

4.0 Risultati

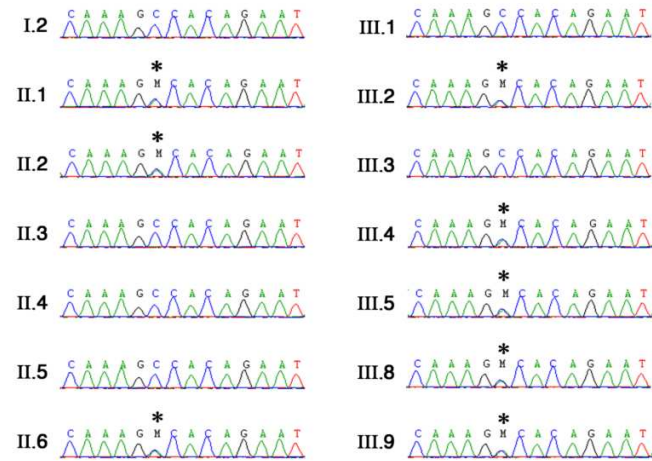
4.1 Analisi genetica della linea germinale, genotipizzazione del tumore ed analisi dell'espressione genica

Nella famiglia A grazie al sequenziamento è stato possibile risalire ad una mutazione missenso eterozigote (p.Ala67Asp), ovvero una mutazione in una singola base azotata, da C ad A, che si traduce in un codone codificante per un aminoacido diverso, ovvero da Alanina (Ala/A) ad acido aspartico (Asp/D). Questa variante confermata dal sequenziamento Sanger

segrega in tutti gli individui affetti da feocromocitoma della famiglia ed anche nei due bambini aventi neuroblastoma e ganglioneuroma.

Il DNA dell'individuo I.1 non era disponibile in quanto il soggetto era deceduto, mentre l'individuo I.2 è wt. Il sequenziamento Sanger ha dimostrato anche perdita di eterozigosi (LOH) con perdita dell'allele WT nel DNA estratto dal tumore degli individui II.2 e III.5. La scarsa qualità del DNA estratto dall'individuo III.6 ha invece precluso le analisi. L'analisi ad alta densità dei microarray per gli SNP ha dimostrato nell'individuo II.2 perdita di eterozigosi nel braccio lungo del cromosoma 14 e negli individui III.5 e III.6 in tutto il cromosoma 14. Il tessuto surrenale normale circostante invece risulta eterozigote per la variante individuata e non dimostra perdita di eterozigosi nel braccio lungo del cromosoma 14. Questa variante non era riportata in gnomAD e 1000Genomes o nei database di varianti. È stato ipotizzato trattarsi di una variante probabilmente dannosa da PolyPhen. Secondo i criteri ACMG questa variante è patologica (Seabrook AJ, Harris JE, et al.). È stato sequenziato anche il DNA degli individui III.8 e III.9 derivante da tessuto tumorale ma tuttavia non si riscontra perdita di eterozigosi. Il DNA di questi campioni è stato estratto dal tessuto fissato in formalina e conservato in paraffina, in contrasto con gli altri tumori che al contrario sono stati classificati da un istopatologo come tumori o non tumori precedentemente alla loro estrazione e che a priori ci si aspettava

3. Supplementary Figures



Supplementary Figure S1: Sanger Sequencing for Family A

contenessero un insieme di cellule normali e tumorali. A causa della scarsa qualità del DNA le analisi sulla variazione del numero di copie sono risultate inconcludenti.

Nella famiglia B è stata invece identificata una mutazione nonsense non precedentemente riportata, questo significa che la mutazione in una singola base modifica il codone codificante per un aminoacido in un codone di stop. Questa mutazione si verifica nel primo esone, ed è probabile porti ad un decadimento mediato da non senso, ovvero un meccanismo di controllo che impedisce l'espressione di proteine non corrette o tronche, oppure ad una proteina estremamente troncata che viene classificata da Mutation Taster, PolyPhen e SIFT come scatenante malattia e come probabilmente patogena secondo i criteri ACMG (Seabrook AJ, Harris JE, et al.).

4.2 Immunoistochimica di MAX

L'immunoistochimica ha dimostrato completa perdita di colorazione nelle cellule neoplastiche di feocromocitoma e paraganglioma nel tessuto surrenale estratto dagli individui II.1, II.2, II.6, III.2, III.4, III.5 e III.7 della famiglia A. la colorazione di MAX è risultata assente nelle cellule neoplastiche di neuroblastoma dell'individuo III.9, e la colorazione è risultata negativa anche nella maggior parte delle cellule gangliari di ganglioneuroma ed infine colorazione a macchie nelle cellule di Schwann del tessuto tumorale dell'individuo III.8. Non è pervenuto tessuto dalle biopsie eseguite nell'individuo II.1.

Nella famiglia B si è tentato di eseguire l'immunoistochimica di MAX nei tessuti ricavati da campioni fissati in formalina e conservati in paraffina ma non è stato possibile interpretare il risultato in quanto non si è riscontrata colorazione né nei controlli positivi né nelle cellule neoplastiche.

4.3 Immunoistochimica di GHRH

La tecnica ha dimostrato nell'individuo II.1 colorazione positiva per questa liberina nel tumore composito rimosso (feocromocitoma e paraganglioma), suggerendo che l'acromegalia sia secondaria alla secrezione ectopica di GHRH invece di un tumore ipofisario somatotropo primario. Nessun tessuto rimosso di feocromocitoma era disponibile per ulteriori analisi.

4.4 Studi funzionali

Dal western blot è emersa una completa separazione tra frazione citoplasmatica e frazione nucleare dato che la lamina b1 non è stata evidenziata dall'anticorpo specifico nella frazione citoplasmatica e l' α -tubulina al contrario non è stata rilevata nella frazione nucleare. La proteina MAX wildtype risulta essere presente in quantità maggiore nella frazione nucleare rispetto alla

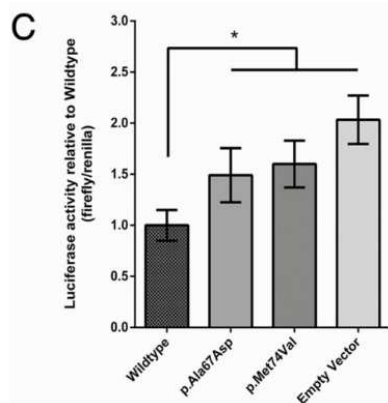
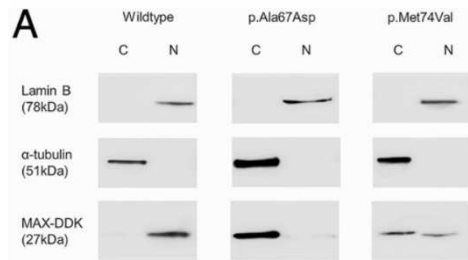


Grafico dell'attività della luciferasi di renilla e lucciola.



Western blot delle varianti MAX nella frazione citoplasmatica e nucleare.

citoplasmatica, al contrario emerge che la proteina MAX mutata è molto più presente nella frazione citoplasmatica. Ciò che emerge dal saggio con la luciferasi, invece è che il gene CDK4 è più espresso nelle cellule PC12 quando il gene MAX ha subito una mutazione e di conseguenza infatti l'attività della luciferasi stessa è più elevata che nelle cellule in cui era inserito un costrutto wt di MAX, quindi, dove il controllo di MAX sull'attività di MYC è più forte.

5.0 Discussione

Dal momento che *MAX* è un gene oncosoppressore che esercita la propria funzione su *MYC*, un proto-oncogene, non dovrebbe sorprendere che il suo scorretto funzionamento dovuto nel caso della famiglia A ad una mutazione germinale missenso nella regione che gli permette di formare omodimeri ed eterodimeri, ovvero nella regione helix-loop-helix leucine zipper che permette ai fattori di trascrizione di legarsi al DNA su cui esercitano la loro funzione, impedisca una corretta regolazione all'interno dell'asse *MYC/MAX/MXD1* e nello specifico come si dimostra grazie al saggio funzionale con la luciferasi, di controllare opportunamente l'azione di *MYC*, che agisce pertanto da oncogene essendo infatti implicato nella proliferazione cellulare e, quindi, di causare la formazione di tumori. La mutazione germinale rilevata nella famiglia B, essendo al contrario una mutazione non-senso che non produce dunque una proteina *MAX* funzionale in quanto tronca comporta ugualmente una deregolazione dello stesso asse in cui *MAX* è implicato. È noto in aggiunta, che varianti patogeniche in *MAX* portano ad uno scompenso in questo asse tale da portare ad una proliferazione cellulare incontrollata che risulta nella formazione di paragangliomi e feocromocitomi (Richter JE, Hines S, et al.), questo perché quando è presente la forma wt di *MAX*, *MYC* e *MXD1* sono tenuti sotto stretto controllo e sono incapaci come omodimeri di controllare l'espressione genica. Tuttavia, quando *MAX* presenta delle mutazioni come quelle riportate, gli eterodimeri che si formano tra *MYC* e la proteina *MAX* mutata mantengono, ciò nonostante, parte della loro attività, portando però alla formazione di queste neoplasie e quindi ricoprendo un ruolo importante nella formazione dei tumori a causa di una espressione genica incontrollata.

Come si evince dall'albero genealogico della famiglia A gli individui affetti da feocromocitoma ed altri tumori con origine neuroendocrina si riscontrano in molti soggetti della famiglia sia di sesso maschile che di sesso femminile e tutti loro presentano la mutazione germinale p.Ala67Asp nel gene *MAX*, suggerendo che a tutti gli effetti *MAX* sia un gene a propria volta implicato nella neoplasia endocrina multipla e quindi da considerare per diagnosticare questa sindrome dal momento che la presenza di una mutazione germinale in tale gene predispone con una probabilità più alta all'insorgenza di tumori rispetto a mutazioni de novo che si devono verificare su entrambi gli alleli, basti pensare che le mutazioni spontanee sono piuttosto rare e la frequenza è di circa 10^{-6} – 10^{-9} .

Osservando il pedigree è inoltre possibile notare che I.2 non presenta la mutazione germinale nel gene *MAX* e pertanto non può essere responsabile della sua trasmissione ai figli, perciò, questi ultimi la

ereditano dal padre che come riportato nella tabella 2 dell'articolo è morto improvvisamente. Si è visto che questa variante si manifesta fenotipicamente negli individui II.2 e III.5 a seguito di perdita di eterozigosi, e ciò è stato dimostrato a seguito di analisi del DNA da campioni di tumore appartenenti a questi individui, la perdita di eterozigosi non è stata però riscontrata negli individui III.8 e III.9 perciò le mutazioni nell'altro allele devono essere di altro genere affinché l'oncosoppressore venga inattivato, mentre la bassa qualità del DNA ottenuto da campioni estratti dall'individuo II.6 non ha permesso di condurre ulteriori analisi.

L'albero genealogico della famiglia B risulta essere ristretto cosa che non consente di effettuare lo studio della segregazione della mutazione identificata. Infatti, solo l'individuo II.1 è stato analizzato in questo, mentre gli altri membri della famiglia non vi hanno partecipato o sono deceduti. Ciò nonostante, che si tratti di una mutazione germinale, viene suggerito dal fatto che il soggetto svilupperà PC bilaterale già all'età di 21 anni; se così non fosse, infatti, per avere bilateralità le mutazioni de novo si sarebbero dovute manifestare su entrambi gli alleli del gene *MAX* ed a livello di entrambe le ghiandole surrenali.

Uno degli svantaggi principali nelle analisi che coinvolgono la famiglia B si è riscontrato nell'immunoistochimica di *MAX* eseguito nei tessuti di adenoma paratiroideo e carcinoma polmonare che non hanno prodotto risultati probabilmente a seguito di qualche errore nell'esecuzione della tecnica in quanto anche i controlli positivi non si sono colorati. Tuttavia, è stata eseguita la tecnica immunoistochimica per rilevare *GHRH* nel tessuto di feocromocitoma e ganglioneuroma rimosso quando il probando aveva un'età di 64 anni, mentre non è stato possibile ripetere la stessa procedura sul tessuto di feocromocitoma rimosso quando il soggetto aveva invece 21 anni.

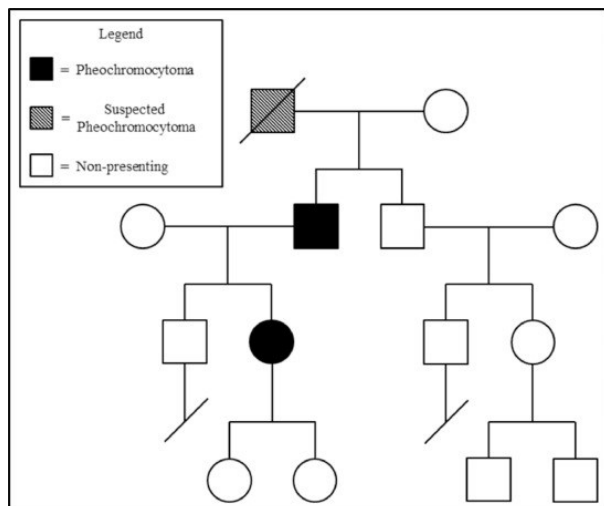
Dallo studio presente è possibile infine notare che tutti gli individui che presentano *MAX* mutato manifestano feocromocitoma che in genere si sviluppa come PC unilaterale che a distanza di qualche anno si ripresenta nell'altra ghiandola surrenale; in due individui della famiglia A (III.8 e III.9) si sono riscontrati, rispettivamente a 5 anni ganglioneuroma paravertebrale e ad 8 mesi neuroblastoma addominale ed attualmente da adulti non presentano problemi.

Nell'individuo della famiglia B II.1 si sono invece riscontrati nel decorso della sua vita un primo feocromocitoma bilaterale, successivamente condrosarcoma e microprolactinoma. In età avanzata (60 anni) inizia a soffrire di adenoma alle paratiroidi multifocale e 4 anni dopo sono diagnosticati adenocarcinoma polmonare e feocromocitoma metastatico. La sorella (II.2), che

tuttavia non ha partecipato allo studio, ha sofferto di cancro al seno e cancro al pancreas.

In questo studio nessuna delle donne che presentano una mutazione germinale in *MAX* ha avuto figli, non è pertanto possibile stabilire se vi sia una manifestazione fenotipica della mutazione solo a seguito di una trasmissione per via paterna della mutazione. In uno studio una donna (III.2) presenta la mutazione non senso (p.Q91X) e manifesta feocromocitoma esattamente come il padre (II.2) e presumibilmente il nonno, al quale la presenza di feocromocitoma potrebbe non essere stata diagnosticata. Questa donna ha attualmente due figli che

non mostrano tali tumori e gli autori suggeriscono che per verificare se vi sia effettivamente la possibilità che mutazioni in tale gene si manifestino fenotipicamente solo se ereditate dal padre sia necessario monitorare i figli una volta cresciuti (Richter JE, Hines S, et al.). A confutare questa ipotesi, tuttavia, interviene uno studio in cui viene riportato il caso di una donna di 45



Pedigree relativo ai soggetti affetti da feocromocitoma, (Richter J. E., Hines S., et al.)

anni con una mutazione (p.Arg33Ter) nel gene *MAX* a cui è stato diagnosticato un feocromocitoma. La donna ha trasmesso al figlio tale mutazione e a questo individuo è stato asportato un ganglioneuroma, tumore che sappiamo essere riconducibile a mutazioni nel gene di interesse (Chang X, Li Z, et al.).

Gli autori riassumono infine ulteriori casi di pazienti con mutazioni missenso, delezioni o riarrangiamenti nello stesso gene, rilevati in studi precedenti, in cui si manifestano nella maggior parte dei casi feocromocitoma ma anche ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma, tumore neuroendocrino dell'ipofisi come ad esempio micro o macroprolattinoma, carcinoma al seno o ai reni e iperparatiroidismo primario. Questo ci aiuta a comprendere quanto sia importante rilevare la presenza di eventuali mutazioni in *MAX* dal momento che esiste la concreta possibilità che si sviluppino diverse tipologie di tumori endocrini e non nello stesso individuo e che proprio per questo motivo è plausibile parlare di una forma di neoplasia endocrina multipla di quinto tipo.

6.0 Bibliografía

- Seabrook AJ, Harris JE, Velosa SB, Kim E, McInerney-Leo AM, Dwight T, et al.; Multiple endocrine tumor associated with germline *MAX* mutations: multiple endocrine neoplasia type 5? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021; vol. 106, No.4, 1163:1182.
- McDonnell JE, Gild ML, Clifton-Blight RJ, Robinson BG; Multiple endocrine neoplasia: an update. *International Medicine Journal*, August 2019; vol. 49(8), 954:961.
- Newey PJ; Multiple Endocrine neoplasia. *Medicine*, September 2017; vol. 45(9), 538:542.
- Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, et al.; Exome sequencing identifies *MAX* mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat. Gen.*, 2011; 43(7), 663:667.
- Sano S, Saito H, Yamasaki R, Hosoi E, Kameyama K, Saito S, et al.; Production and secretion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by pheochromocytomas. *Cancer*, May 1986; vol. 57(9), 1778:1793.
- Cascón A, Robledo M; *MAX* and *MYC*: a heritable Breakup. *Cancer Research*, July 2012.
- Richter JE jr, Hines S, Selvam P, Atwal H, Farres H, Caulfield TR, et al.; Clinical description & molecular modeling of novel *MAX* pathogenic variant causing pheochromocytoma in family, supports paternal parent-of-origin effect. *Cancer Genetics*, April 2021; vol 252-253 107:110.
- Comino-Méndez I, Leandro-García LJ, Montoya G, Inglada-Pérez L, de Cubas AA, Currás-Freixes M, et al.; Functional and in silico assessment of *MAX* variants of unknown significance. *Journal of Molecular Medicine*, June 2015; 93 1247:1255.
- Chang X, Li Z, Ma X, Cui Y, Chen S, Tong A; A novel phenotype of germline pathogenic variants in *MAX*: concurrence of pheochromocytoma and Ganglioneuroma in a chinese family and literature review. *Frontiers in endocrinology*, August 2020.

7.0 Appendice

Clinical Research Article

Multiple Endocrine Tumors Associated with Germline *MAX* Mutations: Multiple Endocrine Neoplasia Type 5?

Amanda J. Seabrook,^{1,2,*} Jessica E. Harris,^{3,*} Sofia B. Velosa,⁴ Edward Kim,^{1,2} Aileen M. McInerney-Leo,⁵ Trisha Dwight,^{1,2} Jason I. Hockings,⁶ Nicholas G. Hockings,⁷ Judy Kirk,⁸ Paul J. Leo,⁹ Amanda J. Love,¹⁰ Catherine Luxford,^{1,2} Mhairi Marshall,⁹ Ozgur Mete,^{11,12} David J. Pennisi,⁹ Matthew A. Brown,¹³ Anthony J. Gill,^{2,14,15} Gregory I. Hockings,^{16,17,†} Roderick J. Clifton-Bligh,^{1,2,18,†} and Emma L. Duncan^{9,17,19,20,†}

¹Cancer Genetics Laboratory, Kolling Institute, Royal North Shore Hospital, Sydney, NSW 2065, Australia; ²Faculty of Medicine and Health, The University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia; ³The University of Queensland Diamantina Institute, The University of Queensland, Translational Research Institute, Woolloongabba, QLD 4102, Australia; ⁴Noosa Hospital, Noosaville, QLD 4566, Australia; ⁵Dermatology Research Centre, The University of Queensland Diamantina Institute, The University of Queensland, Woolloongabba, QLD, 4102, Australia; ⁶Dandenong Hospital, Dandenong, VIC 3175, Australia; ⁷Science Department, Carey Baptist Grammar School, Kew, VIC 3101, Australia; ⁸Familial Cancer Service, Westmead Hospital, Sydney, NSW 2145, Australia; ⁹Australian Translational Genomics Centre, Institute of Health and Biomedical Innovation, School of Biomedical Sciences, Queensland University of Technology (QUT), Translational Research Institute, Woolloongabba, QLD 4102, Australia; ¹⁰Department of Endocrinology, Royal Brisbane and Women's Hospital, Herston, QLD 4029, Australia; ¹¹Department of Pathology, University Health Network, Toronto, ON M5G 2C4, Canada; ¹²Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON M5S 1A8, Canada; ¹³Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust and King's College London NIHR Biomedical Research Centre, King's College London, London WC2R 2LS, UK; ¹⁴NSW Health Pathology, Department of Anatomical Pathology, Royal North Shore Hospital, Sydney, NSW 2064, Australia; ¹⁵Cancer Diagnosis and Pathology Group, Kolling Institute of Medical Research, Royal North Shore Hospital, Sydney, NSW 2064, Australia; ¹⁶Endocrinology Unit, Greenslopes Private Hospital, Brisbane, QLD 4120, Australia; ¹⁷University of Queensland Faculty of Medicine, The University of Queensland, Brisbane, QLD, 4006, Australia; ¹⁸Department of Endocrinology, Royal North Shore Hospital, Sydney, NSW 2064, Australia; ¹⁹Department of Twin Research & Genetic Epidemiology, School of Life Course Sciences, Faculty of Life Sciences and Medicine, King's College London; St Thomas' Campus, London SE1 7EH, UK; and ²⁰Department of Endocrinology, Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust, London SE1 9RT, UK

ORCID numbers: 0000-0001-6724-8594 (A. J. Seabrook); 0000-0002-8143-4403 (E. L. Duncan).

*These 2 authors contributed equally.

†These 3 authors contributed equally.

Abbreviations: ACMG, American College of Medical Genetics; CNV, copy number variation; CT, computed tomography; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; GH, growth hormone; GHRH, growth hormone–releasing hormone; LOH, loss of heterozygosity; MAX, MYC-associated factor X; MEN, multiple endocrine neoplasia; MRI, magnetic resonance imaging;

PA, pituitary adenoma; PC, pheochromocytoma; PET, positron emission tomography; PPGL, pheochromocytoma and paraganglioma.

Received: 25 September 2020; Editorial Decision: 18 December 2020; First Published Online: 24 December 2020; Corrected and Typeset: 25 February 2021.

Abstract

Context: Pathogenic germline *MAX* variants are associated with pheochromocytoma and paraganglioma (PPGL), pituitary neuroendocrine tumors and, possibly, other endocrine and nonendocrine tumors.

Objective: To report 2 families with germline *MAX* variants, pheochromocytomas (PCs) and multiple other tumors.

Methods: Clinical, genetic, immunohistochemical, and functional studies at University hospitals in Australia on 2 families with germline *MAX* variants undergoing usual clinical care. The main outcome measures were phenotyping; germline and tumor sequencing; immunohistochemistry of PC and other tumors; functional studies of *MAX* variants.

Results: Family A has multiple individuals with PC (including bilateral and metastatic disease) and 2 children (to date, without PC) with neuroendocrine tumors (paravertebral ganglioneuroma and abdominal neuroblastoma, respectively). One individual has acromegaly; immunohistochemistry of PC tissue showed positive growth hormone-releasing hormone staining. Another individual with previously resected PCs has pituitary enlargement and elevated insulin-like growth factor (IGF-1). A germline *MAX* variant (c.200C>A, p.Ala67Asp) was identified in all individuals with PC and both children, with loss of heterozygosity in PC tissue. Immunohistochemistry showed loss of *MAX* staining in PCs and other neural crest tumors. In vitro studies confirmed the variant as loss of function. In Family B, the proband has bilateral and metastatic PC, prolactin-producing pituitary tumor, multigland parathyroid adenomas, chondrosarcoma, and multifocal pulmonary adenocarcinomas. A truncating germline *MAX* variant (c.22G>T, p.Glu8*) was identified.

Conclusion: Germline *MAX* mutations are associated with PCs, ganglioneuromas, neuroblastomas, pituitary neuroendocrine tumors, and, possibly, parathyroid adenomas, as well as nonendocrine tumors of chondrosarcoma and lung adenocarcinoma, suggesting *MAX* is a novel multiple endocrine neoplasia gene.

Key Words: pheochromocytoma, paraganglioma, *MAX* germline mutation, neuroendocrine tumor, pituitary adenoma

Pheochromocytomas and paragangliomas (PPGLs) are highly heritable tumors, with over 30% of cases carrying germline mutations in 1 of currently 16 well-characterized driver genes. Classical syndromic associations include von Hippel-Lindau syndrome, multiple endocrine neoplasia (MEN)-2, and neurofibromatosis-1, due to pathogenic variants in *VHL*, *RET*, and *NF1*, respectively; and hereditary paraganglioma syndromes types 1-5, associated with pathogenic variants in *SDHD*, *SDHAF2*, *SDHC*, *SDHB*, and *SDHA* respectively (1). Familial PPGL due to germline *TMEM127*, *MYC-associated factor X (MAX)*, and *FH* mutations are more recent discoveries; whether syndromic presentations are similarly associated with these genes is not yet established (2).

MAX was first associated with hereditary PPGL in 2011 (3). *MAX* is a transcription factor and an essential

component of the *MYC/MAX/MXD1* axis, such that *MYC-MAX* heterodimers activate, and *MAX-MXD1* (and other *MXD* family members) heterodimers repress, transcription through the same E-box DNA recognition sequences (4). The resultant equilibrium regulates cell proliferation, differentiation, angiogenesis, and apoptosis. *MYC* is a key oncogene, with overexpression evident in many tumor types, including neuroblastoma (specifically by *MYCN* amplification) (5) and *MAX*-associated PPGL (6). *MAX* mutations that prevent homo- or heterodimerization lead to a loss of repression and overactive *MYC* signaling, as *MYC* can function—at least in part—independently of *MAX* (7). Thus the major role of *MAX* in the *MYC/MAX/MXD1* axis is as a tumor suppressor gene (4) and this axis may represent a convergent

pathway for upstream mutations in other PPGL susceptibility genes (8).

Germline PPGL-associated *MAX* variants have been identified in all 5 exons, and include nonsense and missense variants as well as large deletions (3, 9-16). In common with *SDHD*- and *SDHAF2*-associated PPGL (17, 18) a parent-of-origin effect due to paternal uniparental disomy has been reported in some families (3, 5, 9, 19). *MAX*-associated PPGLs are often bilateral at presentation; and metastatic and/or asynchronous disease is common (9, 10, 20, 21). While *MAX*-associated pheochromocytomas (PCs) are classified as Cluster 2 PPGLs (ie, affecting the tyrosine kinase pathway), which typically show an adrenergic catecholamine secretory pattern, these tumors may show a mixed noradrenergic/adrenergic phenotype (8, 9).

Co-occurrence of PPGL with pituitary neuroendocrine tumor (pituitary adenoma), coined the “3PA syndrome,” was initially associated with pathogenic *SDHx* mutations (22), which remain the commonest cause of familial 3PAs (62.5-75% of cases) and of 3PAs overall (61.3%) (23). Other PPGL genes are also associated with the 3PAs, including *MEN1* and *MAX*. Seven individuals with a germline *MAX* variant, PPGL, and a pituitary neuroendocrine tumor (pituitary adenoma) have been reported (Table 1), 6 of whom had functional pituitary tumors (4 prolactinomas, 2 somatotrophinomas) (13, 15, 24); 1 study did not comment on secretory status (9). Most were managed medically; tumor tissue from the single pituitary tumor resected surgically was unavailable for immunohistochemistry or *MAX* sequencing. Thus, although a direct role of *MAX* in these pituitary neuroendocrine tumors remains conjectural, these cases suggest *MAX* may be a bona fide MEN susceptibility gene.

Other endocrine tumors have also been reported in individuals with germline *MAX* mutations and PC, including ganglioneuroma (25), ganglioneuroblastoma (16), adrenomedullary hyperplasia (26), pancreatic neuroendocrine tumors (19), and parathyroid adenomas (9, 24), as have nonendocrine tumors, including renal oncocytomas (9, 25), renal carcinomas (9, 11), breast carcinomas (9), and squamous cell tumors (9). Somatic *MAX* variants have also been reported, in lung (27, 28) and endometrial cancer (29).

In 2014 we reported a family with *MAX* mutations with PC and other neural crest tumors (30); and suggested that *MAX* mutations might cause a novel form of MEN. Petignot et al. recently (June 2020) published a family with an intragenic exon 3 deletion, in whom the affected father manifested PC and a macroprolactinoma; a low-grade pancreatic neuroendocrine tumor was identified in his son which on biopsy demonstrated loss of *MAX* nuclear staining and loss of heterozygosity (LOH) due to

uniparental disomy (19). The authors similarly suggested *MAX* mutations as the cause of a novel MEN syndrome.

Here we present clinical, genetic, immunohistochemical, and functional studies from our original family, and another individual from a separate family, both with pathogenic germline *MAX* variants, associated with bilateral/multifocal PCs and other endocrine and nonendocrine tumors. Collectively, and in concordance with the suggestion of Petignot et al. (19), the evidence suggests that *MAX* should be considered a new cause of a unique MEN syndrome.

Materials and Methods

Supplementary methods, tables, and figures are deposited online (31).

Ethics approval

Family A was recruited to a study approved by the Royal Brisbane and Women's Hospital Human Research Ethics Committee (HREC) (ref. HREC/11/QRBW/160). Participating individuals gave written informed consent and received genetic counselling pre- and postparticipation. Family B was recruited to a study approved by the Westmead Hospital HREC (ref. 2007-14). The participating individual gave written informed consent.

Phenotyping

Clinical history was obtained from participating individuals and their treating physicians. Radiological and biochemical assessments were as per clinical need (31).

Germline genetic analysis

Genomic DNA was extracted from blood or saliva, using Qiagen DNAeasy extraction kits (Qiagen, Germany). For Family A, whole exome sequencing was performed using germline DNA from Individual II.2 (Fig. 1A) and (31). Base calling, read alignment, variant calling, annotation, and quality control were as described previously (32). Heterozygous variants in coding regions of known germline and somatic PPGL genes with minor allele frequency <0.001 in public databases (eg, gnomAD) were assessed (Table S1 (31)). Sanger sequencing was used to confirm the identified variant and to determine familial segregation (primers listed in (31)). For Family B, panel sequencing was performed on germline DNA using a customized amplicon panel targeting PPGL genes (supplementary information and Table S1 (31)). Variants were analyzed using in silico tools (Provean (33), Mutation Taster (34))

Table 1. Nonpheochromocytoma/paraganglioma tumors associated with germline MAX variants

| Reference | Gender | PC/PGL presentation | Age ^a | Subsequent PC/PGL | Other diagnoses and/or comments | Variant |
|-------------------------|--------|---------------------------------------|------------------|--|--|--|
| Burnichon et al. (9) | M | Bilateral PC | 18 | Not reported | Primary hyperparathyroidism (age at diagnosis not given) | c.223C>T (p.Arg75*) |
| | M | Bilateral PC | 24 | Not reported | C-cell hyperplasia (age at diagnosis not given) | c.97C>T (p.Arg33*) |
| | M | Unilateral PC | 38 | Not reported | Squamous cell carcinoma of the tongue (age at diagnosis not given) | c.97C>T (p.Arg33*) |
| | F | Bilateral PC, 4 thoraco-abdominal PGL | 43 | Not reported | Breast carcinoma, renal oncocytoma (age at diagnoses not given) | c.73C>T (p.Arg25Trp) |
| | F | Unilateral PC | 57 | Not reported | Renal carcinoma (age at diagnosis not given) | c.103C>T (p.Arg35Cys) |
| | M | Multiple PC | 57 | Not reported | Pituitary neuroendocrine tumor (pituitary adenoma): size, secretory behavior and age at diagnosis not given | c.220A>G (p. Met74Val) |
| Korpershoek et al. (25) | M | Bilateral PC | 28 | Recurrent PC, diagnosed at age 46 years, initially thought unilateral, however, unilateral adrenalectomy noncurative; metastatic composite PC/ganglioneuroma tumor diagnosed at age 47 years | Ganglioneuroma as part of composite metastatic tumor, diagnosed aged 47 years (also had beta thalassemia, sibling of individual below) | Complex MAX deletions and rearrangement (large (445 kb) deletion encompassing MAX promoter areas and exons 1 and 2, and FUT9; 62 bp intronic deletion; 113 bp region duplicated and translocated in deleted region). |
| | M | Bilateral PC | 45 | No | Renal oncocytoma diagnosed contemporaneously with bilateral PC (N.B.: negative MAX staining on immunohistochemistry), erythrocytosis, (also had beta thalassemia, no JAK2 mutation identified) | As above |
| Roszko et al. (24) | F | Bilateral PC | 49 | No | Pituitary neuroendocrine tumor (macroprolactinoma) presented aged 49 (4 months before PC diagnosis). Mild primary hyperparathyroidism (resolved following resection of PC) | c.296-1G>T (disrupting a canonical splice site acceptor site) |
| Daly et al. (13) | M | Bilateral PC | 22 | Metastatic PC | Pituitary neuroendocrine tumor (GH-secreting macroadenoma), diagnosed aged 16 years | Exon 1-3 del |
| | M | Unilateral PC | 32 | Recurrence of unilateral PC, diagnosed age 50 | Pituitary neuroendocrine tumor (microprolactinoma), diagnosed aged 49 years | Exon 3 del |
| | F | Bilateral PC | 35 | No | Pituitary neuroendocrine tumor (GH-secreting macroadenoma), diagnosed aged 26 years; papillary thyroid cancer, diagnosed aged 35 years (N.B.: PTC heterozygous for MAX deletion and positive MAX staining on IHC; PCs homozygous for MAX deletion with negative MAX IHC) | Exon 4 del |

Table 1. Continued

| Reference | Gender | PC/PGL presentation | Age ^a | Subsequent PC/PGL | Other diagnoses and/or comments | Variant |
|----------------------|--------|-----------------------------------|------------------|---|---|----------------------------|
| Kobza et al. (15) | F | Bilateral PC | 39 | Contralateral PC, diagnosed at age 50 years | Pituitary neuroendocrine tumor (microprolactinoma), diagnosed at age 33 years | c.171 + 2T>A |
| Petignot et al. (19) | M | (no PPGL to date) | | | Pancreatic neuroendocrine tumor (no functional information), diagnosed age 32 years | Intragenic exon 3 deletion |
| Pozza et al. (16) | F | Composite PC-ganglioneuroblastoma | 15 | PGL, diagnosed at age 20 years; contralateral PC, diagnosed at age 28 years | Ganglioneuroblastoma diagnosed at age 11 months (including lymph node metastases); ganglioneuroblastoma re-presented as part of composite tumor with PC, at age 15 years | c.299G>C (p.Arg100Pro) |
| Current study | M | Bilateral PC | 21 | Recurrent unilateral PC at age 24 years; bilateral lesions medial to renal hilum reported as PC at age 42 years; metastatic abdominal disease diagnosed at age 61 years | Acromegaly with pituitary changes “consistent with but not diagnostic of somatotrophinoma” contemporaneously with first presentation with PC | c.200C>A (p.Ala67Asp) |
| | M | To date, not evident | — | | Paravertebral ganglioneuroma, diagnosed aged 5 years | c.200C>A, (p.Ala67Asp) |
| | M | To date, not evident | — | | Abdominal neuroblastoma, diagnosed aged 8 months | c.200C>A (p.Ala67Asp) |
| | F | Bilateral PC | 21 | Metastatic PC, diagnosed at age 64 years | Pituitary neuroendocrine tumor (micro-prolactinoma), diagnosed at age 34 years; thoracic chondrosarcoma, diagnosed at age 34 years; multifocal parathyroid adenomas, diagnosed at age 60 years; multifocal lung adenocarcinoma, diagnosed at age 64 years | c.22G>T (p.Glu8*) |

Abbreviations: M, male; F, female; PC, pheochromocytoma; PGL, paraganglioma; IHC, immunohistochemistry; NMD, nonsense mediated decay; KB, kilobase; BP, base pair.

^aAge at time of first diagnosis of pheochromocytoma/paraganglioma biochemically, radiologically and/or histologically, rather than at symptom onset.

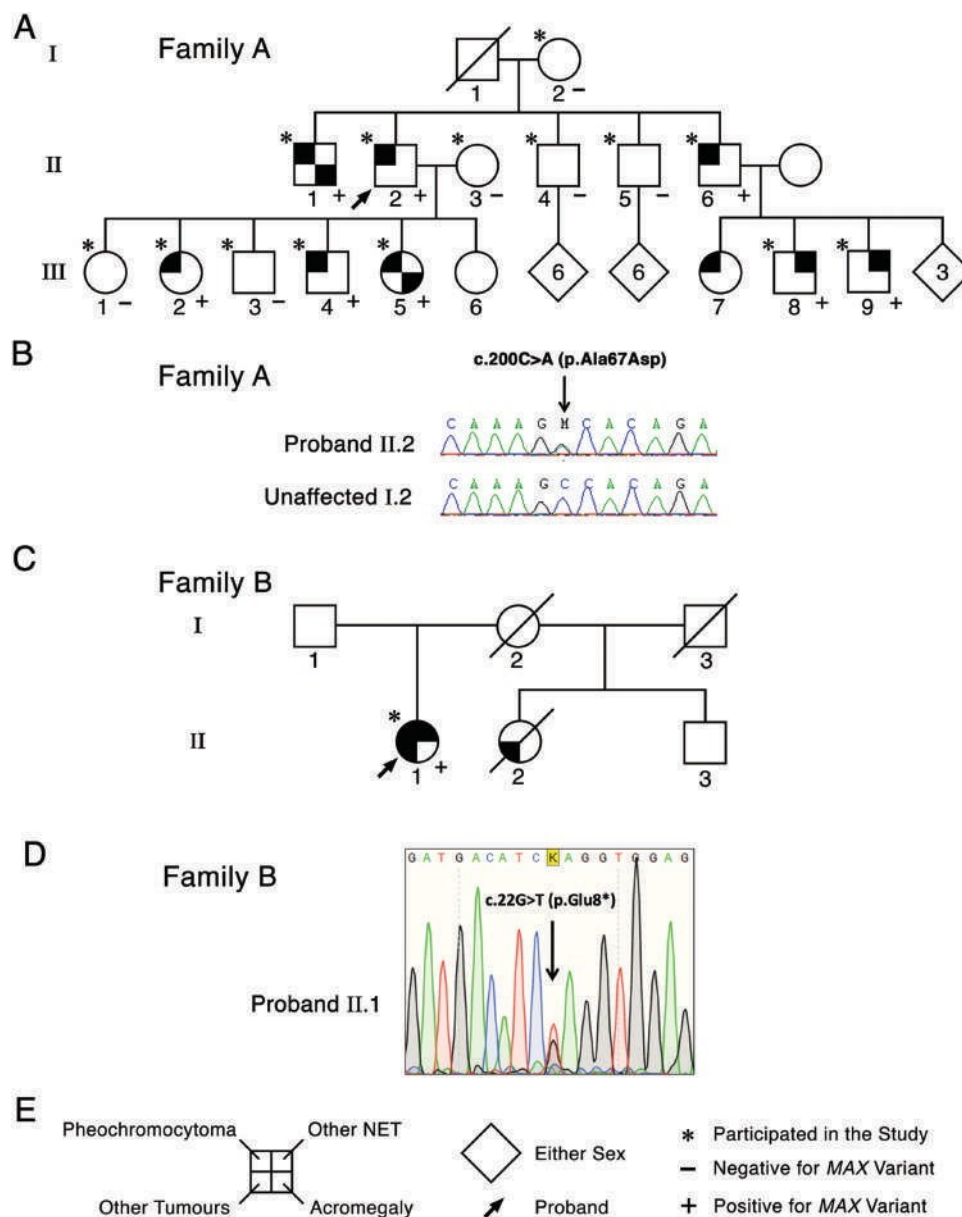


Figure 1. Pedigree and variant identification. (A) Pedigree of Family A. (B) Electropherogram of MAX variant in Family A. (C) Pedigree of Family B. (D) Electropherogram of MAX variant in Family B. (E) Legend.

and classified according to American College of Medical Genetics (ACMG) criteria (35).

Tumor genotyping

DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections of PCs from individuals II.2, II.6, III.5 and neuroblastoma and ganglioneuroma tissue from individuals III.8 and III.9, using the QiaAmp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Germany). Sanger sequencing and micro-array analysis was performed, assessing for LOH and copy number variation (CNV) (supplementary information (31)). No tissue samples were available from Family

B. Gene expression profiling was performed, as described previously (36), on tumor samples from Family A individuals II.2, II.6, and III.5.

MAX immunohistochemistry

Immunohistochemistry assessing MAX expression was performed on FFPE tissue sections from PC, neuroblastoma, and ganglioneuroma tumors from individuals in Family A, and on parathyroid adenoma and lung adenocarcinoma in the individual from Family B, using a commercially available rabbit anti-MAX1 polyclonal antibody C-17 (cat no: sc-197, Santa Cruz Biotechnology)

at a dilution of 1 in 1000 after heat induced epitope retrieval in alkaline solution for 30 minutes at 97°C (details in (31)).

Growth hormone-releasing hormone immunohistochemistry

Immunohistochemistry assessing growth hormone-releasing hormone (GHRH) expression was assessed in tumor tissue from individual II.1, using a commercially available rabbit anti-GHRH (human) polyclonal antibody (cat no: T-4061, Peninsula Laboratories International, INC), applying a UHN diagnostic immunohistochemistry laboratory protocol that was optimized for use in a Ventana Benchmark automated stainer. Appropriate positive and negative controls are also used.

Functional studies

The effects of the missense *MAX* variant on intracellular localization and ability to repress MYC-dependent transcription were assessed (detailed in (31)). Briefly, constructs for the variant, and for a previously published variant (c.220A>G, p.Met74Val (6)) were created using site-directed mutagenesis in an pcDNA3.1 expression vector containing *MAX* isoform-a and C-terminus DYKDDDDK (DDK) (Genescript (#OHu16927D, Piscataway, NJ, USA). Luciferase reporter for MYC transcriptional activity on a CDK4 E-box promoter was generated in pGL3-basic (Promega, Madison, WI, USA) as described by Hermeking et al. (37).

To assess intracellular localization, wild type (WT) or mutant *MAX* constructs, or empty vector, were transfected into PC12 cells (which are natively *MAX* deficient (38)) then cytosolic and nuclear compartments fractionated using Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen, Darmstadt, Germany). Expression of WT and mutant *MAX* was assessed by Western blotting using anti-DDK antibody (#TA50011, Origene, Rockville, MD, USA); protein loading and purity of extracted cellular compartments were confirmed by alpha-tubulin antibody (#Ab7291, Abcam, Cambridge, UK) for cytosolic fractions and lamin B1 antibody (#Ab16048, Abcam, Cambridge, UK) for nuclear fractions.

To assess transcriptional activity, the functional assay described by Comino-Méndez et al. (6) was used to study inhibition of MYC-dependent CDK4 E-box transcriptional activation by *MAX*. Expression constructs were transfected into PC12 cells (as above, natively *MAX* deficient) (38) together with the luciferase reporter and pRL_SV40 renilla reporter. Lysates were assayed in triplicate for firefly and

renilla luciferase activity, and fold-change calculated relative to WT *MAX* (31).

As the *MAX* variant in Family B (c.22G>T, p.Glu8*) is an early truncating variant in exon 1 it was thought unlikely to generate any transcript and/or functional protein; formal functional studies of this variant were not undertaken.

Results

Clinical details

Family A

This family's pedigree is presented in Fig. 1A and their clinical details (including biochemical and radiological findings) in Table 2.

The father (I.1) died unexpectedly, aged 64 years. The mother (I.2) is well.

The eldest son (II.1) presented with hypertension aged 20 years. A right-sided pheochromocytoma was resected, along with a left 'extra-adrenal pheochromocytoma' unsuspected pre-operatively. Hypercalcemia was evident preoperatively, resolving spontaneously postoperatively. Concomitantly he was diagnosed with acromegaly, due to typical clinical appearance and visual field impairment. Computed tomography (CT) of the brain was reported as showing a pituitary macroadenoma, and clinical correspondence detailed a biopsy result as showing "a histological appearance consistent with but not diagnostic of a pituitary adenoma." Cryogenic hypophysectomy was performed shortly (<6 months) after his abdominal surgery (neither imaging nor biopsy available for review). At review a year later, hypertension had resolved; however, urinary catecholamines remained elevated. Additionally, he had persistent clinical and biochemical evidence of acromegaly; and bromocriptine was commenced. At age 24 years, he represented with hypertension and sweating; a left PC was resected. At age 42 years, he again presented with worsening hypertension; "bilateral para-aortic PCs" were resected. No details are available regarding postoperative catecholamine and/or growth hormone (GH) levels after any of these procedures. At age 61 years he represented with sweating, hypertension, palpitations, and clear clinical and biochemical features of acromegaly. Claustrophobia precluded magnetic resonance imaging (MRI); a dedicated pituitary CT scan did not show evidence of a pituitary adenoma. A right-sided abdominal mass with 4 additional abdominal foci was identified; surgery was attempted but the lesions proved irresectable. Histologically, histopathology of debulked tissue showed a composite tumor (mixed PC and ganglioneuroma). Currently he has clinical and biochemical evidence of both catecholamine and GH excess, and remains on alpha and beta blockade, somatostatin

Table 2. Clinical features of families A and B

| Individual | Age at presentation (years) | Symptoms and/or signs | PPGL | Catecholamine profile ^a | Other clinical features | Other biochemical features | Radionuclide imaging | MAX Immunohistochemistry |
|-----------------|-----------------------------|--|---|--|-------------------------|---|---|--------------------------|
| Family A | | | | | | | | |
| I.1 | 64 | Sudden death | [not assessed] | — | — | — | — | N/A |
| II.1 | 20 | Hypertension, retinal hemorrhage, diaphoresis | Right PC, left “para-aortic” PG | “24-hr urine VMA and free catecholamines extremely elevated” (clinical correspondence) | Acromegaly | Hypercalcemia GH “elevated” (from clinical correspondence) | N/A | Not available |
| | 24 | Hypertension | Left PC | “Elevated urinary catecholamines” (clinical correspondence) | | | | Not available |
| | 42 | Hypertension with moderate concentric left ventricular hypertrophy | Bilateral lesions medial to each renal hilum (reported histologically as PC) | uNE 15-fold ULN uE 1.1-fold ULN | | | MIBG-avid PC bilaterally | Not available |
| | 61 | Hypertension, diaphoresis, palpitations, acromegalic features | Right abdominal lesion (composite lesion of PC/ganglioneuroma) with abdominal lymph node metastases | pNM 2.1-fold ULN uNM 2.8-fold ULN uNE 1.6-fold ULN | Acromegaly | GH excess IGF-1 elevation Secondary hypogonadism | No MIBG uptake F-DOPA-avid abdominal lesions adjacent to adrenal bed Ga ⁶⁸ -DOTATATE-avidity in R adrenal bed and multilevel nodal disease | Loss of staining |
| | 37 | Hypertension, diaphoresis, and headaches. | Right PC (resected at age 42) | uNE 7.2-fold ULN | | | MIBG-avid PC | Loss of staining |
| II.2 | 52 | Recurrent hypertension | Left PC | pNM 1.2-fold ULN uNM 1.6-fold ULN uNE 1.2-fold ULN | | | MIBG-avid PC | Loss of staining |

Table 2. Continued

| Individual | Age at presentation (years) | Symptoms and/or signs | PPGL | Catecholamine profile ^a | Other clinical features | Other biochemical features | Radionuclide imaging | MAX Immunohistochemistry |
|------------|-----------------------------|---|--|--|-------------------------|----------------------------|---|--------------------------|
| II.6 | 50 | Severe hypertension | Right PC | pNM 94-fold ULN pM 2.6-fold ULN uNE 30-fold ULN uE 2.5-fold ULN | | | MIBG-avid PC | Loss of staining |
| | 51 | Hypertension and abdominal pain | Nodal and bony metastases above and below the diaphragm (cervical, supraclavicular, axillary, thoracic, mediastinal, para-aortic/paracaval, portocaval lymph node metastases and left 8th rib bone metastasis) | uNE 15-fold ULN p NM 15-fold ULN | | | Ga ⁶⁸ -DOTATATE—avidity for all nodal and bone metastases Some metastases avid for fluorodeoxyglucose and/or MIBG | N/A |
| III.2 | 23 | Ischemic chest pain, palpitations, diaphoresis, faintness, labile hypertension. Coronary artery spasm identified on coronary angiography. | Left PC | uNE 5.9-fold ULN uE 9.9-fold ULN uDOPA 1.9-fold ULN | | | MIBG-avid PC | Loss of staining |
| | 33 | Palpitations | Right PC Recurrent disease in left adrenal bed (not resected) | Details unavailable (moved interstate) | | | MIBG-avid right PC only | Not available |
| | 36 | Occasional palpitations, sweats, postural hypotension | Left adrenal bed recurrence | pNM “marginally elevated” (details unavailable) | | | Ga ⁶⁸ -DOTATATE- avid nodule(s), left adrenal bed | |

Table 2. Continued

| Individual | Age at presentation (years) | Symptoms and/or signs | PPGL | Catecholamine profile ^a | Other clinical features | Other biochemical features | Radionuclide imaging | MAX Immunohistochemistry |
|------------|-----------------------------|--|--|--|--|---|---|--------------------------|
| | 38 | Occasional tremors, sweats | Left adrenal bed recurrence, anterior cervical lesion, awaiting surgery (?metastatic disease ?other) | "mildly elevated" pNM (further details unavailable) | | | Two Ga ⁶⁸ -DOTATATE-avid nodules left adrenal bed, one Ga ⁶⁸ -DOTATATE-avid lesion inferior to lower pole left thyroid lobe | Awaiting surgery |
| III.4 | 30 | Hypertension | One right and 2 left PC (synchronous disease) | uNE 2.5-fold ULN pNM 6.7-fold ULN | | | Ga ⁶⁸ -DOTATATE-avid PC. | Loss of staining |
| III.5 | 14 | Headaches, hypertension | Left PC | uNE 13-fold ULN pNM 10-fold ULN uDOPA 3.5-fold ULN | Bilateral polydactyly affecting both hands and feet; facial port-wine stain and a pigmented naevus on hip. | Intermittently elevated IGF-1 levels both pre- and post-adrenalectomy, normal GH suppression on OGTT, no symptoms or signs of GH excess | No MIBG uptake F-DOPA-avid PC | Loss of staining |
| | 21 | Climbing catecholamines detected during routine monitoring | Right PC Two additional abdominal foci with F-DOPA avidity not identified at surgery, not evident on other imaging modalities since | mNE 3.9-fold ULN uNM 3.7-fold ULN uNE 4.8-fold ULN | Acromegaly | Intermittently elevated IGF-1 levels both pre- and post- (second) adrenalectomy Normal GH suppression on OGTT No symptoms or signs of GH excess | No MIBG uptake F-DOPA-avid PC and two abdominal lesions (?lymph nodes ?PG) | Loss of staining |

Table 2. Continued

| Individual | Age at presentation (years) | Symptoms and/or signs | PPGL | Catecholamine profile ^a | Other clinical features | Other biochemical features | Radionuclide imaging | MAX Immunohistochemistry |
|-----------------|-----------------------------|--|--------------|------------------------------------|------------------------------|---|------------------------------------|---|
| III.7 | 21 | Hypertension self-identified whilst using father's home blood pressure machine | Left PC | NMA 20-fold ULN | | | Ga ⁶⁸ -DOTATATE-avid PC | Loss of staining |
| III.8 | 5 | | - | | Paravertebral ganglioneuroma | | | Loss of staining in most, but not all, ganglion cells from the ganglioneuroma with variable patchy decrease (but not negative) staining in the Schwannian stromal cells |
| III.9 | 8 months | | - | | Abdominal neuroblastoma | | | Loss of staining |
| Family B | | | | | | | | |
| II.1 | 21 | Headaches, palpitations, diaphoresis and severe hypertension | Bilateral PC | Not available (resected 1971) | | | | Not available |
| | 34 | (unknown) | | | Rib chondrosarcoma | | | Not available |
| | 34 | Asymptomatic (incidental finding during investigations for chondrosarcoma) | | | Microprolactinoma | Hyperprolactinemia (recent serum prolactin 619-874 mIU/L; NR < 500) | | Not available (not resected) |

Table 2. Continued

| Individual | Age at presentation (years) | Symptoms and/or signs | PPGL | Catecholamine profile ^a | Other clinical features | Other biochemical features | Radionuclide imaging | MAX Immunohistochemistry |
|------------|-----------------------------|--|--|------------------------------------|--|---|--|------------------------------|
| | 60 | Asymptomatic (identified on routine biochemistry) | | | Multifocal parathyroid adenomas | Hypercalcemia (highest serum corrected calcium 2.74 mmol/L, NR 2.25-2.65 mmol/L) Hyperparathyroidism (PTH 18.8 pmol/L, NR <6.9 pmol/L) | | Uninterpretable |
| | 64 | Asymptomatic (incidental finding during surveillance imaging after chondrosarcoma) | | | Multifocal lung adenocarcinoma (right upper lobe ×1, left upper lobe ×1, left lower lobe ×2) | | | Uninterpretable |
| | 64 | Asymptomatic (incidental finding during investigations for lung adenocarcinomas) | Metastatic PC to abdominal lymph nodes | Normal | | | Ga ⁶⁸ -DOTATATE avid nodal metastases | Not available (not resected) |
| II.2 | 37 | | | | Breast cancer (bilateral) | | | |
| | 71 | | | | Pancreatic cancer | | | |

Abbreviations: PPGL, pheochromocytoma/paraganglioma; F-DOPA, ¹⁸F-fluorodopa; GH, growth hormone; IGF-1, insulin-like growth factor 1; MIBG, ¹²³I-methyliodobenzylguanidine; PC, pheochromocytoma; PG, paraganglioma; ULN, upper limit of normal; NE, noradrenaline; NM, normetanephrine; E, adrenaline; M, metanephrine; vanillylmendelic acid, VMA; DOPA, dopamine; 3MT 3-methoxytyramine; p, plasma; u, urinary; OGTT, oral glucose tolerance test; N/A, not applicable; NR, normal range; ULN, upper limit of normal reference range.

^aResults reported from the test performed closest to, but preceding, adrenalectomy. Elevated results shown only; full catecholamine profiles presented in Table S1 (31).

agonist therapy, and pegvisomant. His abdominal lesions have been stable over 6 years.

His brother (II.2) presented aged 37 years with hypertension. Five years later, a right-sided PC was identified and resected, with clinical and biochemical resolution. Screening of *VHL*, *RET*, *SDHD*, and *SDHB* was negative. He presented again 10 years later, undergoing resection of a left-sided PC, again with biochemical resolution.

One of the daughters of II.2 (III.2) presented aged 23 years with acute myocardial ischemia, due to catecholamine myocarditis, and extremely labile blood pressure. A left PC was resected, with clinical and biochemical resolution. Ten years later she represented elsewhere with a right PC, again with biochemical resolution after resection. Anatomical imaging also suggested left adrenal bed disease (not resected). Three years later she developed palpitations and tremor, with 'mild' biochemical abnormalities; ⁶⁸Ga-DOTATATE-positron emission tomography (PET) avidity was noted in the left adrenal bed. Further ⁶⁸Ga-DOTATATE-PET scanning 2 years later was reported as showing 2 separate lesions in the left adrenal bed (both stable on anatomical assessment, compared with 2015) and a new lesion at the thoracic inlet, for which she awaits surgery.

One of the sons of II.2 (III.4) presented aged 30 with hypertension; 3 pheochromocytomas (2 left-sided, 1 right-sided) were resected, with biochemical resolution postoperatively.

Another daughter of II.2 (III.5) presented with headaches and severe hypertension aged 14 years; a left PC was resected with clinical and biochemical resolution. Seven years later hypertension recurred; a right PC and 2 small extra-adrenal foci were identified on ¹⁸F-DOPA-PET. She underwent right adrenalectomy; the extra-adrenal foci were not found at operation. Postoperatively, urinary and plasma catecholamines returned to normal and have remained so over 8 years. The 2 abdominal lesions have not been visible on other imaging modalities since; no further F-DOPA-PET scans have been performed. IGF-1 levels were assessed because of her family history and have been intermittently elevated on multiple occasions (49-65 nmol/L, normal range 15-47): before her first adrenalectomy ($\times 1$ test), before her second adrenalectomy ($\times 1$ test), and on 5 of 13 occasions after second adrenalectomy. She has no clinical features of acromegaly; and GH suppresses normally (< 0.5 mU/L) following oral glucose (75 g), tested when IGF-1 elevated. Pituitary gland MRI showed an asymmetrically-enlarged gland with superolateral extension on the righthand side and borderline thickening of the stalk, but no clear pituitary tumor, remaining unchanged on follow-up imaging.

In 2013, another of II.1's brothers (II.6) presented with severe hypertension. A very large PC was identified and

resected. A year later, he presented with abdominal pain and hypertension; multiple lymph node and other organ metastases were evident. He has received ¹⁷⁷lutetium-DOTATATE on 2 occasions and remains on alpha and beta blockade.

One of the daughters of II.6 (III.7) presented aged 21 years, after hypertension was identified incidentally whilst using her father's home blood pressure machine. A left PC was resected, with biochemical resolution postoperatively.

One of the sons of II.6 (III.8) presented with paravertebral ganglioneuroma, aged 5 years; another son (III.9) presented with abdominal neuroblastoma, aged 6 months. Both tumors were successfully resected. These individuals (now adults) are currently clinically well.

Clinical details Family B

This family's pedigree is presented in Fig. 1C, with biochemical and radiological data in Table 2. The proband presented aged 21 years, with headaches, palpitations, diaphoresis and severe hypertension (BP 280/180 mmHg). Bilateral PCs were resected, with biochemical and clinical resolution. At age 34 years she represented with a large (80 × 50 mm) moderately differentiated (Grade 2) rib chondrosarcoma, successfully resected. Incidentally, an asymptomatic microprolactinoma (7 × 8 mm) was detected; this has remained stable in size and secretion over many years without dopamine agonist therapy. At age 60 years she developed primary hyperparathyroidism. Multiple lesions were evident preoperatively; histopathology of the 3 resected glands showed multiglandular parathyroid adenomas. At age 64 routine CT surveillance of the chondrosarcoma incidentally identified 4 spiculated ill-defined pulmonary lesions, with biopsy demonstrating well-differentiated lung adenocarcinoma. Fluorodeoxyglucose PET showed mild avidity of all opacities in keeping with the well-differentiated lesion. However, ⁶⁸Ga-DOTATATE-PET showed intense uptake in a soft tissue density adjacent to the crus of the right hemidiaphragm and a nonenlarged left abdominal para-aortic lymph node, with mild uptake in the pulmonary lesions, interpreted as metastatic PC (Fig. S6 (31)). Plasma metanephrine and normetanephrine levels were normal.

The proband's deceased half-sister (II.2) had breast carcinoma and pancreatic carcinoma. Neither of these tumors were accessible for assessment and no germline DNA was available. No other family history was available.

Germline and Tumor Genotyping

Family A

Germline genetic testing

Whole exome sequencing identified a heterozygous missense variant in *MAX* (NM_002382.4: c.200C>A, p.Ala67Asp),

previously unreported in gnomAD (39) and 1000Genomes (minor allele frequency = 0.000) (40) or variant (ClinVar (41), LOVD (42), HGMD (43)) databases, affecting a very highly conserved base (genome evolutionary rate profiling score of 5.56) and predicted “probably damaging” (score: 0.999 by PolyPhen (44)) and “deleterious” (score: 0 by SIFT (45)). Under ACMG guidelines the variant is classified as “pathogenic” (using the criteria PS3, PM1, PM2, PP2, PP3, BP1) (35). Quality control and variant filtering steps are presented in Tables S3 and S4 (31).

Sanger sequencing confirmed the variant (Fig. 1B), which segregated with all individuals with PC and with the 2 children with neuroblastoma and ganglioneuroma, (Fig. S1 (31)). DNA was not available from the deceased first generation father, (I.1); however, the first-generation mother (I.2) was WT.

Tumor genotyping (including CNV analysis)

Sanger sequencing demonstrated LOH (with loss of WT allele) in tumor DNA extracted from tumors samples of II.2 and III.5. Poor DNA quality for II.6 precluded analysis. High-density single nucleotide polymorphism genotyping microarray showing copy neutral LOH across chr14q in II.2, and of chr.14 entirely in III.5 and II.6. In contrast, surrounding normal adrenal tissue was heterozygous for the c.200C>A variant and did not show LOH at chr14q (representative results from II.6 shown in Fig. S2 (31)). DNA from tumor tissue from individuals III.8 and III.9 was also sequenced; somewhat surprisingly no LOH was seen. DNA from these older samples was extracted from scrolls of FFPE resections, in contrast to the other tumors which were marked by a histopathologist as tumor/non tumor prior to extraction, and a priori would be expected to contain a mixture of normal and tumor cells. CNV results in the neuroblastoma and ganglioneuroma were inconclusive, due to poor quality DNA.

Gene expression profiling

All 3 PC tumor samples were classified, with high confidence, to the “MAX-like” gene expression cluster (36).

Family B

Germline genetic testing

A novel heterozygous *MAX* variant (NM_002382.4: c.22G>T, p.Glu8*) was identified (Fig. 1D), not previously reported in population (gnomAD (39), 1000Genomes (40)) or variant (ClinVar (41), LOVD (42), HGMD (43) databases). The nonsense variant, early in exon 1, is most likely to cause nonsense-mediated decay (46), or, possibly, an extremely truncated protein (and as such was classified as “disease causing” by Mutation Taster (34); PolyPhen (44) and

SIFT (45) do not calculate scores for STOP mutations). The variant fulfilled ACMG criteria as “likely pathogenic.” (35)

Insufficient FFPE was available from lung and parathyroid tumors for DNA extraction and somatic assessment.

Immunohistochemistry of Adrenal Tissue and Other Tissues

MAX1 staining

Family A

Immunohistochemistry of resected adrenal tissue from Family A individuals II.1, II.2, II.6, III.2, III.4, III.5, and III.7 demonstrated complete loss of MAX staining in PPGL neoplastic cells (representative sample, Fig. S3 (31)). MAX staining was absent from neuroblastoma neoplastic cells of III.9 (Fig. 2). MAX staining was also negative in most, but not all, ganglion cells from the ganglioneuroma ganglion cells and variable patchy decrease (but not negative) staining in the Schwannian stromal cells of tumor tissue from III.8 (Fig. S4 (31)). No tissue was available from II.1’s previous pituitary biopsy.

Family B

MAX immunohistochemistry was attempted on parathyroid and lung carcinoma FFPE samples but was considered uninterpretable (no staining in neoplastic cells or internal positive controls).

GHRH staining

Immunohistochemistry of individual II.1’s most recently resected composite tumor (mixed PC and ganglioneuroma) demonstrated positive staining for GHRH (Fig. S5 (31)), suggesting that at least at this point in time acromegaly is likely secondary to ectopic GHRH secretion rather than a primary pituitary somatotroph tumor. No previously resected PC tissue was available for testing.

Functional studies: MAX nuclear localization and transcriptional activity

With respect to nuclear localization, absence of lamin B1 blotting in the cytoplasmic fraction and absence of α -tubulin blotting in the nuclear fraction indicated clear separation of the cellular compartments, without contamination (Fig. 3A). Protein expression of DDK-tagged WT MAX after appropriate normalization was very low in the cytoplasmic fraction and much higher in the nuclear fraction, as expected (Fig. 3B). In contrast, expression of DDK-tagged MAX mutant p.Ala67Asp and the positive control p.Met74Val was significantly elevated within the cytoplasmic fraction compared to WT ($n = 3, P < .05$); and

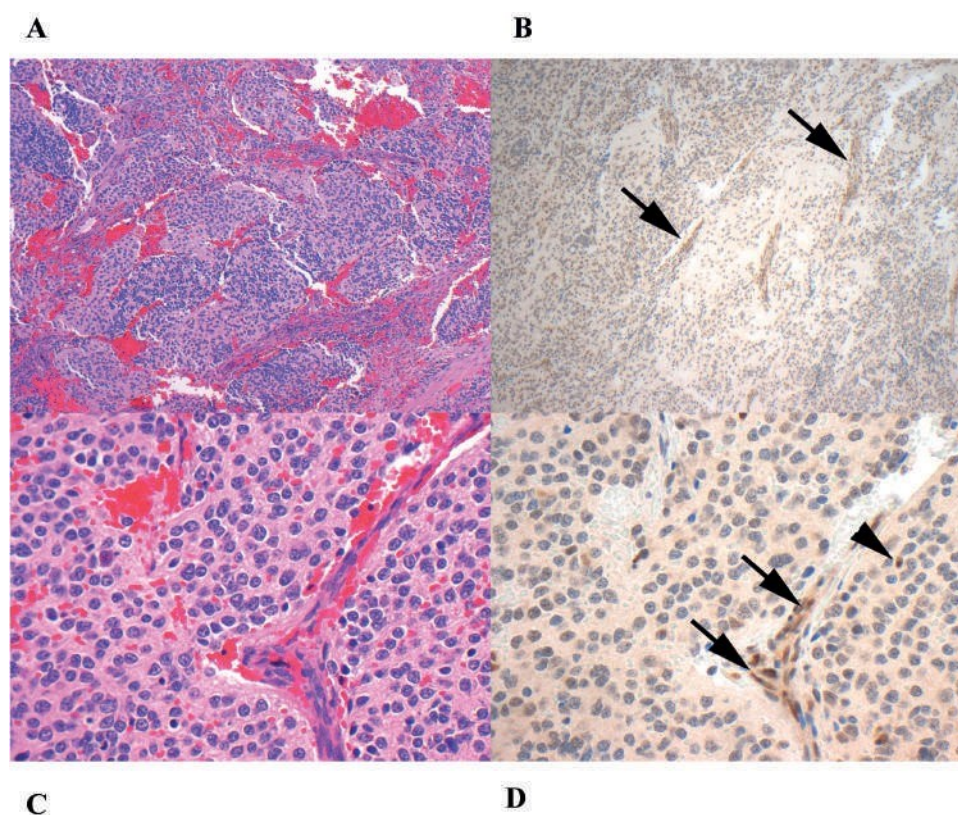


Figure 2. MAX Immunohistochemistry of neuroblastoma. Serial hematoxylin and eosin (A, C) and MAX1 immunohistochemistry (B, D) stained sections from the neuroblastoma. Whilst non-neoplastic endothelial cells (arrows) and lymphocytes (arrowheads) demonstrate preserved positive staining for MAX1, there is virtually complete absence of staining in the neoplastic cells of the neuroblastoma (original magnifications A, B: 100 \times ; C, D: 400 \times). Image created by Prof. A. Gill.

nuclear compartment expression of both MAX mutants p.Ala67Asp and p.Met74Val was significantly reduced, compared with WT ($n = 3$, $P < .05$).

With respect to transcription regulation, as expected the MYC-dependent CDK4 E-box reporter gene was potently repressed in PC12 cells cotransfected with WT MAX (Fig. 3C). In contrast, the reporter gene was incompletely repressed in PC12 cells co-transfected with MAX variant p.Ala67Asp, comparable to the lack of repression seen using the positive MAX control p.Met74Val ($n = 3$, $P < .05$) (Fig. 3C), consistent with impaired transcriptional function.

Discussion

We report here 2 families with MAX mutations, who demonstrate PPGL and multiple other endocrine and nonendocrine tumors. The first is the largest kindred yet reported; and the proband of the second demonstrates the highest number of tumors (at least 9) yet associated with a MAX mutation. Together, these 2 families emphasize both the high penetrance of PPGL and the diverse tumor

spectrum associated with MAX mutations. Our data and other reports argue strongly that MAX is not only a PPGL-driver gene, but more broadly is a novel cause of MEN.

In Family A we identified a novel missense loss-of-function mutation segregating with extremely high penetrance. Every known carrier has manifest at least 1 neuroendocrine tumor, and multiple individuals have had bilateral and/or recurrent PC. Most individuals with PC showed a predominantly noradrenergic secretory profile; 1 had a mixed pattern (Table S2 (31)). At least 2 individuals have metastatic disease—1 with quite indolent disease, the other with a more rapid and progressive course. One individual has acromegaly, at least currently secondary to ectopic GHRH secretion from PC; another has a radiologically abnormal pituitary gland and intermittently raised IGF-1. Barring gonadal mosaicism, the obligate carrier father (I.1) died suddenly in middle age, a classic presentation of undiagnosed PC (47). Two carriers have not manifested PPGL—noting their young age—but have manifest other neuroendocrine tumors in childhood.

In Family B, the proband initially presented with PC at a young age with metastatic disease only detected decades

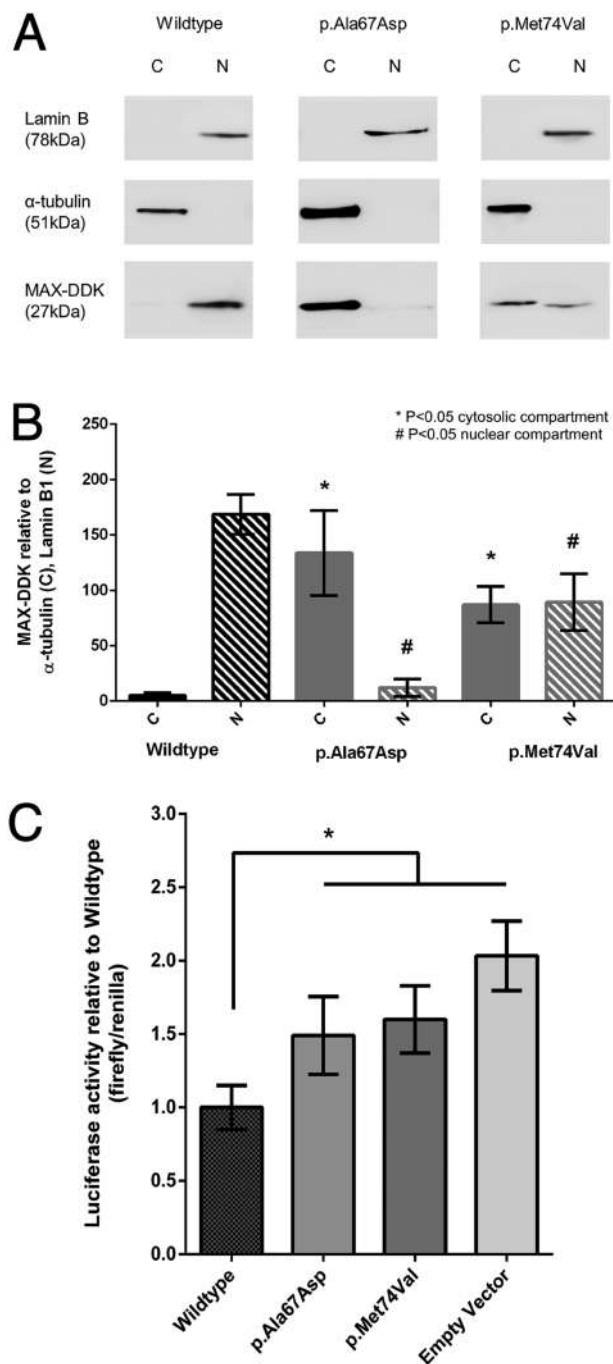


Figure 3. (A) Representative Western blot image of PC12 transfected with DDK-tagged MAX constructs showed higher expression of MAX mutants p.Ala67Asp and p.Met74Val in the cytosolic compartment compared to wild type. Conversely, the nuclear compartment expression of the MAX mutants p.Ala67Asp and p.Met74Val were reduced. (B) Densitometry data of Western blot analysis where x-axis matches that of the image (* $P < 0.05$). C: Luciferase reporter assays were performed in PC12 cells using pGL3-CDK4 MBS1-4 construct with either wild-type MAX or mutant MAX or empty vector constructs and MAX missense variant p.Met74Val was included as a control. The ratio of firefly luciferase to the renilla luciferase were normalized and compared with the wild type MAX transfection (* $P < 0.05$).

later. Additionally, she has at least 7 other tumors (with multiple parathyroid adenomas being counted as a single entity), both endocrine and nonendocrine. Her sister (II.2, now deceased) had 2 carcinomas. The absence of a family history of PPGL in this case is not surprising; a previous study of individuals with germline *MAX* variants and PC reported a family history of PPGL in only 37% (9). No affected woman has had children; thus we cannot comment about preferential paternal transmission.

MAX acts as a classic tumor suppressor gene, with somatic loss of the WT allele (3). Consistent with this result, we observed copy neutral LOH across the *MAX* locus in the 3 PC tumors available for testing.

The c.200C>A, p.Ala67Asp variant of Family A affects a highly conserved amino acid in the second helix of the basic helix-loop-helix domain, required for homodimerization and heterodimerization with other MAX/MYC/MXD1 axis binding partners and, subsequently, transcription regulation (4). Our functional studies validated the pathogenic nature of this variant, demonstrating loss of nuclear MAX expression accompanied by cytoplasmic retention, and impaired transcriptional repression of E box-reporter activity in PC12 cells. The cause of cytoplasmic retention of these mutants is not clear; a priori, it would not appear due to hindrance of the nuclear localization signal (PQSRKKLR motif at 149-156 positions near the N-terminus) due to sheer distance (48, 49).

Previous studies in *MAX*-associated PCs suggested loss of MAX staining is observed with truncating variants (nonsense and splice site variants, and deletions) whereas MAX staining is typically retained in tumors due to missense variants—even in tumors with LOH at chromosome 14q (3, 9). However, Family A (with a missense variant), demonstrated loss of MAX staining in all assessed PCs, as well as the neuroblastoma, and in most (though not all) cells of the ganglioneuroma (Table 2). In considering possible explanations for this finding, c.200C>A occurs 29 bases into exon 4 and does not generate a premature stop codon (and our functional work meters against in vivo NMD). Further, as the sequence surrounding the variant neither corresponds to conserved splicing motifs, nor matches known exon splice enhancer sequences (50), it would seem unlikely that this variant would cause splicing alterations that would render the MAX protein unrecognizable to the immunohistochemistry antibody. Our results are thus somewhat counterintuitive and we do not have a ready explanation. Nevertheless, given our clinical experience with its poor sensitivity and specificity we would not place great significance on the results of MAX immunohistochemistry—certainly not as a discriminator of *MAX* mutation subtype.

Both our families include individuals with PC and pituitary disease, adding to the 7 individuals previously identified with the 3PAs and germline *MAX* mutations (Table 1). Pituitary tumors in 3PAs are typically functional: a recent review of all 82 3PAs published case reports reported 17 prolactinomas, 7 cases with acromegaly, and 1 case with combined prolactin/GH excess in the 31 individuals with identified germline mutations (including some with *MAX* variants), with 13 prolactinomas and 21 acromegaly cases in 51 individuals without an identified germline mutation (23). This high frequency of functioning pituitary tumors in *MAX* cases argues against their being incidental findings, considering a population prevalence of approximately 1 per 3000 (51).

The extent to which Family A has primary vs. secondary acromegaly, however, is debatable. In the context of no definitive residual PC, individual III.5 has intermittently mildly elevated serum IGF-1 and a markedly asymmetric pituitary gland without a discrete pituitary tumor (noting that somatotroph hyperplasia normally causes uniform enlargement), but normal GH suppression and no clinical features of acromegaly. Her PC tumor has not been stained for GHRH. Individual II.1 had PC and acromegaly diagnosed simultaneously at initial presentation and on re-presentation 40 years later. Correspondence describing his 1973 pituitary biopsy histopathology did not distinguish somatotroph tumor from somatotroph hyperplasia and his prior PC tissue is unavailable; however, his more recent composite tumor showed positive staining for GHRH immunohistochemistry. A single case of a PC with positive GHRH immunohistochemistry but without evidence of GHRH secretion has been reported (52); another case had PC with modest evidence of GHRH secretion (from samples obtained near the tumor during inferior vena cava sampling) but no biochemical or clinical evidence of GH excess (53). Three individuals with a GHRH-secreting PC and clear clinical and biochemical acromegaly have been described (54-56), 1 of whom had germline genetic testing (including *MAX*) which was negative (54). As shown in Table 1, 2 individuals with germline *MAX* mutations, PC, pituitary neuroendocrine tumors/adenomas, and acromegaly have recently been reported (13). Both presented with acromegaly initially, with catecholamine excess not diagnosed for some years. Neither case had GHRH measured or GHRH immunostaining of their PC. One case had pituitary surgery (pathology not reported) with postoperative hypopituitarism; the other was managed with a somatostatin analogue, cabergoline, pegvisomant, and radiotherapy. Thus, whether these cases have primary or secondary acromegaly is not entirely clear. In considering our own cases, the most parsimonious explanation is that II.1 has acromegaly and somatotroph hyperplasia due

to ectopic GHRH secretion from his composite tumor, rather than primary pituitary disease, at least currently.

Our cases also extend the phenotype associated with germline *MAX* mutations to include ganglioneuroma, neuroblastoma, composite PPGL tumors, chondrosarcoma, lung adenocarcinomas, and parathyroid adenomas. Ganglioneuroma and neuroblastoma share an embryological origin with PC and PGL, arising from neural crest cells which migrate to form the adrenal medulla and paraganglia (57). This is the first time a neuroblastoma has been reported associated with a *MAX* mutation. Neuroblastoma cause 15% of all pediatric cancer deaths (58). In a cohort of 372 neuroblastoma tumors, LOH of chromosome 14q was observed in 22%, and specifically loss at 14q23 (59), which locus contains *MAX*. Notably, LOH at this site strongly correlated with LOH of 11q also, which was observed in the PC of II.6, reported here. Somatic amplification and overexpression of *MYCN* (negatively regulated by *MAX*) is 1 of the most important and well established prognostic features of aggressive stage 4 neuroblastoma (5) and higher *MAX* expression correlates with more favorable neuroblastoma patient outcomes (60). Our data suggest that germline mutations in *MAX* should be assessed in children with neuroblastoma.

We also report a composite PC/ganglioneuroma, in the most recent tumor resected of II.1. Thirty-five composite PPGL tumors have been reported previously, with germline PPGL driver genes *NF1* (61), *RET* (62, 63), *VHL* (64), and, most recently, *MAX* (16); in the last case, the affected individual manifest a ganglioneuroblastoma, a composite PC/ganglioneuroma, bilateral and metastatic PC and a PGL.

In Family A, II.1 had hypercalcemia at initial presentation, resolving after first operation and without recurrence, whereas the proband in Family B had typical biochemistry of primary hyperparathyroidism and multiglandular parathyroid adenomas histologically. Hypercalcemia has been reported in 2 other individuals with germline *MAX* mutations and PC (Table 1), 1 reported as primary hyperparathyroidism (without further characterization) (9) and 1 with mild biochemical evidence of primary hyperparathyroidism that resolved after adrenalectomy (24), as occurred with II.1. Thus, hypercalcemia associated with *MAX* mutations might arise from ectopic secretion of PTH, PTHrP, or an unknown calciotropic factor in some cases, whilst other cases (such as the Family B proband) clearly have separate parathyroid disease.

Interestingly, of tumor suppressor genes that predispose to hereditary PC/PGL, *MAX* is 1 of the least tolerant to loss of function; in gnomAD, its probability of being loss of function intolerant (pLI) is 0.83 (the closer pLI is to 1.0, the less tolerant the gene is to loss of function), compared with pLI scores of 0.9 for *NF1*, 0.08 for *VHL*, 0 for

SDHA, SDHB, SDHC, and SDHD, 0.09 for FH, and 0.01 for TMEM127 (65). Collectively, we interpret these data as being consistent with MAX having high penetrance for PC and may also explain the observed moderate penetrance for non-PC/PGL tumors as well.

Our families received clinical care over many decades and at many institutions, resulting in a lack of uniformity of biochemical and radiological testing and in availability of tumor tissue for this study. Pituitary imaging was ad hoc, according to clinical indication, rather than systematically assessed. We acknowledge also that we have not demonstrated LOH in the non-PC tumors reported here, due to lack of access to tumor samples, and/or poorly preserved specimens.

Our data, along with the recent papers of Pozza et al. (16) and Petignot et al. (19), are consistent with MAX as a novel MEN gene, encompassing a phenotype including classic MEN endocrinopathies (PPGL, pituitary and parathyroid disease) in addition to nonendocrine tumors, particularly those of neural crest origin. Our families highlight the requirement for lifelong surveillance in subjects with pathogenic MAX variants, for bilateral and/or metastatic PC, pituitary adenomas, and other endocrine and nonendocrine neoplasms. We recommend all individuals identified with pathogenic MAX variants should have a comprehensive baseline evaluation for PPGL, pituitary, and parathyroid disease, including biochemical assessment (as a minimum, plasma and/or urinary metanephrines, static anterior pituitary profile, and serum calcium/PTH) and imaging (eg, MRI from pituitary to pelvis and/or DOTATATE- or DOPA-PET). The appropriate frequency and extent of assessment is evolving but should take account of a predilection for bilateral and/or metastatic PC.

Acknowledgments

The authors thank Ms. Janelle McFarlene for her help in ethics and sample acquisition; Mr. Lawrie Wheeler, Ms. Sharon Song, Ms. Lisa Anderson, Ms. Anne Louise Richardson for laboratory technical support; Dr. Diana Benn for patient recruitment and Dr. Ying Zhu for bioinformatics.

Financial Support: This work was generously supported by a Royal Brisbane and Women's Hospital Foundation New Investigator Grant (E.L.D.); the Australian National Health and Medical Research Council through Australian Postgraduate Awards (J.E.H. and A.M.M.L.), Project Grant 1108032 (T.D. and R.J.C.-B.), and an Early Career Fellowship 1158111 (A.M.M.L.); and The Hillcrest Foundation (Perpetual Trustees) (T.D. and R.J.C.-B.).

Additional Information

Correspondence: Prof. Emma L. Duncan, MBBS, FRCP, FRACP, PhD, FAHMS, Department of Twin Research & Genetic Epidemiology, St Thomas' Campus, Lambeth Palace Road, London SE1 7EH, UK. Email: emma.duncan@kcl.ac.uk.

Disclosures: The authors have no relevant conflicts to disclose.

Data Availability: Restrictions apply to the availability of data generated or analyzed during this study to preserve patient confidentiality or because they were used under license. The corresponding author will on request detail the restrictions and any conditions under which access to some data may be provided.

Web Resources

1000 Genomes: <http://www.1000genomes.org/>
 4Genomes from Complete Genomics: <http://www.completegenomics.com/sequence-data/download-data/>
 ANNOVAR: <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>
 BEAGLE Utilities program: https://faculty.washington.edu/browning/beagle_utilities/utilities.html
 Cluster2haps: http://faculty.washington.edu/browning/beagle/beagle_3.3.2_31Oct11.pdf
 Bioconductor package TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene: (<http://www.bioconductor.org/packages//2.10/data/annotation/html/TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene.html>)
 CASAVA: http://www.illumina.com/software/genome_analyzer_software.ilmn
 CONDEL: <http://bg.upf.edu/condel/home>
 Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: dbSNP137): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
 dINDEL: <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/dindel/>
 Exome Variants Analysis and Reporting (EVAR): www.exome.info
 GATK: http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit
 Integrative Genomics Viewer: <http://www.broadinstitute.org/igv/>
 Leiden open variation database: <http://www.lovd.nl/3.0/home>
 MutationTaster: www.mutationtaster.org
 Novoalign alignment tool: www.novocraft.com
 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.omim.org>
 Package hapFabia -Bioconductor: <http://www.bioconductor.org/packages/2.11/bioc/html/hapFabia.html>
 Picard tools (v1.42): <http://picard.sourceforge.net>
 PolyPhen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
 SAMtools: <http://samtools.sourceforge.net/>
 SIFT: <http://sift.jcvi.org/>
 ucsc genome browser: <http://genome.ucsc.edu/>
 UK10K project: <http://www.uk10k.org>
 UniProt: <http://www.uniprot.org/uniprot/>

References

1. Neumann HP, Young WF Jr, Krauss T, et al. 65 YEARS OF THE DOUBLE HELIX: genetics informs precision practice in the diagnosis and management of pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*. 2018;**25**(8):T201-T219.
2. Crona J, Taïeb D, Pacak K. New perspectives on pheochromocytoma and paraganglioma: toward a molecular classification. *Endocr Rev*. 2017;**38**(6):489-515.
3. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2011;**43**(7):663-667.
4. Cascón A, Robledo M. MAX and MYC: a heritable breakup. *Cancer Res*. 2012;**72**(13):3119-3124.

5. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, et al. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*. 1983;**35**(2 Pt 1):359-367.
6. Comino-Méndez I, Leandro-García LJ, Montoya G, et al. Functional and in silico assessment of MAX variants of unknown significance. *J Mol Med (Berl)*. 2015;**93**(11):1247-1255.
7. Ribon V, Leff T, Saltiel AR. c-Myc does not require max for transcriptional activity in PC-12 cells. *Mol Cell Neurosci*. 1994;**5**(3):277-282.
8. Qin N, de Cubas AA, Garcia-Martin R, et al. Opposing effects of HIF1a and HIF2a on chromaffin cell phenotypic features and tumor cell proliferation: insights from MYC-associated factor X. *Int J Cancer*. 2014;**135**(9):2054-2064.
9. Burnichon N, Cascón A, Schiavi F, et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res*. 2012;**18**(10):2828-2837.
10. Bausch B, Schiavi F, Ni Y, et al.; European-American-Asian Pheochromocytoma-Paraganglioma Registry Study Group. Clinical characterization of the pheochromocytoma and paraganglioma susceptibility genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for gene-informed prevention. *JAMA Oncol*. 2017;**3**(9):1204-1212.
11. Casey RT, Warren AY, Martin JE, et al. Clinical and molecular features of renal and pheochromocytoma/paraganglioma tumor association syndrome (RAPTAS): case series and literature review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;**102**(11): 4013-4022.
12. Taïeb D, Jha A, Guerin C, et al. 18F-FDOPA PET/CT imaging of MAX-related pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;**103**(4):1574-1582.
13. Daly AF, Castermans E, Oudijk L, et al. Pheochromocytomas and pituitary adenomas in three patients with MAX exon deletions. *Endocr Relat Cancer*. 2018;**25**(5):L37-L42.
14. Urbini M, Nannini M, Astolfi A, et al. Whole exome sequencing uncovers germline variants of cancer-related genes in sporadic pheochromocytoma. *Int J Genomics*. 2018;**2018**: 6582014.
15. Kobza AO, Dizon S, Arnaout A. Case report of a prolactinoma in a patient with a novel MAX mutation and bilateral pheochromocytomas. *AACE Clinical Case Reports*. 2018;**4**(6):e453-e456.
16. Pozza C, Sesti F, Di Dato C, et al. A novel MAX gene mutation variant in a patient with multiple and "composite" neuroendocrine-neuroblastic tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;**11**:234.
17. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*. 2000;**287**(5454):848-851.
18. Bayley JP, Kunst HP, Cascon A, et al. SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and phaeochromocytoma. *Lancet Oncol*. 2010;**11**(4):366-372.
19. Petignot S, Daly AF, Castermans E, et al. Pancreatic neuroendocrine neoplasm associated with a familial MAX deletion. *Horm Metab Res*. 2020;**52**(11):784-787.
20. Ferrara AM, Lombardi G, Pambuku A, et al. Temozolomide treatment of a malignant pheochromocytoma and an unresectable MAX-related paraganglioma. *Anticancer Drugs*. 2018;**29**(1):102-105.
21. Shibata M, Inaishi T, Miyajima N, et al. Synchronous bilateral pheochromocytomas and paraganglioma with novel germline mutation in MAX: a case report. *Surg Case Rep*. 2017;**3**(1):131.
22. Xekouki P, Szarek E, Bullova P, et al. Pituitary adenoma with paraganglioma/pheochromocytoma (3PAs) and succinate dehydrogenase defects in humans and mice. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;**100**(5):E710-E719.
23. Xekouki P, Brennand A, Whitelaw B, Pacak K, Stratakis CA. The 3PAs: an update on the association of pheochromocytomas, paragangliomas, and pituitary tumors. *Horm Metab Res*. 2019;**51**(7):419-436.
24. Roszko KL, Blouch E, Blake M, et al. Case report of a prolactinoma in a patient with a novel MAX mutation and bilateral pheochromocytomas. *J Endocr Soc*. 2017;**1**(11):1401-1407.
25. Korpershoek E, Koffy D, Eussen BH, et al. Complex MAX rearrangement in a family with malignant pheochromocytoma, renal oncocytoma, and erythrocytosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(2):453-460.
26. Romanet P, Guerin C, Pedini P, et al. Pathological and genetic characterization of bilateral adrenomedullary hyperplasia in a patient with germline MAX mutation. *Endocr Pathol*. 2017;**28**(4):302-307.
27. Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, et al. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov*. 2014;**4**(3):292-303.
28. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;**511**(7511):543-550.
29. Walker CJ, Rush CM, Dama P, et al. MAX mutations in endometrial cancer: clinicopathologic associations and recurrent MAX p.His28Arg functional characterization. *J Natl Cancer Inst*. 2018;**110**(5):517-526.
30. Hockings G, McInerney-Leo A, Hockings N, et al. *A New Pheochromocytoma Syndrome: Extending the Phenotype Associated With MAX Mutations*. Program of the Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia; 2014.
31. Seabrook AJ, Harris JE, Velosa SB, et al. Supplement to multiple endocrine tumors associated with germline MAX mutations: multiple endocrine neoplasia type 5? *Figshare Digital Repository*. 2020; Deposited November 19 2020.
32. McInerney-Leo AM, Marshall MS, Gardiner B, et al. Whole exome sequencing is an efficient and sensitive method for detection of germline mutations in patients with phaeochromocytomas and paragangliomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;**80**(1):25-33.
33. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;**31**(16):2745-2747.
34. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;**11**(4):361-362.
35. Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;**17**(5):405-424.
36. Flynn A, Dwight T, Harris J, et al. Pheo-type: a diagnostic gene-expression assay for the classification of

- pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;**101**(3):1034-1043.
37. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, et al. Identification of *CDK4* as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;**97**(5):2229.
 38. Hopewell R, Ziff EB. The nerve growth factor-responsive PC12 cell line does not express the Myc dimerization partner Max. *Mol Cell Biol.* 1995;**15**(7):3470-3478.
 39. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al.; Genome Aggregation Database Consortium. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;**581**(7809):434-443.
 40. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;**526**(7571):68-74.
 41. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;**46**(D1):D1062-D1067.
 42. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011;**32**(5):557-563.
 43. Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;**21**(6):577-581.
 44. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;**7**(4):248-249.
 45. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;**4**(7):1073-1081.
 46. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;**5**(2):89-99.
 47. Spencer E, Pycock C, Lytle J. Pheochromocytoma presenting as acute circulatory collapse and abdominal pain. *Intensive Care Med.* 1993;**19**(6):356-357.
 48. Kato GJ, Lee WM, Chen LL, Dang CV. Max: functional domains and interaction with c-Myc. *Genes Dev.* 1992;**6**(1):81-92.
 49. Brownlie P, Ceska T, Lamers M, et al. The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control. *Structure.* 1997;**5**(4):509-520.
 50. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002;**3**(4):285-298.
 51. Vroonen L, Daly AF, Beckers A. Epidemiology and management challenges in prolactinomas. *Neuroendocrinology.* 2019;**109**(1):20-27.
 52. Asa SL, Kovacs K, Thorner MO, Leong DA, Rivier J, Vale W. Immunohistological localization of growth hormone-releasing hormone in human tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;**60**(3):423-427.
 53. Sano T, Saito H, Yamazaki R, et al. Production of growth hormone-releasing factor in pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 1984;**311**(23):1520.
 54. Mumby C, Davis JR, Trouillas J, Higham CE. Pheochromocytoma and acromegaly: a unifying diagnosis. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2014;**2014**(1):140036.
 55. Roth KA, Wilson DM, Eberwine J, et al. Acromegaly and pheochromocytoma: a multiple endocrine syndrome caused by a plurihormonal adrenal medullary tumor*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;**63**(6):1421-1426.
 56. Vieira Neto L, Taboada GF, Corrêa LL, et al. Acromegaly secondary to growth hormone-releasing hormone secreted by an incidentally discovered pheochromocytoma. *Endocr Pathol.* 2007;**18**(1):46-52.
 57. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer.* 1999;**86**(2):349-363.
 58. Jiang M, Stanke J, Lahti JM. The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Curr Top Dev Biol.* 2011;**94**:77-127.
 59. Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, et al. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001;**36**(1):28-31.
 60. Albanus RD, Juliani Siqueira Dalmolin R, Alves Castro MA, et al. Reverse engineering the neuroblastoma regulatory network uncovers MAX as one of the master regulators of tumor progression. *PLoS One.* 2013;**8**(12):e82457.
 61. Chetty R, Duhig JD. Bilateral pheochromocytoma-ganglioneuroma of the adrenal in type 1 neurofibromatosis. *Am J Surg Pathol.* 1993;**17**(8):837-841.
 62. Eféred B, Atsame-Ebang G, Tahirou S, et al. Bilateral pheochromocytoma with ganglioneuroma component associated with multiple neuroendocrine neoplasia type 2A: a case report. *J Med Case Rep.* 2017;**11**(1):208.
 63. Brady S, Lechan RM, Schwaitzberg SD, Dayal Y, Ziar J, Tischler AS. Composite pheochromocytoma/ganglioneuroma of the adrenal gland associated with multiple endocrine neoplasia 2A: case report with immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol.* 1997;**21**(1):102-108.
 64. Bernini GP, Moretti A, Mannelli M, et al. Unique association of non-functioning pheochromocytoma, ganglioneuroma, adrenal cortical adenoma, hepatic and vertebral hemangiomas in a patient with a new intronic variant in the VHL gene. *J Endocrinol Invest.* 2005;**28**(11):1032-1037.
 65. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al.; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;**536**(7616):285-291.