

Molekulargenetische Diagnostik der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 2A und Typ 2B

Wolfgang Höppner, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg

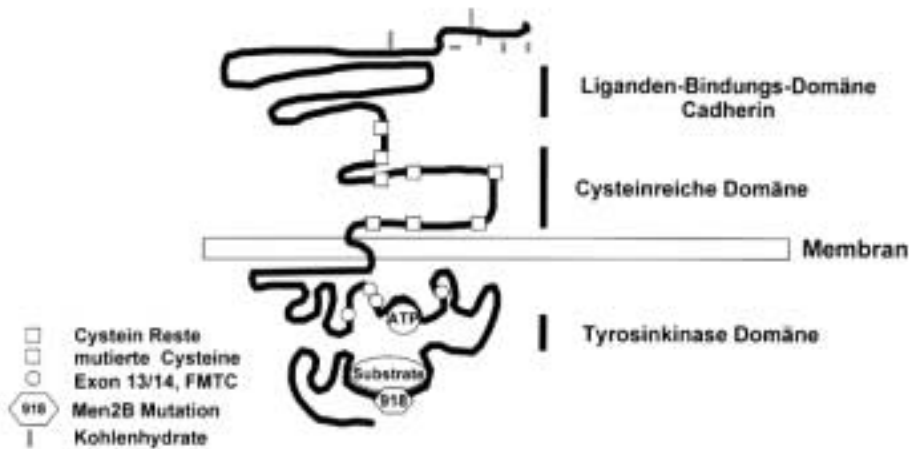


Abb 1
Vermutete Struktur
des *ret*-Proteins

Als multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN2) wird die Kombination aus medullärem Schilddrüsenkarzinom, Phäochromozytomen und Nebenschilddrüsenadenomen bezeichnet. Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt.

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom tritt bei nahezu 100% der Betroffenen auf. Bei 50% kommen Phäochromozytome vor, die oft beidseitig, aber nicht unbedingt synchron auftreten. Nebenschilddrüsenadenome, die bei etwa 20% der Betroffenen nachweisbar sind, entwickeln sich typischerweise in mehreren oder allen Nebenschilddrüsen.

Die häufigste Manifestation, die Kombination aus medullärem Schilddrüsenkarzinom und den genannten Organmanifestationen liegt bei etwa 80% der MEN2-Familien vor und wird als MEN2A bezeichnet. Eine Sonderform stellen die Familien dar, die ausschließlich vom medullären Schilddrüsenkarzinom betroffen sind (ca. 15%). Sie werden FMTC- oder FMTC-only-Familien genannt (FMTC = familial medullary thyroid carcinoma).

Eine weitere Sonderform sind die MEN2B-Familien (5-6%). Bei ihnen treten zusätzlich mukokutane Neurome auf. Der Verlauf dieser Form ist insgesamt wesentlich aggressiver. Bei etwa 40-60% der MEN2B-Patienten handelt es sich um Neumutationen, also nicht um eine von einem Elternteil ererbte Keimbahnmutation.

Die multiple endokrine Neoplasie Typ 2 und die familiären medullären Schilddrüsenkarzinome stellt die erste von zwei erblichen Erkrankungen dar, die durch aktivierende Mutationen in einem Protoonkogen ausgelöst wird. 1993 berichteten Mulligan et al. (1) und Donis-Keller et al. (2), daß heterozygote Keimbahnmutationen im *RET*-Protoonkogen für die MEN2 Erkrankung verantwortlich sind. Mutationen im *Met*-Protoonkogen führen zu hereditären papillären Nierenkarzinomen (3).

Das *ret* Protein gehört zu der Familie der membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der Aufbau entspricht dem verwandter Rezeptoren, wie etwa dem Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-Rezeptor). Es besteht aus einem extrazellulären Teil, der die Ligandenbindungsdomäne und die zysteinreiche Domäne enthält, der transmembranösen Domäne sowie der intrazellulären Domäne, mit der Tyrosinkinaseaktivität und den Autophosphorylierungsstellen (Abb 1). Als physiologischer Ligand des Rezeptors wurde das neurotrophe Peptid GDNF (Glial-cell derived nerve growth factor) identifiziert (4).

Das *ret*-Protein bildet in Gegenwart des Liganden GDNF einen Komplex mit einem weiteren Protein, dem GDNF α -Rezeptor. In diesem Komplex liegen sowohl das *ret*-Protein als auch der GDNF α -Rezeptor 2-fach vor (Abb 2). Diese Dimerisierung, die typisch für Tyrosinkinase-Rezeptoren ist, ist u.a. Voraussetzung für die Übertragung des intrazellulären Sig-

nals. Bei diesem Aktivierungsmechanismus sind Cysteinreste der extrazellulären zysteinreichen Domäne des *ret*-Proteins beteiligt.

Bei 85% der MEN2A-Familien ist durch Mutation einer von 5 Cysteinresten in eine andere Aminosäure umgewandelt (Abb 3). Dieses mutierte Protein lagert sich mit dem GDNF-Rezeptor auch in Abwesenheit des Liganden zu einem aktiven dimeren Komplex zusammen. Im Unterschied zu Mutationen in Tumor-Suppressorgenen bewirkt diese Mutation also eine dauernde Aktivierung (gain of function) des *ret*-Proteins.

Bei knapp 10% der MEN2A- und FMTC-Familien liegen Mutationen in nicht-Cysteinresten vor, meist in der intrazellulären Tyrosinkinase-1-Domäne. Sie führen ebenfalls zu einer Aktivierung, der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. Die Aminosäuren Leucin 790 und Tyrosin 791 in Exon 13 sind die häufigsten nicht-Cystein Mutationen (5).

Die MEN2B beruht zu 95% auf einer Mutation in der intrazellulären Domäne des *ret*-Proteins, die für das Erkennen der Substrate verantwortlich ist, auf die das Signal übertragen wird. Die Aminosäure Methionin in Position 918 ist durch Threonin ersetzt. Der Pathomechanismus ist auf die Phosphorylierung falscher intrazellullärer Substrate nach Aktivierung des Rezeptors und damit auf einem falschen Signal in der Zelle zurückzuführen. Kürzlich wurde eine weitere MEN-2B auslösende Mutation nachgewiesen

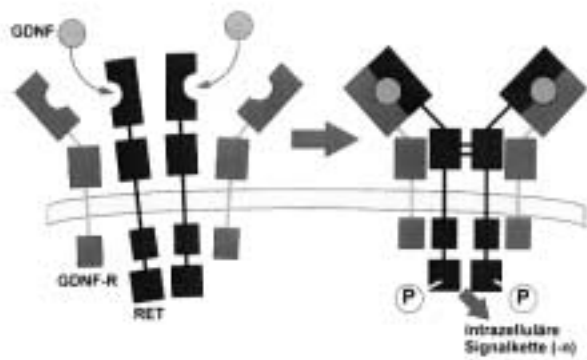


Abb 2 Dimersierung des *ret*-Proteins mit dem GDNF-Rezeptor nach Ligandenbindung und Aktivierung der intrazellulären Signalkette nach Autophosphorylierung

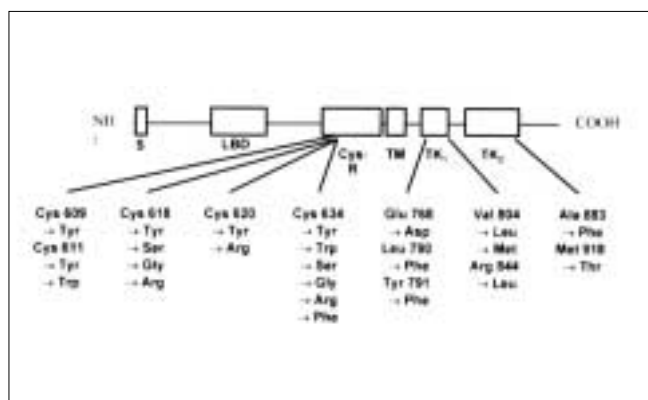


Abb 3 Lokalisation der wichtigsten aktivierenden Mutationen im *RET*-Protoonkogen

(Codon 883 in Exon 15), die möglicherweise die knapp 5% der Fälle von MEN2B erklärt, in denen bisher keine Mutationen gefunden wurden.

Bei einem Vergleich der Mutationen untereinander konnte durch in vitro Experimente gezeigt werden, daß das Ausmaß der Aktivierung des *ret*-Protoonkogens am größten ist, wenn der Cysteinrest in Position 634 in Exon 11 mutiert ist. Mehrere Studien (6,7), in denen die vorliegende Mutation im *RET*-Protoonkogen mit den in der Familie auftretenden Symptomen korreliert wurden, bestätigten dieses theoretische Ergebnis. In diesen Familien kommen meist alle assoziierten Erkrankungen (medulläres Schilddrüsenkarzinom, Hyperparathyreoidismus und Phäochromozytom) vor, während Familien mit Mutationen in den Cysteinresten in Exon 10 häufig nur von einem medullären Schilddrüsenkarzinom betroffen sind (FMTC-Familien) und einen milderen Verlauf zeigen (Tab 1). Es wäre demnach plausibel, daß das klinische Bild, möglicherweise auch der klinische Verlauf vom Ausmaß der Aktivierung des *ret*-Proteins und damit von der Art der Mutation abhängig sind.

Diese Erkenntnisse zur Genotyp-Phänotyp Korrelation haben aber bisher nur geringe klinische Bedeutung, da es immer wieder Familien mit Mutationen in anderen Aminosäuren als dem Cystein 634 gibt, die dennoch assoziierte Erkrankungen oder schwere Verläufe zeigen.

Die therapeutische Konsequenz aus dem Familienscreening ist die prophylaktische Thyreoidektomie von Genträgern (8). In Familien, in denen die Mutation im *RET* Gen bekannt ist, können die gefährdeten Familienmitglieder durch den Mutationsnachweis eindeutig ermittelt werden.

Die deutsche MEN2-Studiengruppe hat in weitgehender Übereinstimmung mit den europäischen MEN2-Studiengruppen und dem Internationalen MEN2-Consortium folgende Empfehlung zur molekulargenetischen Diagnostik und prophylaktischen Thyreoidektomie erarbeitet:

- Alle Patienten mit einem C-Zell-Karzinom, auch wenn es sich anscheinend um sporadische Fälle handelt, sollten über die Möglichkeit des Vorliegens einer Keimbahnmutation im *RET*-Prot-Onkogen informiert werden. Ihnen kann eine molekulargenetische Untersuchung empfohlen werden, wodurch die Fälle erfaßt werden, bei denen die Familienanamnese nicht hinreichend bekannt ist oder Neumutationen vorliegen. Nach der derzeitigen Erfahrung werden in ca. 5-11% der anscheinend sporadischen Fälle Keimbahnmutationen vorgefunden, also eine vererbare Form der Erkrankung nachgewiesen.
- In bekannten MEN2-Familien oder Familien mit medullärem Schilddrüsen-Karzinom ist zunächst ein Indexpatient molekulargenetisch auf die vorliegende Mutation im *RET*-Protoonkogen zu untersuchen. In mehr als 98% aller in Deutschland bekannten

Fälle wurde eine Mutation identifiziert. Alle übrigen Familienmitglieder werden auf diese Mutation überprüft. Genträger und nicht gefährdete Familienmitglieder können durch die molekulargenetische Untersuchung eindeutig identifiziert werden.

- Für Familien, in denen der MEN2A- oder FMTC-Subtyp der Erkrankung vorliegt, ist die molekulargenetische Untersuchung im 5.-7. Lebensjahr bei Kindern empfohlen. Liegt Verdacht auf die MEN2B-Form vor, ist eine Untersuchung umgehend als Bestätigung der Verdachtsdiagnose ratsam.
- Familienmitglieder, die *RET*-Mutationen tragen, die den MEN2A- oder den FMTC-Typ auslösen, sollten im Alter von 5-6 Jahren (kurz vor der Einschulung) prophylaktisch thyreoidektomiert werden. Vor dem chirurgischen Eingriff sollte eine Bestätigungsanalyse der *RET*-Mutation aus einer unabhängig abgenommenen Blutprobe angefordert werden, um Irrtümer auszuschließen.
- Familienmitglieder, die keine Mutationen aufweisen, können als nicht gefährdet eingestuft werden. Allerdings wird auch hier noch eine Bestätigungsanalyse aus einer unabhängig abgenommenen Blutprobe empfohlen.
- Ist die MEN2B-auslösende Mutation nachgewiesen, ist ohne Verzögerung eine Thyreoidektomie indiziert.

Die histologische Auswertung der ent-

Tab 1 Verteilung der häufigsten Mutationen im RET Protoonkogen und korrelierter Phänotyp bei deutschen MEN2 Familien

Exon	Codon	Aminosäure-austausch	Phänotyp	Häufigkeit
10	609	Cys → x	MEN2A, FMTC	609 - 620 insgesamt 23%
	610	Cys → x	MEN2A, FMTC	
	618	Cys → x	MEN2A, FMTC	
	620	Cys → x	MEN2A, FMTC	
11	634	Cys → x	MEN2A	66%
13	768	Gln → Asp	FMTC	< 1% 790 und 791 insgesamt 8% < 1%
	790	Leu → Phe	MEN2A, FMTC	
	791	Tyr → Phe	MEN2A, FMTC	
	804	Val → Leu Val → Met	FMTC	
14	844	Arg → Leu	FMTC	< 1%
15	883	Ala → Phe	MEN2B	5%
16	918	Met → Thr	MEN2B	95%

„x“ steht für die Umwandlung des Cysteins in eine beliebige andere Aminosäure

fernten Schilddrüsen von mittlerweile über 100 Kindern und Jugendlichen (Alter 3-18 Jahre), die Träger der *RET*-Mutationen sind, ergab, daß in allen Fällen bereits C-Zellhyperplasien und/oder C-Zell-Mikrokarzinome vorlagen (9). Dieses gilt auch für Patienten, die im Pentagastrin-Test noch negativ waren. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen von anderen Gruppen (10,11) überein. Vor dem 10. Lebensjahr sind bei MEN2A Patienten keine Metastasierungen beschrieben. Daher befindet man sich mit der Empfehlung, die Thyreodektomie im Alter von 5-7 Jahren durchzuführen auf der sicheren Seite.

Literatur

- Mulligan LM; Kwok JB; Healey CS; et al. (1993) Germline mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363, 458-60
- Donis-Keller H; Dou S, Chi D, Carlson KM, et al. (1993) Mutations in the RET protooncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum.Mol.Genet.* 2, 851-6
- Schmidt L. Duh FM, Chen F, et al. (1997) Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16,68-73
- Trupp M, Arena E, Fainzilber M, et al.(1996) Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381, 785-789
- I. Berndt, M. Reuter, B. Saller, et al. (1998) A new hot spot for mutations in the RET protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 770-774
- Frank-Raue K, Höppner W, Frilling A, et al. (1996) Mutations of the ret protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: Relation between genotype and phenotype. *J. Clin Endocrinol. Metabol.* 81, 1780-1783
- Eng, C., Clayton D, Schuffenecker I, et al.

(1996) The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2 *JAMA* 276: 1575-1579

8 Ledger GA, Khosla S, Lindor NM, Thibodeau SN, Gharib H (1995) Genetic Testing in the Diagnosis and Management of Multiple Endocrine Neoplasia Type II. *Annals of Internal Medicine* 122: 118-124

9 H. Dralle, O. Gimm, D. Simon, et al. (1998), Prophylactic thyroidectomy in 75 children and adolescents with hereditary medullary thyroid carcinoma: The German and Austrian experience, *World Journal of Surgery*, Juli 1998 im Druck

10 Wells S, Donis-Keller H (1994) Current Perspectives on the Diagnosis and Management of Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Syndromes, *Endocrinol Metab Clin North Am* 23: 215-28

11 Lips CJ; Landsvater RM, Hoppener JW, et al. (1994) Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med.* 331: 828-35

Korrespondenzadresse

PD Dr. rer. nat. Wolfgang Höppner
 Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF)
 an der Universität Hamburg
 Grandweg 64
 22529 Hamburg
 Tel 040-306-28280
 Fax 040-306-28288
 hoepfner.wolfgang@leidenberger.de