



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Ridotti livelli di espressione di Filamina A aumentano sia gli effetti mitogenici di IGF2 sia l'efficacia degli inibitori di IGF1R in cellule di carcinoma del surrene.

**Facoltà di Medicina e Odontoiatria
Dipartimento di medicina sperimentale
Corso di dottorato in scienze endocrinologiche**

**Rosa Catalano
Matricola 1800357**

Relatore
Giovanna Mantovani

Correlatore
Erika Maria Peverelli

A.A. 2019-2020

INDICE

RIASSUNTO.....	5
----------------	---

1. INTRODUZIONE

1.1 Richiami di anatomia e fisiologia delle ghiandole surrenali.....	7
1.2 Carcinomi del surrene.....	9
1.2.1 Epidemiologia.....	9
1.2.2 Eziopatogenesi.....	9
1.2.2.1 Geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e della proliferazione.....	10
1.2.2.2 β -catenina e il Wnt signalling.....	11
1.2.2.3 SF1.....	11
1.2.2.4 Recettore della melanocortina (MC2R).....	12
1.2.2.5 Fattori di crescita.....	12
1.2.2.6 microRNA (miRNA).....	13
1.2.2.7 Metilazione del DNA.....	13
1.2.3 Presentazione clinica.....	14
1.2.4 Diagnosi e prognosi.....	16
1.2.4.1 Indagine ormonale.....	16
1.2.4.2 Imaging.....	17
1.2.4.3 Classificazione istopatologica e staging.....	18
1.2.4.4 Prognosi.....	21
1.2.5 Trattamento.....	22
1.3 Il sistema dell'IGF.....	24
1.3.1 Il sistema dell'IGF, recettori e ligandi.....	24
1.3.2 L'alterazione del sistema dell'IGF negli ACCs.....	30

1.3.3	Il sistema dell'IGF come bersaglio terapeutico negli ACCs.....	32
1.4	La Filamina A (FLNA).....	34
1.4.1	FLNA struttura e funzione.....	34
1.4.2	Il ruolo della FLNA nei tumori.....	36
1.4.3	FLNA, IGF1R e IR.....	38
2.	SCOPO DEL LAVORO.....	40
3.	MATERIALI E METODI.....	41
3.1	Colture cellulari e tessuti surrenalici.....	41
3.2	Saggio di coimmunoprecipitazione.....	42
3.3	<i>In situ</i> proximity ligation assay (PLA).....	43
3.4	Silenziamento di FLNA.....	44
3.5	Western blot.....	45
3.5.1	Estrazione proteica.....	45
3.5.2	Dosaggio delle proteine secondo metodo dell'acido bicinconinico (BCA).....	46
3.5.3	Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide.....	46
3.5.4	Western Blot (trasferimento).....	47
3.5.5	Immunoblotting.....	48
3.5.6	Analisi quantitativa.....	50
3.6	Saggio di proliferazione cellulare.....	50
3.7	Saggio per la valutazione dell'apoptosi cellulare.....	50
3.8	Analisi statistiche.....	51

4. RISULTATI.....	52
4.1 La FLNA interagisce con IGF1R e IR nelle linee cellulari umane di ACC...	52
4.2 Il silenziamento di FLNA aumenta l'espressione di IGF1R e diminuisce quella di IR.....	55
4.3 Il silenziamento di FLNA aumenta gli effetti proliferativi di IGF2.....	57
4.4 Il silenziamento di FLNA potenzia gli effetti antiproliferativi degli inibitori di IGF1R Linsitinib e NVP-ADW742.....	60
4.5 Gli effetti di IGF2 e Linsitinib sulla fosforilazione di ERK nelle cellule A7 ed M2.....	62
4.6 L'espressione di FLNA negli ACCs e negli ACAs e la correlazione con il pathway di IGF.....	64
5. DISCUSSIONE.....	66
6. REFERENZE.....	72

RIASSUNTO

Il carcinoma adrenocorticale (ACC) è una rara neoplasia che si sviluppa nella parte corticale della ghiandola surrenale, la cui prognosi è infausta. Una delle alterazioni maggiormente frequenti è l'overespressione dell'insulin like growth factor 2 (IGF2), osservata nel 90% dei pazienti. L'IGF2 è in grado di generare un loop di stimolazione della proliferazione agendo in maniera autocrina sulle cellule dell'ACC. Il suo legame con l'insulin like growth factor receptor 1 (IGF1R) ed il recettore dell'insulina IR, determina l'attivazione di due principali vie di segnale intracellulare: quella di PI3K/AKT e quella delle MAPK. Data l'importanza di tale pathway nella tumorigenesi dell'ACC, numerosi studi hanno testato gli effetti degli inibitori sia di IGF1R/IR che di IGF1R, osservando promettenti risultati sulla riduzione della crescita tumorale sia in vitro che nel modello murino. Tuttavia, tali dati non sono stati confermati dal trial clinico di fase III recentemente condotto con l'inibitore Linsitinib, sottolineando la necessità di meglio comprendere i meccanismi molecolari alla base del complesso pathway dell'IGF.

La Filamina A (FLNA) è una proteina del citoscheletro che lega e regola la struttura dei filamenti actinici e funge da scaffold per numerose molecole. È importante inoltre per l'ancoraggio di proteine transmembrana al citoscheletro e la regolazione dell'internalizzazione, trafficking e trasduzione del segnale di numerosi recettori. Recentemente è stato dimostrato il suo ruolo nella regolazione sia dell'IGF1R, nelle cellule progenitrici neuronali, sia di IR, nelle cellule di melanoma. Tuttavia ad oggi non è ancora noto se FLNA sia in grado di interagire e/o regolare l'attività dei due recettori nell'ACC.

Utilizzando due linee cellulari umane derivanti dal carcinoma del surrene, le H295R (che esprimono e secernono IGF2) e le SW13 (non secernenti IGF2) e le colture primarie derivanti da ACC chirurgicamente rimossi; lo scopo di questo studio è stato quello di testare: 1) il coinvolgimento di FLNA nel regolare l'espressione ed il signalling di IGF1R ed IR 2) il ruolo di FLNA nel modulare la risposta al Linsitinib, inibitore di IGF1R/IR, e all'NVP-ADW742, inibitore specifico di IGF1R. Inoltre è stata valutata l'espressione di FLNA

negli ACCs e la sua correlazione con l'espressione di IGF1R, IR ed il signalling intracellulare.

Nelle linee cellulari H295R e SW13 abbiamo osservato che FLNA interagisce con IGF1R ed IR e che la stimolazione del recettore induce rispettivamente un aumento ed una riduzione dell'interazione con IGF1R e IR. Il silenziamento genico di FLNA in entrambe le linee cellulari induce un significativo aumento di IGF1R ed una riduzione dell'espressione di IR, con un incremento della proliferazione cellulare accompagnato da un innalzamento della fosforilazione di ERK. In accordo, nella coltura primaria il knockdown di FLNA determina un aumento dell'espressione di IGF1R ed un innalzamento degli effetti di IGF2 sulla fosforilazione di ERK. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che FLNA nel carcinoma del surrene è un repressore specifico del signalling IGF2 indotto. In assenza di FLNA, l'aumentata espressione di IGF1R, associata alla perdita dell'attività regolatoria di FLNA sul pathway di ERK, concorre alla promozione della crescita cellulare IGF2 indotta. In aggiunta, abbiamo dimostrato che nelle cellule H295R il silenziamento di FLNA potenzia gli effetti antiproliferativi sia dell'inibitore di IGF1R/IR Linsitinib che dell'inibitore specifico di IGF1R NVP-ADW742.

Infine, le analisi al western blot hanno mostrato una ridotta espressione di FLNA negli ACCs (n=10) rispetto agli ACAs (n=10) e, solamente negli ACCs, una correlazione inversa del rapporto FLNA/IGF1R con la fosforilazione di ERK. Questo suggerisce, in accordo con i dati sulle linee e le colture primarie, che bassi livelli di FLNA negli ACCs, in presenza di elevata espressione di IGF1R, aumentano il signalling di IGF2 ed in particolar modo la via di ERK.

In conclusione, in tale lavoro abbiamo dimostrato che bassi livelli di FLNA aumentano sia gli effetti proliferativi di IGF2 che l'efficacia degli inibitori di IGF1R/IR nelle cellule di carcinoma del surrene. Questo propone FLNA come un nuovo fattore influenzante l'andamento clinico del tumore e la risposta alla terapia con i farmaci anti-IGF1R/IR.

1. INTRODUZIONE

1.1 Richiami di anatomia e fisiologia delle ghiandole surrenali

I surreni sono due piccole ghiandole endocrine, situate nella cavità addominale in sede retroperitoneale, a contatto con il polo superiore di ciascun rene. Sono quindi contenute all'interno della loggia renale, avvolte da una capsula connettivale e circondate dal tessuto adiposo della capsula adiposa renale. Il surrene destro ha una forma di piramide triangolare mentre quello sinistro ha un aspetto a semiluna. Nell'adulto il surrene pesa circa 4-6 grammi e misura circa 5 cm in altezza, 3 in larghezza ed 1 cm in diametro anteroposteriore. Tuttavia, dimensioni, consistenza e peso sono influenzate dall'età, dal sesso e da eventuali condizioni fisiologiche e patologiche.

La ghiandola surrenale è costituita da due parti completamente diverse per origine e funzione: la corticale e la midollare, i cui confini risultano però irregolari.

La corticale definita anche corteccia surrenalica, costituisce l'80% del volume totale del surrene, ha una origine mesodermica ed una organizzazione cordonale. A seconda della disposizione dei cordoni cellulari si possono distinguere tre differenti strati che dal più superficiale al più profondo vengono denominati: zona glomerulare, zona fascicolata e zona reticolare. La zona glomerulare è così definita in quanto i cordoni si avvolgono su se stessi formando dei gomitoli separati dal resto del tessuto connettivo. Rappresenta circa il 15% dello spessore della corticale e produce ormoni mineralcorticoidi deputati alla regolazione del bilancio idro-elettrolitico dell'organismo. Il principale ormone mineralcorticoide presente in circolo è l'aldosterone, il quale, a livello del nefrone distale, aumenta il riassorbimento di sodio ed acqua e l'escrezione di potassio e ioni idrogeno. A regolare la liberazione dei mineralcorticoidi vi è il sistema renina-angiotensina e in minor parte l'ACTH e l'ormone natriuretico atriale. La zona fascicolata è così definita in quanto si presenta con dei cordoni con andamento rettilineo, paralleli gli uni agli altri, tali da essere nominati fascicoli. Rappresenta circa il 75% dello spessore della corticale e sotto il

controllo dell'ACTH ipofisario secerne ormoni glucocorticoidi il cui maggior rappresentante è il cortisolo. I glucocorticoidi svolgono numerose funzioni. Hanno un ruolo nella regolazione del metabolismo cellulare favorendo il catabolismo proteico, la gluconeogenesi e la lipolisi e riducendo la captazione periferica del glucosio da parte del tessuto muscolare e di quello adiposo. Espletano un'azione immunosoppressiva ed anti-infiammatoria, agiscono sul sistema cardiovascolare esercitando un'azione ionotropa diretta sul miocardio ed esplicando un'azione permissiva sull'effetto delle catecolammine e dell'angiotensina sulla cellula muscolare liscia vasale. Regolano il metabolismo del calcio agendo su due livelli: riducono la sintesi e antagonizzano l'azione dell'1,25-diidrossicolecalciferolo e riducono l'assorbimento intestinale di calcio promuovendo la sua escrezione a livello urinario. Agiscono sull'osso inibendo la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi del collagene e promuovendo il riassorbimento osseo mediante azione inibitoria sugli osteoblasti ed azione attivatrice sugli osteoclasti. Aumentano la velocità di filtrazione glomerulare e riducono il riassorbimento di fosfato nel tubulo prossimale, stimolano la secrezione acida gastrica e hanno effetto inibitorio sulla secrezione di altri ormoni come la somatotropina, la tireotropina e le gonadotropine. Infine, espletano anche effetti sul sistema neuropsichico (Baldissera 2009). La restante parte della corteccia è costituita dalla zona reticolare così definita per l'organizzazione a rete tridimensionale dei cordoni cellulari. Le cellule site in tale regione sono deputate alla produzione di ormoni steroidei ad azione androgena, il cui principale rappresentante è il deidroepiandrosterone (DHEA). La stimolazione alla secrezione è fornita dall'ACTH e LH, che si ritiene agiscono nel mantenimento della secrezione ormonale basale. Nel maschio prima dello sviluppo puberale il surrene costituisce la principale fonte di androgeni al contrario, nel maschio post-pubere, gli effetti di questo ormone sono limitati in quanto la principale fonte di androgeni è testicolare. Al contrario, nella donna il contributo androgenico surrenalico è maggiore di quello ovarico.

La midollare deriva invece dalla cresta neurale e occupa la parte centrale dell'organo. È deputata alla produzione e rilascio delle catecolammine ed in particolar modo l'80% è costituito da adrenalina e il restante 20% da noradrenalina (Anastasi 2007).

1.2 Carcinomi del surrene

I tumori che colpiscono la ghiandola surrenalica sono nella maggior parte dei casi benigni e solo una piccola parte è costituita da forme maligne. Possono colpire la parte corticale con presenza o assenza di ipersecrezione ormonale (ormoni funzionanti o non funzionanti), oppure la parte midollare. Il carcinoma adrenocorticale (ACC, adrenocortical carcinoma) è un raro tumore endocrino che si sviluppa nella parte corticale della ghiandola surrenalica, spesso aggressivo, con prognosi infausta e scarse terapie efficaci a disposizione.

1.2.1 Epidemiologia

L'incidenza è compresa tra 0.7 e 2 casi per milione per anno (Kerkhofs 2013, Else 2014) tuttavia, nei bambini del sud del Brasile, a causa dell'elevata prevalenza della mutazione p. R337H nel gene TP53 (Figueiredo 2006, Garritano 2010, Pinto 2004), l'incidenza è straordinariamente elevata, compresa tra 2.9 e 4.2 rispetto allo 0.2-0.3 per milione di bambini per anno del resto del mondo (Pianovski 2006). Questo tipo di tumore colpisce entrambi i sessi ma in modo più evidente le donne con un rapporto femmine:maschi 1.5-2.5:1, anche se non è chiaro cosa spieghi esattamente questa differenza. Inoltre, presenta una distribuzione bimodale con un picco nella prima infanzia ed un altro nella quinta e sesta decade (Else 2014).

1.2.2 Eziopatogenesi

Nella maggior parte dei casi si tratta di neoplasie sporadiche tuttavia vi sono casi in cui il carcinoma del surrene si manifesta come componente di sindromi tumorali ereditarie, tra queste vi sono: la Li-Fraumeni (LFS), la sindrome di Beckwith-Wiedemann, la neoplasia

multipla endocrina tipo 1 (MEN1), il Carney complex e la sindrome di Lynch (Jouinot 2019). La patogenesi dell'ACC risulta ad oggi ancora poco nota nonostante negli ultimi decenni i numerosi studi e l'utilizzo di tecnologie come l'exome sequencing e le analisi dei single nucleotide polymorphisms (SNPs) abbiano evidenziato diversi geni e pathway coinvolti nella tumorigenesi e progressione degli ACCs. È stato dimostrato il ruolo di numerosi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e proliferazione e nel pathway Wnt. Sono inoltre state evidenziate alterazioni nella metilazione del DNA e nell'espressione del fattore steroidogenico 1 (SF1), del recettore della melanocortina, di diversi fattori di crescita e di numerosi miRNA (Rechache 2012, Xu 2014, Assié 2019, Zheng 2016). Si ritiene l'esistenza di un processo di tumorigenesi multi-step che prevede la progressiva acquisizione e accumulo di mutazioni genetiche.

1.2.2.1 Geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e della proliferazione.

I due studi cardine di Zheng et al (Zheng 2016) ed Assié et al (Assié 2019), che hanno permesso un'analisi comprensiva genomica degli ACCs, hanno evidenziato numerose alterazioni nei regolatori del ciclo cellulare ed in particolar modo nei passaggi dalla fase G1 alla S e dalla fase G2 alla M. Le alterazioni maggiormente presenti sono quelle che impattano il passaggio dalla fase G1 alla S con mutazioni o delezioni in omozigosi di TP53, CDKN2A e RB1 a cui si aggiungono alterazioni in CDK4 ed MDM2 che conducono verso una incontrollata proliferazione cellulare (Zheng 2016, Assié 2019). Negli ultimi anni, numerosi studi hanno concentrato la loro attenzione sul ruolo di TP53, gene codificante per l'oncosoppressore p53, le cui mutazioni somatiche sono state osservate in casi sporadici di ACCs sia negli adulti (Reincke 1994, Libe 2007) che nei bambini (Wagner 1994). Inoltre, nei bambini del sud del Brasile è stata dimostrata la presenza di una ricorrente mutazione germinale, p.R337H (Wagner 1994). Tutte queste alterazioni sono state associate ad una prognosi infausta (Assié 2019).

Meno frequenti sono invece le alterazioni in geni coinvolti nella transizione G2-M. Tra queste è stata descritta l'overespressione del gene CDC25, CDC2, PLK1, TOP2A e CCNB2

anche se non sono state viste per quest'ultima le corrispondenti alterazioni cromosomiche (Szabo 2010, Tombol 2009, de Reynies 2009, Giordano 2003).

1.2.2.2 β -catenina e il Wnt signalling

Il signalling di Wnt gioca un ruolo molto importante per lo sviluppo corticale e la β -catenina è un elemento chiave di questo pathway. Wnt si lega al suo recettore determinando l'inibizione del complesso axin-adenomatous polyposis coli (APC) – glicogeno sintetasi chinasi 3 β (GSK-3), il quale non è in grado di fosforilare la β -catenina che quindi si accumula nel citoplasma, viene traslocata al nucleo e lega fattori di trascrizione che inducono l'espressione dei geni target di Wnt. Diversi studi hanno evidenziato un accumulo di β -catenina nel citoplasma e/o nel nucleo nei carcinomi del surrene indicando l'attivazione del signalling Wnt (Tissier 2005, Gaujoux 2011). Gli studi condotti sui geni coinvolti in tale pathway hanno rilevato mutazioni nel gene codificante per la β -catenina CTNNB1 e mutazioni somatiche in APC rispettivamente nel 16 e 2-3% dei casi di ACCs. Inoltre, sono state identificate sia mutazioni che delezioni nel gene ZNRF3 che codifica per una ubiquitin ligasi E3 transmembrana che agisce come regolatore con meccanismo a feedback negativo del signalling Wnt (Assié 2019, Zheng 2016). Tutte le mutazioni sopra citate determinano una maggiore attivazione della β -catenina e, nel caso specifico di CTNNB1, le alterazioni riducono o aboliscono la fosforilazione di GSK3 β con conseguente accumulo di proteina nella cellula (Assié 2019, Zheng 2016). Infine, Ragazzon et al suggeriscono che le alterazioni in tale pathway costituiscano un fattore prognostico negativo per i carcinomi del surrene (Ragazzon 2010).

1.2.2.3 SF1

SF1 è un fattore di trascrizione nucleare che svolge un ruolo pilota nello sviluppo e funzione dei tessuti steroidogenici e nella regolazione dell'espressione dell'enzima steroidogenico citocromo P450 nella corteccia surrenalica. Il suo coinvolgimento nella tumorigenesi dell'ACC è stato dimostrato da studi condotti sia negli adulti che nei

bambini affetti da ACC dove sono state rilevate sia amplificazione che overespressione di tale gene (Pianovski 2006, Figueiredo 2005). Inoltre, nel 2010 Sbiera ha dimostrato la correlazione tra espressione di SF1 ed una peggiore evoluzione clinica (Sbiera 2010).

1.2.2.4 Recettore della melanocortina (MC2R)

MC2R è un membro della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G. Esso è coinvolto nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e, in seguito al legame con l'ACTH, stimola la steroidogenesi nelle cellule surrenaliche. Nei tumori surrenalici non sono state identificate mutazioni (Beuschlein 2001), tuttavia l'identificazione nel 1997 da Reincke et al di LOH (loss of heterozygosity) in due dei quattro ACCs analizzati suggerisce che MC2R potrebbe contribuire alla tumorigenesi (Reincke 1997).

1.2.2.5 Fattori di crescita

Sono numerosi i fattori di crescita che sono in grado di regolare la crescita tumorale e la funzione surrenalica. L'insulin like growth factor 2 (IGF2) e di conseguenza l'intero pathway, è uno dei fattori di crescita maggiormente studiato. La presenza di riarrangiamenti, LOH ed imprinting anomalo del locus 11p15.5 determinano una overespressione nell'80-90% dei casi di ACC (Gicquel 1997, Soon 2009 A). L'importanza di tale aspetto verrà trattata in maniera più approfondita più avanti.

Tra gli altri fattori di crescita coinvolti vi è il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) il quale fisiologicamente promuove la proliferazione delle cellule endoteliali e la loro migrazione. È stato dimostrato che l'espressione di VEGF è significativamente elevata sia nel tessuto tumorale che nel sangue circolante dei pazienti con ACC (Zacharieva 2004, de Fraipont 2000) e che gli elevati livelli di VEGF circolanti diminuiscono dopo resezione completa del tumore (Kolomecki 2000, Kolomecki 2001). Tuttavia, tale overespressione non è correlata con aumento bensì con bassa vascolarizzazione, indicando che vi è una dissociazione tra lo stato angiogenetico e le capacità di neoangiogenesi del tumore (Bernini 2002). Recentemente, è stata inoltre analizzata l'espressione del recettore VEGF-R2 negli

ACCs e negli adenomi adrenocorticali (ACAs) con overespressione nel 79% e 25% dei casi rispettivamente (Xu 2011).

Anche il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è overespresso nel 90% degli ACCs e molto poco espresso negli ACAs (Xu 2014, Nakamura 2009). L'incidenza delle mutazioni negli ACCs è però molto bassa (circa del 5%) e fino ad oggi sono state descritte 7 diverse mutazioni attivanti del recettore sia missenso che non senso (Hermsen 2013, Kotoula 2009, Adam 2010).

Infine, anche il sistema dei fattori di crescita fibroblastici risulta alterato con overespressione di FGFR4, uno dei quattro recettori ai quali si legano i due fattori di crescita fibroblastici FGF1 e 2, sia negli ACCs pediatrici che negli adulti (van Nederveen 2007, Brito 2012).

1.2.2.6 microRNA (miRNA)

Numerose ricerche indicano che i non coding RNAs (ncRNAs), specialmente i miRNAs, sono fortemente implicati nella tumorigenesi e progressione degli ACCs. I miRNAs sono piccoli non coding RNA di circa 20-22 nucleotidi che agiscono come regolatori post-trascrizionali della stabilità e/o traduzione degli RNA messaggeri e sono per questo coinvolti in numerosi processi cellulari. Uno dei primi ad esaminare questo aspetto è stato Tombol et al nel 2009 il quale ha identificato una diversa espressione di sei miRNAs confrontando ACCs, adenomi adrenocorticali cortisolo secernenti (CPAs), adenomi adrenocorticali inattivi e campioni di tessuto surrenalico normale. Le analisi effettuate mediante PCR quantitativa (qPCR) hanno evidenziato una diversa espressione di: miR-184, miR-210, miR-214, miR-375, miR-503 e miR-511. Di questi miR-184, miR-210 e miR-503 sono risultati overespressi negli ACCs rispetto agli adenomi ed al tessuto sano (Tombol 2009). Studi successivi hanno messo in luce il ruolo di miR-195 e miR-335 entrambi downregolati negli ACCs rispetto agli ACAs e di miR-483-5p up-regolato. Inoltre, un altro passo in avanti è stato fatto nel 2012 quando Singh et al hanno dimostrato il ruolo chiave di altri tre miRNA: miR-139-3p, miR-675 and miR-335 (Singh 2012).

1.2.2.7 Metilazione del DNA

Negli ultimi anni numerosi studi hanno messo in luce il ruolo di diverse modificazioni epigenetiche nella carcinogenesi di diversi tumori. Differenze nel profilo di metilazione permettono una distinzione accurata tra ACC ed i tumori benigni del surrene. Rechache et al nel 2012 hanno effettuato uno studio del metiloma del DNA evidenziando una generale ipometilazione negli ACCs rispetto agli adenomi e numerosi siti CpG differenzialmente metilati negli ACCs rispetto agli ACAs. Tra questi vi sono: KCTD12, KIRREL, SYNGE1, NTNG2 e la regione 11p15 inclusa in IGF2 e H19 (Rechache 2012). Contemporaneamente Fonseca et al hanno evidenziato una elevata e significativa ipermetilazione in numerosi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, apoptosi e regolazione trascrizionale, dimostrando la presenza di 212 CpG islands ipermetilate negli ACCs (Fonseca 2012).

1.2.3 Presentazione clinica

Il carcinoma del surrene nel 60% dei casi si presenta con una ipersecrezione ormonale mentre nella restante percentuale si tratta di un carcinoma inattivo (Allolio 2006).

Gli ACCs caratterizzati da ipersecrezione ormonale si presentano comunemente con ipercortisolismo, iperandrogenismo o entrambi. Meno comuni sono invece i casi di ipersecrezione di estrogeni negli uomini e di iperaldoesteronismo (Torti 2020, Allolio 2006). L'ipercortisolismo che si manifesta come sindrome di Cushing, può presentarsi con plethora, diabete mellito, osteoporosi, strie rubre nella regione addominale, debolezza muscolare, obesità al tronco ed atrofia muscolare (Allolio 2006). Gli studi condotti negli ultimi anni hanno dimostrato un'associazione tra l'ipersecrezione del cortisolo nei pazienti affetti da ACC ed una peggiore sopravvivenza. Tale dato è stato spiegato dall'effetto negativo che il cortisolo ha sul sistema immunitario e su quello cardiovascolare (Vanbrant 2018). Inoltre, i dati ad oggi indicano un maggior rischio di ricorrenza negli ACCs cortisolo secernenti, che risultano infatti quelli con un fenotipo più aggressivo (Vanbrant 2018). L'iperandrogenismo è caratterizzato in genere dalla ipersecrezione di più ormoni androgeni contemporaneamente. Tra questi i principali sono il testosterone, il

deidroepiandrosterone (DHEA), il DHEA-solfato (DHEA-S) e l'androsterone (Cordera 2003, Moreno 2004). Per ciò che concerne il DHEA-S è stato visto che alti livelli correlano con ACC mentre riduzione dei suoi livelli suggeriscono la presenza di adenoma del surrene (Fassnacht 2004). L'iperandrogenismo si presenta con calvizie, virilizzazione, irsutismo (specialmente sul viso, petto e schiena) ed acne. Nelle donne si hanno alterazioni delle mestruazioni e più raramente allargamento del clitoride ed ipertensione (Torti 2020, Pingle 2020). Molto meno frequenti sono i casi di eccessi di produzione degli estrogeni, che rappresentano l'1-3% di tutti gli ACCs (Torti 2020). Quando questa overproduzione è presente negli uomini si assiste ad una sindrome di femminizzazione definita FAT (feminizing adrenal tumor) che si manifesta con ginecomastia, atrofia testicolare e perdita del desiderio sessuale (Moreno 2006). Infine, l'ipersecrezione di aldosterone induce ipertensione e pronunciata ipocaliemia con valori medi di potassio pari a 2.3 ± 0.08 mmol/L (Torti 2020, Allolio 2006).

La percentuale di ACCs funzionanti rispetto ai non funzionanti è di gran lunga maggiore nei bambini (90% dei casi) rispetto agli adulti. Nei bambini si ha comunemente produzione di androgeni con induzione di una pubertà precoce e virilizzazione (Ribeiro 1990).

Oltre ai sintomi correlati all'eccesso ormonale sono stati descritti anche sintomi aspecifici come il dolore al fianco, la sazietà precoce e la pienezza addominale; patologie correlate come la presenza di trombosi venosa profonda ed embolismo polmonare ed infine sintomi paraneoplastici, seppur rari, come l'ipoglicemia mediata da IGF2 che prende il nome di sindrome di Anderson (Torti 2020). Ad aggiungersi vi sono la leucocitosi, la policitemia e l'iperaldosteronismo iperreninamico causati dalle chemochine tumorali (Else 2014).

Nel 40% restante dei casi l'ACC è inattivo. Tali pazienti spesso rimangono asintomatici fino alla presenza di segni e sintomi dati dalle metastasi che si manifestano principalmente nel fegato, nel polmone e nell'osso (Torti 2020, Bellantone 1997). In molti di questi pazienti con ACC apparentemente ormonalmente inattivo le elevate concentrazioni dei precursori degli steroidi come l'androstenedione o il 17-idrossiprogesterone possono essere utili nello

stabilire l'origine surrenalica del tumore (Allolio 2006). Tra i sintomi che possono incorrere vi sono: nausea, vomito, pienezza addominale, dolore alla schiena e più raramente febbre, perdita di peso e anoressia (Allolio 2006).

1.2.4 Diagnosi e prognosi

Secondo le linee guida ogni paziente con sospetto ACC deve sottoporsi ad un'attenta valutazione a partire dall'anamnesi e dall'esame clinico dei segni e sintomi di eccesso ormonale. La valutazione ormonale completa accompagnata dall'utilizzo di tecniche di imaging è di fondamentale importanza per una corretta diagnosi. L'applicazione di ulteriori tecniche di imaging estese ad altre aree corporee quali il cervello e/o l'osso sono invece indicate laddove vi è un sospetto clinico di metastasi (Fassnacht 2018).

1.2.4.1 Indagine ormonale

L'analisi ormonale completa è innanzitutto necessaria per confermare l'origine surrenale del tumore e comprendere quindi l'approccio terapeutico da adottare, è inoltre uno strumento utile per il monitoraggio della patologia. L'European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) suggerisce infatti un controllo completo ormonale pre-operatorio al fine di investigare un possibile ACC (Allolio 2006). In particolare le raccomandazioni includono la valutazione del cortisolo basale, dell'ACTH, del DHEAS, del 17-idrossiprogesterone, del testosterone, dell'androstenedione e dell'estradiolo così come il test di soppressione del desametasone e quello urinario del cortisolo (Allolio 2006). Recenti evidenze sottolineano infatti l'importanza ai fini della diagnosi dell'analisi degli steroidi presenti nelle urine (Arlt 2011). Alcuni pattern di secrezione ormonale sono indicativi di malignità come l'estradiolo nell'uomo, le elevate concentrazioni di DHEA-S nelle donne e la secrezione di precursori degli steroidi (Allolio 2006). Inoltre, è di grande importanza l'esclusione di diagnosi di feocromocitoma mediante indagine ormonale in quanto le tecniche di imaging non sono di supporto per tale distinzione. Le analisi delle catecolammine urinarie mediante raccolta delle 24h e di meta e noranefrine nel sangue

sono due test utili per tale distinzione (Fassnacht 2004). È importante sottolineare che non vi è correlazione tra le dimensioni della massa tumorale ed i livelli ormonali nel sangue e/o i sintomi ad essi correlati (Torti 2020).

1.2.4.2 Imaging

Le tecniche di imaging sono invece importanti non solo per caratterizzare la lesione ma anche per lo staging (Allolio 2006). Tali tecniche consentono innanzitutto l'analisi delle dimensioni della massa tumorale permettendo una prima ipotetica distinzione tra la lesione benigna e maligna. I carcinomi del surrene infatti presentano tipicamente un diametro superiore ai 6 cm (Johnson 2009), tuttavia una piccola percentuale di lesioni in genere inferiori ai 4 cm possono essere maligni (Lau 2002). Inoltre, è possibile una prima visualizzazione della massa seppur è bene tenere presente della forte eterogeneità con cui possono presentarsi (emorragie interne, necrosi e calcificazioni). Infine, permettono l'individuazione di metastasi al polmone, linfonodi o fegato e l'estensione del tumore alla vena renale, alla vena cava inferiore o ancora agli organi adiacenti (Torti 2020). Sono tre le tecniche di imaging che permettono di effettuare una corretta analisi: 1) la tomografia computerizzata (CT), 2) la risonanza magnetica per immagini (MRI) e 3) la tomografia ad emissione di positroni (PET).

In caso di sospetto di ACC è necessaria l'esecuzione di una CT addominale. Molti studi hanno stabilito che le lesioni benigne presentano un valore inferiore o uguale ai 10 Hounsfield Unit (HU) nella CT senza contrasto (Allolio 2006). I carcinomi adrenocorticali contenendo aree di grasso o lipidi intracellulari possono avere un valore superiore ai 10 HU (Egbert 2010). Nel caso in cui però una massa surrenalica presentasse una densità superiore ai 10 HU, per discriminare la lesione benigna dal carcinoma può essere utilizzato il washout del mezzo di contrasto. Un washout assoluto superiore al 50% suggerisce una lesione benigna (Libé 2019). Quando la CT non riesce perfettamente a caratterizzare la lesione e vi è sospetto di ACC, si ricorre alla MRI. La MRI ha una sensibilità per la differenziazione tra tumori benigni e maligni pari all'81-89% ed una

specificità compresa tra 92 e 99%. I carcinomi del surrene presentano una bassa intensità a livello del fegato nelle immagini in T1 ed una intensità variabile tra intermedia ed elevata nelle sequenze in T2. Inoltre, è evidente un innalzamento dopo somministrazione di gadolinio ed il washout è generalmente basso (Heinz-Peer 1999, Honigschnabl 2002). La risonanza magnetica è uno strumento migliore anche per la valutazione dell'intervento chirurgico in quanto permette un'individuazione migliore dell'invasione a livello della vena cava inferiore o degli organi adiacenti, ma risulta più costosa e meno standardizzata (Allolio 2006). Infine, la PET è un'ulteriore tecnica di supporto per la diagnosi di ACC la quale viene eseguita con fluorodeossiglucosio (FDG), 11C-metomidate (MTO) o ancora 123I-MTO. I carcinomi del surrene si presentano tipicamente come una massa eterogenea con un intenso uptake di FDG più elevato del background del fegato (Allolio 2006). Una meta analisi pubblicata nel 2006 ha dimostrato come la FDG PET/CT sia una tecnica in grado di distinguere i tumori surrenalici benigni da quelli maligni con una sensibilità del 97% e una specificità del 91% (Leboulleux 2006). Tuttavia, la FDG-PET o CT non è in grado di distinguere il carcinoma del surrene dalle metastasi, linfomi o feocromocitomi in quanto anch'essi presentano un'elevata attività metabolica (Sundin 2012). Negli ultimi anni è emersa anche l'importanza dell'utilizzo del metomidate (11C-MTO), un nuovo tracciante altamente specifico per il surrene che lega gli enzimi CYP11B responsabili della catalisi dell'ultima reazione biochimica per la sintesi degli steroidi (Hahner 2008). Recenti evidenze suggeriscono anche il suo impiego per la valutazione del potenziale metastatico del tumore (Allolio 2006).

Le tecniche di imaging sono inoltre utili, come già precedentemente detto, per lo staging del tumore. Tuttavia, solo dopo l'intervento chirurgico e l'analisi istopatologica della massa tumorale è possibile effettuare una diagnosi e staging completo.

1.2.4.3 Classificazione istopatologica e staging

Il carcinoma del surrene si presenta con un colore che varia da marrone ad arancione a giallo a seconda del contenuto lipidico delle cellule, una necrosi diffusa e dei margini

irregolari. È comune una invasione della capsula ed una locale dei tessuti extrasurrenali così come una diretta invasione dei vasi linfatici e/o sanguigni. Inoltre, può presentare metastasi a distanza. Tutte queste caratteristiche sono però aspecifiche e non frequenti all'inizio dello sviluppo dell'ACC tale per cui è resa difficoltosa la differenziazione tra la lesione maligna e quella benigna (Torti 2020). Proprio per questo nel 1984 Luis Weiss ha proposto un sistema di classificazione istopatologica per i tumori adrenocorticali basato su 9 criteri (Weiss 1989):

- 1- Grado nucleare di III o IV
- 2- Elevato grado mitotico
- 3- Presenza di mitosi atipiche
- 4- Percentuale di cellule chiare (meno o pari al 25% di tutte le cellule tumorali)
- 5- Architettura diffusa
- 6- Necrosi microscopica
- 7- Invasione venosa
- 8- Invasione sinusoidale
- 9- Invasione capsulare

La presenza di tre o più caratteristiche è indice di carcinoma del surrene. Benchè tale sistema sia imperfetto e gli ACCs poco differenziati possano essere confusi con il carcinoma renale, ad oggi è il sistema adottato dalla classificazione WHO per la determinazione di malignità del tumore (Papotti 2011). In aggiunta, l'ultima classificazione WHO riconosce anche alcune varianti istologiche tra cui la variante oncocitica e le due più rare mixoide e sarcomatoide. In questo modo è permessa la diagnosi di sottotipi che altrimenti, sulla base del Weiss score, non verrebbero identificati. La variante oncocitica che tra le tre risulta la più comune, è così nominata perché il tipo di cellula predominante è un oncocita, una cellula con citoplasma abbondantemente

granulare correlato all'accumulo di mitocondri e reticolo endoplasmatico (RE) (Torti 2020). La problematica nell'utilizzare il Weiss score risiede nella differenziazione tra l'adenoma e il carcinoma oncocitico e pertanto è necessario ricorrere al sistema Lin-Weiss-Bisceglia (Papotti 2011). La variante mixoide è invece così detta perché presenta abbondante mucina extracellulare nello stroma mentre la perdita di differenziazione corticale caratterizza il carcinoma sarcomatoide (Torti 2020).

Oltre agli indici sopra elencati può essere utilizzando anche il Ki67 per differenziare gli adenomi dai carcinomi surrenalici. In aggiunta, in maniera simile, l'analisi dell'espressione di IGF2 può supportare la diagnosi (Torti 2020).

Ad oggi le indicazioni di staging adottate per il carcinoma del surrene sono quelle proposte dall'ENSAT (Else 2014), in cui il carcinoma è classificato in 4 stadi, rifacendosi all'ottava classificazione TNM (tumor, node, metastasis) (Lacroix 2018). Il sistema è riassunto nella tabella sottostante:

Stadio	
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1-4, N1, M0 T3-4, N0, M0
IV	T1-4, N0-1, M1

Tab 1.: Attuale sistema di staging del carcinoma surrenalico. T1: tumore inferiore ai 5 cm; T2: tumore maggiore di 5 cm; T3: tumore infiltrante i tessuti circostanti; T4: tumore infiltrante organi circostanti (compresa la vena cava e quella surrenalica); N0: linfonodi negativi; N1: presenza di linfonodi regionali metastatici; M0: nessuna localizzazione a distanza; M1: presenza di metastasi a distanza.

1.2.4.4 Prognosi

Basandosi sul sistema di staging dell'ENSAT la percentuale di sopravvivenza a 5 anni è (Torti 2020, Libé 2015):

- Dal 66% all'82% nei pazienti di stadio I
- Dal 58 al 64% nei pazienti con stadio II
- Dal 24 al 50% nei pazienti con stadio III
- Dallo 0 al 17% nei pazienti con stadio IV

Vi sono diverse evidenze che illustrano come lo stato di resezione e il grado del tumore giochino un ruolo importante nella sopravvivenza senza recidiva dei casi di ACC localizzato. I pazienti infatti il cui tumore localizzato è stato completamente rimosso avranno minore probabilità di sviluppare una recidiva rispetto a quelli con un tumore avanzato e margini macroscopicamente positivi (Torti 2020, Icard 2001, Fassnacht 2009).

Inoltre, è stato visto che l'indagine del Ki67 è un buon indicatore di prognosi. Nei giovani pazienti con ACC allo stadio I, II o III, un basso Ki67 è un fattore predittivo positivo per la sopravvivenza senza recidiva (Baudin 2015).

Al contrario la produzione di cortisolo e l'avanzato stadio del tumore (stadio II e IV) sono fattori prognostici negativi per la sopravvivenza e la ricorrenza della patologia (Bonnet-Serrano 2018). Inoltre, un'età superiore ai 45 anni e la presenza di metastasi accompagnate dalla non completa rimozione del tumore sono associate ad una bassa sopravvivenza (Phan 2007).

Infine, come già esplicitato precedentemente, la presenza di mutazioni in p53 e in altri geni coinvolti nel ciclo cellulare così come l'accumulo di β -catenina sono correlati a prognosi negativa (Assié 2019, Ragazzon 2010). Allo stesso modo, è stato dimostrato un diverso pattern di espressione di miRNA tra pazienti con tumore ricorrente e non (Fonseca 2012) ed evidenziato in particolar modo il ruolo di biomarcatori non invasivi con elevato e specifico valore prognostico di miR-483-5p e miR-195 (Soon 2009 A, Soon 2009 B). Al

contrario IGF2, H19 e CDKN1C non hanno mostrato una chiara relazione con la prognosi (Bonnet-Serrano 2018).

1.2.5 Trattamento

Ad oggi, il gold standard è la rimozione chirurgica. Le linee guida raccomandano rimozione *en bloc* del tumore incluso il grasso peri-tumorale/peri-surrenalico retroperitoneale ed i linfonodi adiacenti coinvolti. La chirurgia a cielo aperto è l'approccio chirurgico standard tuttavia, per tumori di dimensioni inferiori ai 6 cm senza evidenza di invasione a livello locale è ragionevolmente utilizzabile una surrenectomia in laparoscopia. È inoltre raccomandato l'utilizzo dell'idrocortisone peri-operatorio in tutti i pazienti con ipercortisolismo (Fassnacht 2018). Va tenuto presente che la resezione chirurgica non è un trattamento curativo nella maggior parte dei pazienti, in quanto si ipotizza che micro-metastasi occulte siano già presenti nelle prime fasi di malattia (Lacroix 2018). Nei pazienti con elevato rischio di ricorrenza, vengono somministrate terapie adiuvanti in seguito all'intervento chirurgico. Tra queste vi è il mitotano e l'irradiazione del tumore. Il mitotano deriva dall'insetticida DDT ed è un farmaco adrenolitico che presenta un'azione inibitoria della steroidogenesi surrenalica. È stato dimostrato che è in grado di inibire molteplici steps enzimatici della biosintesi degli steroidi, mediante riduzione sia dell'attività di specifici enzimi (CYP11B1 e 18-idrossilasi), sia dei livelli di mRNA di altri enzimi come il CYP11A1 e CYP17A1 (Paragliola 2018). Tale farmaco può essere somministrato fino ad un massimo di 5 anni post-operatorio. Nei casi in cui vi è un elevato rischio di ricorrenza ed elevato stadio del tumore è indicato l'utilizzo dell'irradiazione in aggiunta alla somministrazione di mitotano (Fassnacht 2018). I pazienti trattati con mitotano, essendo questo farmaco una sostanza citotossica per la ghiandola surrenale che può causare insufficienza corticosurrenalica, devono essere monitorati e trattati nel caso in cui si dovesse presentare tale condizione.

Per quanto riguarda l'associazione con altri farmaci chemioterapici, non vi sono dati attuali che ne giustifichino l'uso. Tuttavia, è stato proposto l'utilizzo combinato di

cisplatino e mitotano nei pazienti ad alto rischio di ricorrenza precoce, come Ki67 > 20 e un'estesa invasione venosa (Lacroix 2018). È stato osservato che il mitotano incrementa l'attività citotossica di altri farmaci chemioterapici, probabilmente comportandosi da antagonista delle proteine MDR (multidrug resistance), altamente espressa nei carcinomi (Flynn 1992).

Sono in corso inoltre diversi studi su nuovi possibili target farmacologici. L'over-espressione in questo tumore di IGF2 e del suo recettore l'insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), che verrà trattata nella sezione successiva, è stato il razionale sia di uno studio clinico di fase II, che ha impiegato cixutumumab (inibitore di IGF1R) associato al mitotano (Lerario 2014) sia di uno studio clinico di fase III in cui si è testato l'effetto del Linsitinib (inibitore di IGF1R e IR) (Fassnacht 2015). Un altro studio di fase II ha invece associato cixutumumab a temsirolimus, inibitore di mTOR (mechanistic target of rapamycin), ottenendo la stabilità della malattia in circa il 50% dei pazienti (Naing 2013). La scoperta che l'80% dei carcinomi over-esprime EGFR (epidermal growth factor receptor) ha costituito il razionale dell'uso di inibitori di EGFR in una chemioterapia di salvataggio in pazienti con malattia in fase avanzata, tuttavia questa si è dimostrata fallimentare (Quinkler 2008). Ciò nonostante un recente studio ha dimostrato che l'inibizione associata di EGFR e IGF1R potrebbe rivelarsi una terapia efficace (Xu 2016).

Infine, per quei pazienti con ACC allo stadio avanzato si utilizza trattamento palliativo al fine di minimizzare gli effetti collaterali delle terapie antineoplastiche e di migliorare la qualità di vita mediante interventi quali il controllo del dolore, la prevenzione di fratture ossee indotte delle metastasi e l'adeguato controllo dei sintomi ormonali (Torti 2020).

1.3 Il sistema dell'IGF

1.3.1 Il sistema dell'IGF, recettori e ligandi

Il pathway dell'IGF è un complesso network importante per la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. È composto da tre recettori tirosin chinasi: l'IGF1R, l'insulin like growth factor 2 receptor (IGF2R) e il recettore insulinico (IR); da tre ligandi: l'insulina, l'IGF1 e l'IGF2; da sei IGFbps che regolano il pathway determinando la biodisponibilità dei ligandi (Iams 2015).

I due ligandi IGF1 ed IGF2 presentano una grande omologia con l'insulina, rispettivamente del 65 e 50% (Baxter 2000). Entrambi espletano azioni autocrine, paracrine ed endocrine. Il gene codificante per IGF2 è localizzato nel cromosoma 11, mentre quello di IGF1 nel cromosoma 12. IGF2 viene maggiormente espresso nel periodo fetale, al contrario di IGF1, ed i suoi livelli decrescono rapidamente subito dopo la nascita. Tale fattore sembra promuovere durante l'embriogenesi la crescita del surrene ACTH-indotta e la steroidogenesi (Penhoat 1994, Han 1992, Voutilainen 1997). Nell'adulto IGF2 stimola in maniera molto più marcata rispetto ad IGF1 la biosintesi degli steroidi sia basale che ACTH indotta, upregolando gli enzimi chiave della steroidogenesi e l'espressione del recettore dell'ACTH (Weber 1998, Fottner 2004).

IGF1R ed IR derivano da un comune gene ancestrale, altamente preservato nei vertebrati ed invertebrati (Hernandez-Sanchez 2008) e presentano sia un'elevata omologia di sequenza che vie di trasduzione del segnale strettamente correlati tra di loro e ben conservati nell'evoluzione (Cai 2017). In particolar modo vi è una omologia del 45-65% nel sito di binding del ligando e del 60-85% nei domini tirosin chinasi e di reclutamento del substrato (Whittaker 2001, Ullrich 1986). Da un punto di vista strutturale entrambi, al contrario di altri recettori tirosin chinasi, si presentano come dimeri preformati (Girrita 2014), con struttura tetramerica composta da due subunità α extracellulari e due β transmembrana legate insieme da ponti disolfuro (Tatulian 2015, Frasca 2008, Girrita 2014).

L'IGF1R viene sintetizzato dal gene in posizione 15q26.3 sotto forma di una singola catena α - β pro-recettore che è successivamente processata mediante proteolisi e glicosilazione. Le due subunità α , di 135 kDa, contengono 710 amminoacidi i quali sono strutturati in due domini omologhi L1 ed L2 separati da un dominio ricco in cisteine, responsabile del binding con il ligando. Le subunità β , di 95 kDa, contengono invece 627 amminoacidi suddivisi tra il dominio extracellulare, quello transmembrana e la porzione intracellulare. Quest'ultima è a sua volta suddivisa in tre domini: lo juxtamembrane, il tyrosin kinasico (TK) e la coda C-terminale. All'interno dello juxtamembrane è contenuto il motivo NPXY, importante per l'internalizzazione del recettore. A seguire, in posizione 976-981 vi è l'ATP binding motif (GXGXXG) che insieme alla lisina in posizione 1003 è importante per il binding Mg-ATP. Nel dominio TK invece sono presenti le tre tirosine 1131, 1135 e 1136 responsabili dell'auto-fosforilazione ed attivazione del recettore. Infine, gli ultimi 100 amminoacidi costituiscono la coda C-terminale contenente diversi elementi regolatori essenziali per la funzione di IGF1R (Girnita 2014).

IR è codificato invece dal gene INSR localizzato sul cromosoma 19p13.2. La regione codificante include 22 esoni che generano una proteina di 1370 amminoacidi con un peso molecolare di circa 154 kDa. Lo splicing alternativo dell'esone 11 genera due differenti isoforme: IRA ed IRB. I 12 amminoacidi dell'esone 11 sono inclusi nella forma IRB, considerata quella matura, ma non nella IRA, l'isoforma fetale. IRA è prevalentemente espresso nei tessuti embrionali e fetali, nel sistema nervoso centrale, nelle cellule ematopoietiche e in quelle tumorali; mentre IRB è principalmente espresso nella maggior parte dei tessuti target insulinici (Vella 2018). Da un punto di vista strutturale, come già descritto precedentemente, presenta una elevata omologia con il recettore IGF1R. Più nel dettaglio, il dominio ricco in cisteine, responsabile del legame con il ligando dell'IGF1R, è altamente conservato in IR. Lo stesso per ciò che concerne la porzione intracellulare nella quale si ha una omologia dell'84% per il TK, del 61% per lo juxtamembrane e del 44% per la coda C-terminale (Girnita 2014). Le isoforme del recettore dell'insulina sono espresse sia

come omodimeri IRA/IRA, IRB/IRB sia come eterodimeri IRA/IRB. Inoltre, le isoforme IR possono anche formare eterodimeri con IGF1R (IRA/IGF1R, IRB/IGF1R) (Vella 2018).

Entrambi i recettori legano tutti e tre i ligandi ma con un'affinità di legame differente. L'IGF1R presenta un'alta affinità per IGF1 (IC50 pari a 0.2-0.8 nM) e per IGF2 (IC50 pari a 0.5-4.4 nM) ma può inoltre legare l'insulina con un'affinità più bassa di 50/100 volte (IC50 superiore a 30 nM). IRA ha un'elevata affinità non solo per l'insulina (IC50: 0.2-0.9 nM) ma anche per IGF2 (IC50: 2.5 nM), mentre presenta bassa affinità di legame per IGF1 con IC50 superiore a 30 nM. Al contrario, IRB lega l'insulina con elevata affinità e IGF1 e 2 con bassa (Hakuno 2018, Vella 2018). L'affinità di legame invece per i recettori ibridi per i tre ligandi non è ancora stata ben stabilita a causa dei pochi studi in corso e dei differenti metodi utilizzati (Vella 2018).

IR possiede due siti di legame localizzati in due regioni differenti di ciascun monomero. Il modello ad oggi proposto prevede un primo legame dell'insulina al primo sito a bassa affinità (sito 1), presente su una delle due subunità α , seguito da un secondo legame tra l'insulina già legata ed il secondo sito di binding a più alta affinità (sito 2) presente sull'altra subunità α . È stato dimostrato che due molecole di insulina non possono legare contemporaneamente i due siti 1 e 2 (Ward 2008).

Sia IGF1R che IR, in seguito al legame con il ligando, subiscono un cambio conformazione che induce una trans-fosforilazione di tre tirosine presenti all'interno dell'activation loop (A-loop). Nell'IGF1R le tre tirosine si trovano in posizione 1131, 1135 e 1136 mentre nell'IR si trovano in posizione 1158, 1162 e 1163. In assenza dell'interazione con il ligando i recettori si trovano in una configurazione autoinibitoria in cui la parte finale dell'A-loop occlude l'ATP-binding site, prevenendo il legame dell'ATP e di conseguenza la fosforilazione delle tirosine. In particolar modo, è stato osservato che è la seconda tirosina dell'A-loop, la tyr 1135 per l'IGF1R e la 1162 per l'IR, che si trova legata in posizione cis nel sito attivo. In tale condizione l'attività catalitica dei recettori è molto bassa. Dopo il legame con il ligando le tre tirosine vengono trans-fosforilate e si ha inoltre anche

autofosforilazione di altri siti al di fuori del dominio chinasi che permettono la creazione di siti di docking per la trasduzione del segnale a valle (Girnita 2014, Hubbard 2013).

Come già detto precedentemente, le vie di trasduzione del segnale attivate da entrambi i recettori sono molto simili e correlate tra di loro, inoltre la presenza di recettori ibridi rende ancora più difficoltosa la distinzione. Tuttavia, è stato osservato che IR è prevalentemente coinvolto nella regolazione metabolica cellulare mentre IGF1R ha un effetto mitogeno. In accordo con il modello classico, i due pathway maggiormente attivati sono quello delle mitogen-activated protein chinasi (MAPK) e quello del fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) (**Fig.1**). Una volta avvenuta la trans-fosforilazione i recettori mediante il motivo NPXY, uno dei siti di docking più importanti presente nella regione juxtamembrane, riconoscono e legano il dominio PTB presente nell'insulin receptor substrate (IRS) e nell'src homology 2 (SH2)-containing-protein (Shc).

IRS è in grado di interagire con la subunità regolatoria della classe 1 delle PI3K inducendo attivazione della subunità catalitica p110. Una delle principali funzioni di PI3K è quella di sintetizzare il secondo messaggero fosfatidilinositolo trifosfato (PIP3), presente all'interno della membrana plasmatica, il quale funge da ligando per reclutare le proteine contenenti il dominio PH. L'Akt/PKB serina treonina chinasi interagisce con questi fosfolipidi e viene attivata mediante la fosforilazione della Thr308 e Ser473 dal 3-fosfoinositide dipendente proteina chinasi (PDKs) a livello dell'interfaccia citoplasmatica della membrana plasmatica. L'Akt così attiva è in grado di fosforilare ed inibire numerose proteine pro-apoptotiche come BCL2 associated agonist of cell death (Bad) e la caspasi 9. Inoltre, vi sono altri effettori come il fattore di trascrizione cAMP response element-binding protein (CREB), la proteina pro apoptotica glicogeno sintetasi chinasi 3β (GSK- 3β) ed altri fattori di trascrizione facenti parte della famiglia dei forkhead transcription factors. L'attivazione di Akt può inoltre indurre la stimolazione del mammalian target of rapamycin (mTOR) il quale a sua volta: 1) Stimola la trascrizione di mRNA coinvolti nel controllo della transizione del ciclo cellulare dalla fase G0 alla G1, 2) regola fattori di trascrizione che a sua volta regolano l'espressione di proteine regolatrici del ciclo cellulare come la ciclina

D1, 3) attiva metalloproteinasi. L'attivazione del pathway PI3K ha quindi un effetto sulla sopravvivenza cellulare, sulla migrazione ed invasione ed espleta anche effetti metabolici (Girnita 2014).

Il secondo principale signalling è quello delle MAPK, il quale è mediato sia dalle IRSs che da Shc. Il secondo mediatore è il Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), una proteina adattatrice che possiede un dominio SH2 e due domini SH3. Tramite il suo dominio SH2 può interagire ed essere attivata da IRS o Shc mentre mediante i domini SH3 interagisce con una proteina guanine nucleotide exchange, son of sevenless (Sos), attivandola. Sos attiva a sua volta Ras, una proteina che lega il GTP, stimolando il rilascio di GDP ed il successivo legame di GTP. Ras legata a GTP è in grado di legare ed attivare Raf, una serina/treonina protein chinasi a livello dell'interfaccia citoplasmatica della membrana cellulare. Mediante fosforilazione Raf attiva MEK che a sua volta attiva l'extracellular signal-regulated chinasi 1/2 (ERK 1/2). Un altro substrato delle MAPK è la sottofamiglia delle proteine chinasi ribosomal s6 chinasi, p90Rsk. Sia le MAPK che p90Rsk traslocano al nucleo dopo fosforilazione dove fosforilano e attivano fattori di trascrizione come il fattore responsivo al siero (SRF), il fattore di trascrizione T cell specifico e CREB. Inoltre, ERK 1/2 dopo aver traslocato al nucleo media la trascrizione del gene della ciclina D1, stimolando la fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb) ed il rilascio del fattore di trascrizione E2F-1. Tale fattore di trascrizione può attivare anche p14ARF il quale inibisce l'associazione p53-Mdm2 lasciando p53 nella sua forma inattiva. Anche nel citoplasma le MAPK espletano delle funzioni, regolando la dinamicità dei microtuboli mediante fosforilazione delle proteine associate ai microtuboli stessi. L'attivazione del pathway delle MAPK ha quindi un effetto sulla proliferazione e differenziamento cellulare che sulla sintesi proteica (Girnita 2014).

L'attivazione di entrambe le vie di signalling con IR determina inoltre un aumento del trasporto del glucosio. Dati scientifici evidenziano come, in seguito a stimolazione con l'insulina, IRB medi principalmente effetti metabolici mentre IRA, in seguito ad

attivazione con insulina o IGF2, sia in grado di mediare maggiormente gli effetti mitogeni (Vella 2018).

Uno studio pubblicato su Nature communications nel 2016 ha messo in luce alcune differenze tra la risposta intracellulare dei due recettori. In particolar modo, sembrerebbe esserci una differenza di un singolo amminoacido nella regione circostante l'NPEY motif, presente nel dominio juxtamembrane, che influenzerebbe la capacità di tale regione di legare in maniera preferenziale Shc o IRS. Nel recettore dell'insulina è presente l'amminoacido leucina mentre nell'IGF1R la fenilalanina. È stato dimostrato che tale cambio in questo amminoacido determina una preferenza per IGF1R di legare maggiormente Shc e Gab1 mentre per IR di interagire con IRS1. Tuttavia, non sono state viste significative alterazioni nella fosforilazione di AKT (Cai 2017).

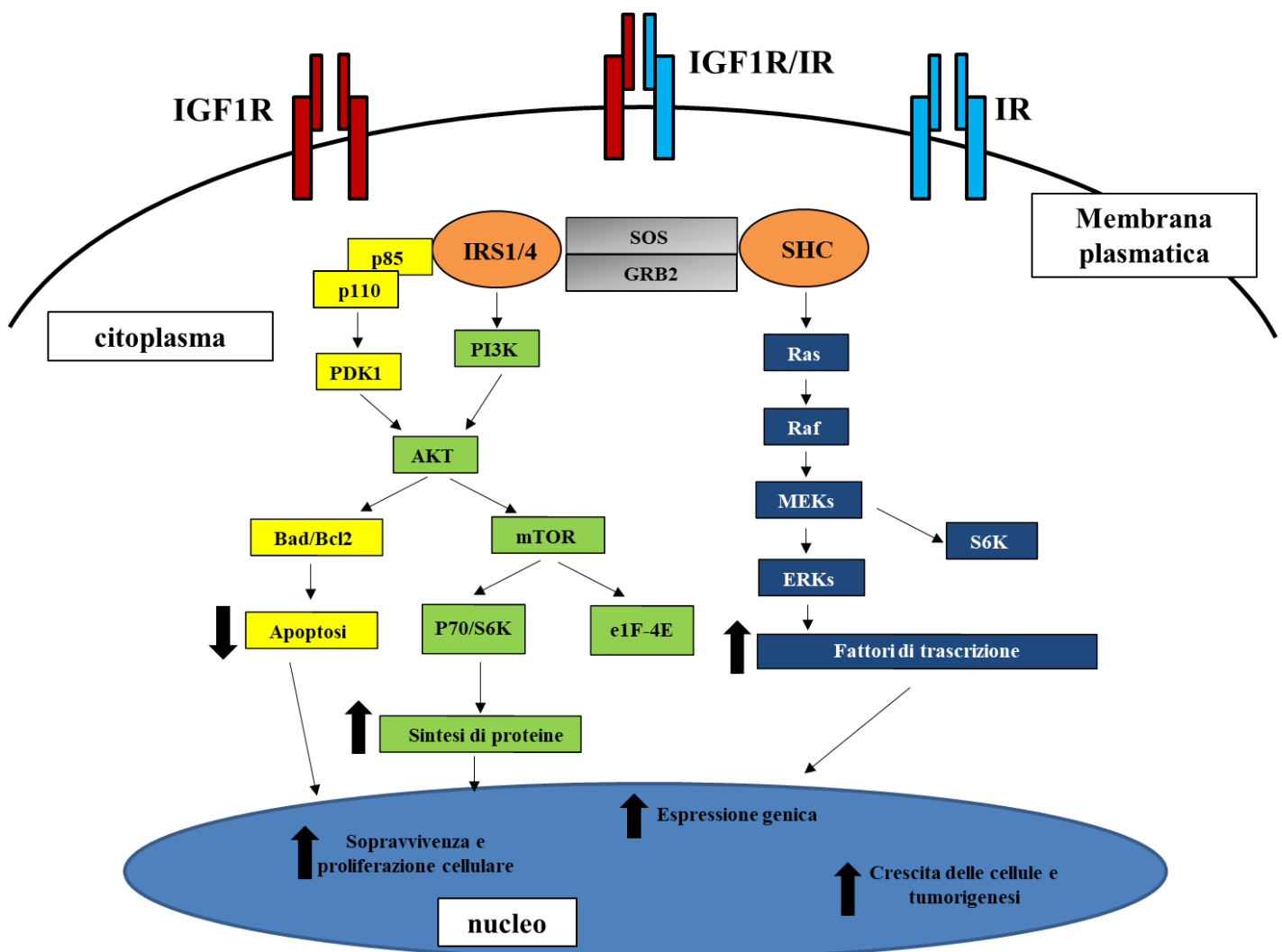


Fig1. Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione intracellulari del pathway dell'IGF. Sulla membrana plasmatica sono presenti i recettori IGF1R, IR e il recettore ibrido IGF1R/IR. Tutti e tre sono in grado di attivare le due principali vie di segnale rappresentate nella regione citoplasmatica della cellula. Da una parte SHC che attiva la cascata delle MAPKs che porta: 1) attivazione di ERK ed incremento dei fattori di trascrizione, con effetto sull'espressione genica di molecole coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare 2) attivazione della famiglia delle proteine chinasi ribosomiali S6 che traslocando al nucleo attivando altri fattori di trascrizione. Dall'altra parte si ha la via di PI3K/AKT. L'attivazione di IRS1/4 determina fosforilazione di AKT, sia mediante PI3K che PDK1, il quale agisce inibendo le proteine pro apoptotiche Bad e Bcl2 e contemporaneamente attiva mTOR con numerosi effetti a valle tra cui il controllo della sintesi di proteine coinvolte nel ciclo cellulare.

1.3.2 L'alterazione del sistema dell'IGF negli ACCs

Una delle alterazioni maggiormente frequenti nei carcinomi del surrene, presente nell'80-90% dei casi, è l'overespressione di IGF2. È stata osservata una overespressione circa 100 volte maggiore dei livelli di RNA messaggero (mRNA) negli ACCs rispetto agli ACAs (Schneid 1992, Ilvesmaki 1993, Gicquel 1994, Gicquel 1995, de Frapoint 2002, Giordano 2003, De Martino 2019). Inoltre, è stato visto anche un incremento dell'espressione della proteina (Gicquel 1994, Gicquel 1995, Boulle 1998, Erickson 2001). Tali analisi è stata confermata anche nei pazienti con ACC pediatrici (Almeida 2008, Peixoto Lira 2016).

L'overespressione di IGF2 nell'ACC è in parte dovuta ad un'alterazione dell'imprinting genomico della regione in cui mappa il gene: 11p15. In tale regione cromosomica mappano tre diversi geni sottoposti ad imprinting: IGF2, sottoposto ad imprinting materno con espressione pertanto del gene esclusivamente dall'allele paterno, p57KIP2 ed H19 sottoposti invece ad imprinting paterno. Negli ACCs sono state evidenziate anomalie nell'imprinting come LOH con duplicazione paterna dell'allele e in maniera meno frequente LOI, attivazione eccessiva della trascrizione o perdita della soppressione della trascrizione (Fottner 2004). Questo si è visto indurre una overespressione dell'IGF2 e inoltre la perdita dell'espressione di p57KIP2 e H19 (Liu 1995, Toretzky 1996, Gicquel

1994). Data la forte correlazione negativa tra i livelli di mRNA di p57KIP2 e quelli di IGF2 (Liu 1995) e dati gli esperimenti condotti in vitro che indicano che l'mRNA H19 determina una riduzione dei livelli fisiologici dell'mRNA di IGF2 (Wilkin 2000), si pensa che questi geni possano essere coinvolti nell'espressione del gene IGF2 o nella stabilità dell'RNA messaggero. L'alterazione della regolazione dell'imprinting della regione appena descritta è anche una delle cause dello sviluppo della sindrome di Beckwith-Wiedemann. L'isodisomia paterna (perdita dell'allele materno e duplicazione di quello paterno) o la trasmissione di microdelezioni nell'allele materno del centro dell'imprinting, causano una overespressione di IGF2 che contribuisce alla tumorigenesi con aumentato rischio di sviluppare tumori quali il carcinoma di Wilms, l'epatoblastoma e l'ACC (Angelousi 2018, Jouinot 2019).

Altri possibili meccanismi coinvolti nella overespressione potrebbero essere la demetilazione del gene, come già visto in altri tumori (Schneid 1992, Wilkin 2000), o ancora un possibile coinvolgimento del nephroblastoma overexpressed (novH), facente parte della superfamiglia delle insulin like growth factor binding proteins (IGFBP), il quale sembra avere una correlazione negativa con i livelli di mRNA di IGF2 nel tumore (Martinerie 2001).

Inoltre, sono state condotte anche delle indagini sui due recettori principali di tale pathway: IGF1R e IR.

Dalle analisi condotte si è evidenziato un incremento dell'espressione dell'RNA messaggero codificante per l'IGF1R nei pazienti pediatrici, con associazione tra i livelli di espressione e la predisposizione alla formazione di metastasi (Almeida 2008, Peixoto Lira 2016). Tuttavia, pare non ci sia correlazione tra i risultati ottenuti con la RT-qPCR e le analisi sull'espressione della proteina mediante immunostochimica (Peixoto Lira 2016). Più contraddittori sono invece i dati sull'espressione di IGF1R negli ACCs negli adulti. Alcuni autori non evidenziano alcuna variazione nei livelli di espressione di IGF1R rispetto ai pazienti affetti da adenoma surrenalico (Kamio 1991, Peixoto Lira 2016, De Martino 2019), al contrario Barlaskar nel 2009 ha dimostrato non solo una maggiore

espressione di IGF1R negli ACCs ma anche una sua maggiore attivazione, con incremento del recettore fosforilato e della fosforilazione di AKT (Barlaskar 2009).

Infine, per ciò che concerne il recettore dell'insulina, nel 1991 Kamio ed il suo gruppo di ricerca, grazie alle analisi in immunohistochimica, avevano dimostrato una eguale espressione di IR nei carcinomi del surrene e negli adenomi (Kamio 1991). Tuttavia, un recente lavoro pubblicato da De Martino et al ha evidenziato una maggiore espressione dell'mRNA di IRA nel 58.3% dei casi mentre un incremento di IRB solo nel 8.3% degli ACCs con una ratio IRA/IRB superiore ad 1 (De Martino 2019).

1.3.3 Il sistema dell'IGF come bersaglio terapeutico negli ACCs

Data la centralità del pathway dell'IGF nei carcinomi surrenalici, numerosi studi hanno cercato di valutare gli effetti di vari inibitori di tale sistema, già utilizzati come terapia in altri tumori, anche nei carcinomi del surrene.

Almeida nel 2008 ha dimostrato l'efficacia dell'inibitore tirosin chinasi selettivo di IGF1R, NVP-AEW541, sia in una linea cellulare umana derivante da un carcinoma del surrene di una donna di 48 anni (H295), sia in una linea cellulare derivante da un ACC pediatrico (Almeida 2008). Gli effetti antiproliferativi dose e modo dipendente e proapoptotici già a basse dosi furono poi confermati anche da uno studio condotto l'anno successivo da Barlaskar (Barlaskar 2009). Tale gruppo di ricerca aveva inoltre confrontato gli effetti di tale inibitore delle tirosin chinasi con quelli di un anticorpo monoclonale, l'IMC-A12. Gli esperimenti sono stati da loro condotti sia in vitro, usando le cellule H295, che in vivo iniettando nel modello di topo athymic nude tali cellule e valutando l'evoluzione del tumore dopo trattamento. Gli effetti di tali inibitori erano stati promettenti sia a livello cellulare, con riduzione della proliferazione e signalling sia in vivo, con riduzione della dimensione del tumore. Inoltre, essi avevano evidenziato un effetto sinergico dell'IMC-A12 con il mitotano (Barlaskar 2009). I promettenti risultati di questi due studi preclinici, sono stati le basi per lo studio clinico di fase III sugli effetti del Linsitinib, inibitore delle tirosin chinasi agente sia su IGF1R che IR (Fassnacht 2015). Tale

farmaco era già stato precedentemente testato in uno studio clinico di fase I (Jones 2015), nel quale avevano analizzato anche gli effetti su 15 pazienti con ACC e concluso che la dose a 150mg due volte al giorno riduceva di molto gli effetti collaterali. Tuttavia, nello studio clinico di fase III, dei 90 pazienti reclutati, solo 4 e quindi il 3% del totale, aveva avuto un beneficio terapeutico significativo mentre nella restante percentuale dei casi sia la median overall survival che la progression free survival non risultava migliorata nei pazienti trattati rispetto al gruppo controllo (Fassnacht 2015). Tale fallimento ha indotto il mondo scientifico ad interrogarsi nuovamente sull'importanza dell'IGF2 nei carcinomi del surrene, ad approfondire ulteriormente il pathway dell'IGF2 ed i meccanismi ad esso correlati e a ricercare possibili markers di risposta alla terapia che potessero spiegare l'efficacia nei 4 pazienti sottoposti allo studio. Nel 2014 Guillaud-Bataille ed il suo gruppo hanno dimostrato un ruolo attivo di IGF2 nella crescita tumorale non evidenziando tuttavia delle differenze cliniche e trascrittomiche tra un gruppo di pazienti affetti da carcinoma del surrene con alta espressione di IGF2 e quello con bassa espressione. Tale dato ha confermato che altri fattori ed alterazioni sono coinvolti nella progressione dell'ACC; aprendo nuove possibilità nell'utilizzo di farmaci agenti su altre vie da combinare agli inibitori dell'IGF1R (Guillaud-Bataille 2014). Per esempio, Xu et al nel 2016 hanno evidenziato una migliore efficacia anti-tumorale dell'inibitore IGF1R selettivo NVP-AEW541 se combinato con un inibitore del recettore EGFR, Erlotinib (Xu 2016). Inoltre, recentemente lo studio pubblicato da De Martino e coautori ha dimostrato un miglior effetto nella riduzione della proliferazione abbinando il Linsitinib con gli inibitori selettivi di mTOR, sirolimus ed everolimus (De Martino 2019).

1.4 La filamina A (FLNA)

1.4.1 Filamina A: struttura e funzione

La FLNA, anche conosciuta come actin-binding protein 280 (ABP 280), è stata la prima proteina non muscolare di che lega tra di loro i filamenti di actina o di crosslinking tra filamenti di actina ad essere stata identificata nel 1975 (Stossel 1975). Successivamente sono stati scoperti anche altri due geni paraloghi, la filamina B (FLNB) e la filamina C (FLNC). Tutte e tre presentano una elevata omologia nella loro sequenza codificante (van der Flier 2001).

La FLNA mappa sul cromosoma X in posizione Xq28 ed è l'isoforma più espressa nell'uomo adulto. È formata da due monomeri di 280 kDa ciascuno, che si auto-assemblano determinando la caratteristica forma a V della proteina. Ogni monomero presenta una regione amino (N)-terminale con un dominio di legame all'actina (actin-binding domain, ABD) contenente due domini omologhi alla calpaina: CH1, all'interno del quale vi sono due siti di legame con l'actina e CH2 che invece ne ha solo uno. A seguire vi sono 24 immunoglobulin-like repeats, di 96 amminoacidi ciascuno, che si strutturano in una conformazione a foglietti β antiparalleli. Sono inoltre presenti due regioni "hinge", sensibili all'azione della calpaina. Il primo "hinge" separa il monomero in due regioni: rod1 (dal repeat 1 al 15, di 58 nm) e rod 2 (dal repeat 16 al 23, di 19 nm). Il secondo "hinge" invece separa il repeat 23 dal 24. Le regioni "hinge" conferiscono inoltre la flessibilità che serve a favorire la dimerizzazione tra i due monomeri la quale avviene grazie all'interazione tra i corrispettivi repeat 24 (**Fig.2**) (Nakamura 2011, Savoy 2013). Per ciò che concerne le funzioni degli altri repeat è noto che rod1 è in grado di legare solo un numero limitato di molecole partners tuttavia contiene un secondo actin binding domain (tra il repeat 9 ed il 14) con una più bassa affinità di legame per l'actina. Rod2 invece è deputato all'interazione con più di 90 molecole (Nakamura 2011). Esso presenta una struttura più compatta e globulare di rod1 grazie all'interazione tra i repeats 16-17, 18-19 e 20-21. Tali interazioni sono importanti per regolare l'accesso ai siti di binding con le molecole

partner. Per esempio, lo strand A del repeat 20 è associato agli strands C e D del repeat 21 e va ad ostruire, con un meccanismo autoinibitorio, il sito di binding con l'integrina. Solo in risposta a stimoli meccanici, si assiste ad un cambio conformazionale che permette l'esposizione del sito di binding (Nakamura 2011, Rosa 2019).

Da un punto di vista funzionale la FLNA è importante per l'organogenesi durante lo sviluppo embrionale, infatti la perdita della sua espressione è letale per l'embrione (Feng 2006) e mutazioni in tale gene sono correlate a patologie dello sviluppo. Tali patologie, che prendono il nome di filaminopatie, vengono classificate in base alla natura della mutazione. Le mutazioni gain-of function sono la causa di displasie scheletriche e malformazioni del cervello e del tratto urogenitale. Tra queste troviamo le sindromi oto-palato-digitali (OPD) caratterizzate prevalentemente da displasia dello scheletro, dismorfismo facciale, palatoschisi e anomalie delle estremità e la sindrome di Melnick-Needles (Robertson 2003, Moutton 2016). Al contrario le mutazioni loss-of-function, che determinano una ridotta o assente espressione di FLNA, sono embriologicamente letali nel maschio ma si manifestano nella femmina con distrofia valvolare cardiaca X-linked (XCVD) e patologie gastrointestinali come la pseudo-ostruzione intestinale cronica e la sindrome congenita del piccolo intestino (Kyndt 2007, de Wit 2011). Inoltre tali mutazioni loss of function sono la causa dell'eterotopia nodulare periventricolare (PVNH), una patologia caratterizzata da una malformazione del cervello nella quale i neuroni non riescono a migrare nella corteccia cerebrale e rimangono come noduli che rivestono la superficie ventricolare (Savoy 2013). La primaria funzione attribuita a tale proteina è quella di legare tra di loro i filamenti di actina in rami perpendicolari, regolando in questo modo la struttura del citoscheletro e la forma fisiologica cellulare. Inoltre, essa è in grado di orchestrare la rimodulazione della struttura del citoscheletro di actina in risposta a stimoli extracellulari chemotattici, prendendo così parte a meccanismi di adesione e migrazione cellulare (Savoy 2013). Un'altra funzione è quella di ancorare fisicamente le proteine transmembrana, come per esempio canali ionici, integrine, recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) e recettori tirosin chinasi (RTKs), al citoscheletro actinico, regolando

la loro localizzazione e stabilità alla membrana plasmatica e modulando inoltre la loro internalizzazione ed il trafficking intracellulare (Cho 2007, Onoprishvili 2003, Zhang 2005, Beekman 2008, Minsaas 2010, Peverelli 2012, Treppiedi 2018, Treppiedi 2020). Infine, FLNA agisce come scaffold per numerose molecole segnale (Nakamura 2011).

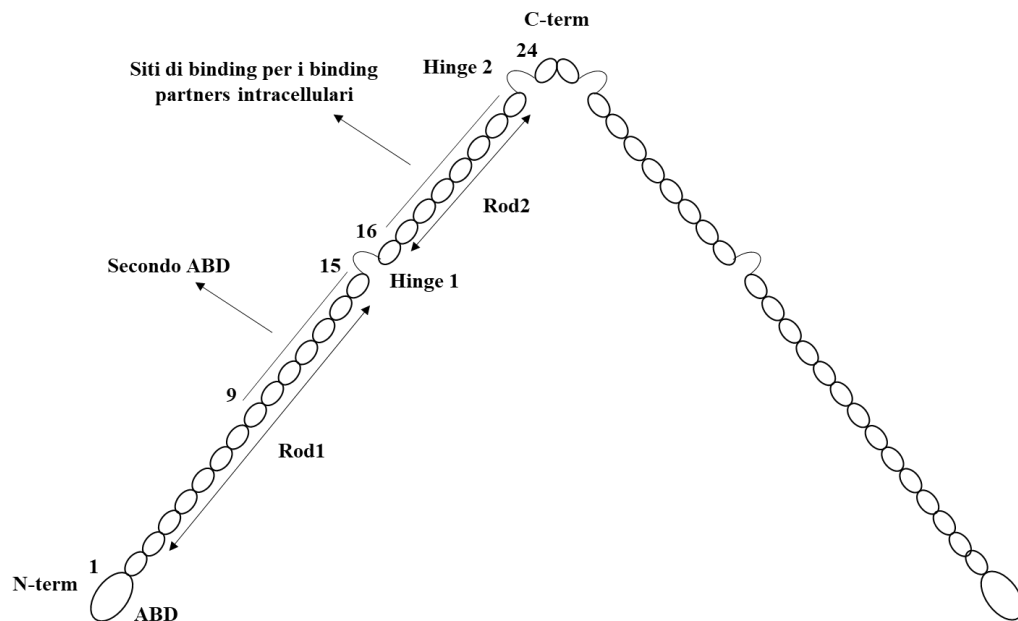


Fig 2. Immagine illustrativa della struttura della FLNA: Ogni monomero possiede all’N-terminale il dominio di interazione con l’actina (ABD), seguito da 24 repeats Ig-like. L’hinge 1 separa la FLNA in due domini: rod1 e rod2. Rod1 contiene il sito secondario di legame con l’actina mentre rod2 è deputato all’interazione con diverse molecole partners. L’hinge 2 separa rod2 dal repeat 24 che è situato all’estremità C terminale e che rappresenta il dominio di dimerizzazione.

1.4.2 Il ruolo della FLNA nei tumori

Negli ultimi anni è stato più volte dimostrato il ruolo della FLNA in diversi tumori; originariamente come proteina pro-tumorale, coinvolta nell’invasione e nella formazione di metastasi, e successivamente anche come proteina in grado di prevenire la progressione tumorale. Tali osservazioni hanno evidenziato quindi un duplice ruolo della FLNA nel tumore (Shao 2016).

Uno dei fattori in grado di influenzare il suo ruolo pro o anti tumorale è la sua localizzazione cellulare. Uno studio condotto sul cancro alla prostata ha permesso infatti di evidenziare come la forma della FLNA full length sopra descritta, localizzandosi prevalentemente nel citoplasma, sia in grado di svolgere un'azione pro-tumorale mediante interazione con le molecole segnale. Al contrario, il frammento della FLNA di 90 kDa che si genera dopo taglio proteolitico per opera della calpaina, è in grado di traslocare al nucleo dove, mediante interazione con fattori trascrizionali, è in grado di espletare la sua azione come soppressore della crescita tumorale e inibitore di metastasi. Nel carcinoma alla prostata la FLNA risulta overespressa con localizzazione citoplasmatica nei tumori allo stadio più avanzato e nelle metastasi e invece localizzazione nucleare nel tessuto sano e nel tumore ai primi stadi (Bedolla 2009). Studi pre-clinici dimostrano che anche nel carcinoma alla mammella la sua overespressione e localizzazione citoplasmatica correla con la presenza di metastasi e stadio avanzato mentre la sua downregolazione si associa ad una migliore sopravvivenza e ridotta possibilità di formazione di metastasi a distanza (Tian 2013). Anche in altri carcinomi è stato dimostrato il suo effetto pro tumorale con overespressione nel tumore al pancreas e al fegato. Tuttavia, vi sono anche tumori in cui FLNA risulta downregolata. Per esempio nel carcinoma gastrico e colonrettale la sua ridotta espressione correla con l'aggressività del tumore e nel carcinoma renale invece con la presenza di metastasi ai linfonodi ed una prognosi infausta (Shao 2016).

Infine, è stato dimostrato anche un ruolo di FLNA nei tumori ipofisari prolattina e GH secernenti, dove si è visto il suo coinvolgimento nei meccanismi di resistenza al trattamento farmacologico rispettivamente con agonisti dopaminergici ed analoghi della somatostatina. Nei prolattinomi la presenza di FLNA è essenziale per l'espressione del recettore dopaminergico D2 (DRD2) e per la trasduzione intracellulare del segnale inibitorio della dopamina (Peverelli 2012). Nei tumori GH secernenti FLNA possiede sia un ruolo strutturale, aumentando la stabilità di espressione del recettore della somatostatina di tipo 2 (SST2) che un ruolo funzionale, agendo da molecola scaffold per

l'associazione di proteine effettrici della trasduzione del segnale di SST2, in particolare legate alla sua azione antiproliferativa e apoptotica (Peverelli 2014).

1.4.3 FLNA, IGF1R e IR

Come già descritto precedentemente, una delle funzioni della FLNA è quella di ancorare numerosi recettori transmembrana al citoscheletro e di regolarne l'internalizzazione, il trafficking ed il signalling intracellulare. Recentemente è stato visto che FLNA è coinvolta nella regolazione di due recettori tirosin chinasi: IGF1R ed IR.

Nelle cellule di melanoma M2, che non esprimono FLNA, e nel loro subclone A7 dove l'espressione di FLNA è stata stabilmente reintrodotta, è stato dimostrato che FLNA interagisce in maniera diretta con IR influenzandone il signalling intracellulare. È interessante notare come la presenza o assenza di FLNA non vada ad alterare l'attivazione del recettore né la via di IRS1 e AKT ma impatti in via preferenziale sull'attivazione del pathway delle MAPK. He ed il suo gruppo di ricerca hanno infatti dimostrato che, in seguito a stimolo del recettore, non si registrano differenze tra le due linee cellulari nell'aumento della fosforilazione di IRS1, nel reclutamento di p85 e nella fosforilazione di AKT sulla serina 473. Tuttavia, la presenza di FLNA ostacola l'attivazione della via delle MAPK. Infatti, solamente nelle cellule M2, prive di FLNA, si assiste ad un aumento della fosforilazione di Shc ed al reclutamento alla membrana plasmatica di SOS1 con incremento della fosforilazione di ERK (He 2003). Inoltre, nel 2016 Houlihan, in uno studio condotto sui precursori delle cellule neuronali, ha dimostrato che la perdita di espressione di filamina determina attivazione costitutiva del recettore IGF1R con incremento dell'attività di ERK (Houlihan 2016). Flna è importante per lo sviluppo corticale cerebrale ed in particolar modo per il mantenimento dell'omeostasi tissutale grazie alla sua capacità di modulare le vie di segnale intracellulari. Gli esperimenti da loro condotti testimoniano come la Flna sia in grado di regolare il segnale bidirezionale tra le cellule progenitrici neuronali (NPCs) e le cellule vascolari. Più nel dettaglio, mediante la collaborazione con le β -arrestine Flna attenua gli eccessi di segnali di crescita mantenendo l'omeostasi in

entrambe le due tipologie di cellule. Al contrario, la sua perdita determina un aumento del signalling di Vegfa e Igf2 che porta ad una intensificazione della transizione epitelio-mesenchimale e dell'angiogenesi (Houlihan 2016).

Tuttavia, ad oggi ancora non è noto se FLNA sia in grado di interagire e regolare l'attività dei due recettori nel carcinoma del surrene.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di tale studio è quello di testare in entrambe le linee umane derivanti dal carcinoma del surrene, H295R e SW13, e in colture primarie derivate da ACC e ACA umani chirurgicamente rimossi:

1. Il coinvolgimento di FLNA nel regolare l'espressione ed il signalling di IGF1R e IR
2. Il ruolo di FLNA nel modulare la risposta a:
 - Linsitinib: inibitore sia di IGF1R che di IR
 - NVP-ADW742: inibitore specifico di IGF1R

Inoltre, ulteriore scopo è la valutazione dell'espressione di FLNA negli ACCs e la sua correlazione con l'espressione di IGF1R, IR ed il signalling intracellulare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari e tessuti surrenalici

Le linee cellulari umane di carcinoma surrenalico H295R (ATCC CRL-2128) ed SW13 (ATCC CCL-105) sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC). La linea cellulare SW13 è stata sottoposta a test per l'autenticazione mediante il sistema PowerPlex Fusion (Promega, BMR Genomic Cell Profile service, Italy) che si basa sulla corrispondenza di loci short tandem repeat (STR) polimorfici. Più nel dettaglio, sono stati amplificati 23 loci STR (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D22S1045) ed il locus dell'amelogenina per la determinazione del genere. I risultati sono stati comparati con i database delle linee cellulari ATCC, DSMZ, JCRB e RIKEN ed è stato trovato il miglior match. Entrambe sono inoltre state utilizzate ad un passaggio non superiore al ventesimo. La linea cellulare H295R è stata cresciuta in mezzo di coltura composto da DMEM:F12 1:1 (Gibco, Invitrogen, Life Technologies Inc., Carlsband, CA, USA) supplementato con 1% ITS + Premix (Corning, NY, USA), 2.5% Nu-Serum I (Corning, NY, USA), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (Lonza group Ltd, Basel, Swi). Per la linea cellulare SW13 è stato invece utilizzato il DMEM:F12 1:1 supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen, Life Technologies Inc., Carlsband, CA, USA), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. La linea cellulare umana di melanoma M2 ed il suo subclone stabile A7 sono state gentilmente donate dal Prof. Nakamura (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA). Entrambe sono state coltivate in MEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) supplementato con 8% Newborn Calf serum (Gibco, Invitrogen, Life Technologies Inc., Carlsband, CA, USA), 2% FBS, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. Inoltre, nel mezzo di coltura delle A7 sono stati aggiunti 200 µg/ml di disolfato di sale G418 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) per mantenere l'espressione della FLNA.

I tessuti surrenalici, ottenuti mediante un intervento di surrenectomia monolaterale, sono stati in parte dissociati per l'allestimento delle culture primarie (ACC: n=1; ACAs: n=4) ed in parte (ACCs: n=10; ACAs: n=10) congelati e sottoposti ad estrazione delle proteine ed analisi mediante western blot. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale ed ogni paziente ha fornito il proprio consenso informato all'uso del suo campione tumorale e all'accesso alle informazioni cliniche.

Per ciò che concerne l'allestimento delle colture primarie, il pezzo tumorale è stato innanzitutto lavato mediante soluzione fisiologica al fine di eliminare il più possibile il contenuto di sangue e successivamente sottoposto sia a digestione meccanica che enzimatica. Per ciò che concerne la digestione meccanica si è proceduto mediante l'utilizzo di una lama da bisturi allo sminuzzamento del campione. A questa è seguita la digestione enzimatica con sospensione in una soluzione di 2 mg/ml di collagenasi (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 37°C per 2h. Al termine del tempo indicato, con l'aiuto di una pipetta sterile, si è provveduto a ulteriore disgregazione del campione e, al fine di eliminare il materiale non digerito, lo si è trasferito in un filtro con pori da 100 µm di diametro (nylon cell strainer, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK). La sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata per 10 min a 1000 rpm. Essendo il surrene un organo ad alto contenuto di lipidi, in seguito a tale step, si è provveduto a rimuovere l'anello lipidico formatosi sulla superficie, preservando invece il pellet cellulare formatosi sul fondo della provetta. Quest'ultimo è stato risospeso in DMEM supplementato con 20% FBS, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina per permettere alle cellule di essere infine piastrate e mantenute a 37°C e 5% di CO₂.

3.2 Saggio di coimmunoprecipitazione

Per il saggio di coimmunoprecipitazione 100 µg di proteine estratte da cellule stimulate o no con IGF2 100 ng/ml (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) sono state incubate con 4 µg di anticorpo anti-FLNA (Abnova Corporation, Taipei City, Taiwan) e lasciate over-night su un dispositivo rotante a 4°C. Come controllo negativo, per misurare il

binding non specifico, sono state utilizzate le IgG1 isotype control di topo (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Il giorno seguente, sono stati aggiunti 20 µg di proteine A/G Plus-Agarosio per 3h a 4°C (Santa Cruz Pharmaceutical Inc., Santa Cruz, CA) e al termine, al fine di eliminare tutte le proteine non legate in maniera specifica all'anticorpo, sono stati effettuati 5 lavaggi con tampone fosfato salino (PBS) (Euroclone, Pero, IT). Le proteine eluite sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e trasferite su carta di nitrocellulosa. Quest'ultima è stata incubata con l'anticorpo anti-FLNA (diluzione 1:1000), anti-IGF1R (Cell Signalling Technology, Danvers, MA; diluzione 1:1000) e anti-IR (Cell Signalling Technology, Danvers, MA; diluzione 1:1000).

3.3 *In situ* proximity ligation assay (PLA)

Gli esperimenti di PLA sono stati condotti usando i reagenti e le istruzioni fornite dal kit commerciale Duolink In Situ Detection Reagents Red della Sigma-Aldrich (St Louis, MI, USA). La PLA è una tecnica altamente sensibile che permette di identificare la presenza di due proteine strettamente vicine l'una all'altra. È necessario utilizzare due anticorpi primari provenienti da specie diverse e due anticorpi secondari legati a loro volta a due oligonucleotidi (PLA probes). Solo se le due proteine si trovano ad una distanza inferiore a 40 nm allora gli oligonucleotidi coniugati agli anticorpi secondari possono legarsi fra loro e fungere da template per la DNA polimerasi che effettuerà una reazione di rolling circle amplification (RCA).

Nell'esperimento da noi condotto le cellule sono state seminate alla densità di 1.5×10^5 cellule/well in una multi-well da 24 pozzetti, su un vetrino di 13 mm pretrattato con L-polilisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) al fine di migliorarne l'adesione cellulare. Il giorno dopo la semina, sono state fissate mediante paraformaldeide al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a temperatura ambiente per 10 min e successivamente lavate 3 volte con PBS. Al fine di bloccare i siti aspecifici sono state sottoposte a trattamento per 1h a temperatura ambiente con opportuno tampone di bloccaggio composto da: 5% FBS e 0.3% di Triton™X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) diluiti in PBS e poi incubate over-

night a 4°C con gli anticorpi anti-FLNA (diluizione 1:200) ed anti-IGF1R (diluizione 1:100) contemporaneamente. Il giorno seguente, sono state aggiunte le PLA probes anti-mouse ed anti-rabbit e si è proseguito con lo step di ligazione ed amplificazione. Il tempo di incubazione con le probes e quello necessario per la RCA sono stati ottimizzati per l'identificazione dell'interazione delle due proteine di nostro interesse. Al termine, i vetrini sono stati montati con Duolink Mounting Medium con aggiunta di 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) su un vetrino portaoggetti ed analizzati al microscopio a fluorescenza (Axio Vert.A1, Zeiss). Le immagini sono state analizzate con il software NIH ImageJ ed è stato applicato il processo di deconvoluzione. Inoltre, in ciascun esperimento sono stati preparati dei controlli tecnici negativi, due con omissione di uno dei due anticorpi primari rispettivamente ed un terzo con omissione di entrambi.

3.4 Silenziamento di FLNA

Il silenziamento di FLNA è stato effettuato con la tecnica dell'RNA interfering. Lo small interfering RNAs (siRNAs, SMARTpool) specifico per il gene umano della FLNA, contenente una miscela di 4 siRNA, è stato acquistato dalla Dharmacon (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). Tale composizione permette di aumentare sia la potenza che la specificità del silenziamento. In accordo con le istruzioni del produttore, le H295R e le cellule derivanti dalla coltura primaria di ACC (n=1) e di ACAs (n=4) sono state trasfettate con il siRNA utilizzando il reagente di trasfezione Viromer Blue for miRNA/siRNA transfection (Lipocalyx GmbH, Halle, D) mentre le SW13 con l'agente di trasfezione 2 Dharmafect (Dharmacon, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL). Sono stati allestiti esperimenti preliminari al fine di determinare la concentrazione ottimale di siRNA e la cinetica di silenziamento di FLNA. È stata scelta una concentrazione di siRNA pari a 25 nM per le H295R e le colture primarie e 40 nM per le SW13, ed una tempistica di silenziamento pari a 72h.

In breve, le cellule H295R, le SW13 e le cellule derivanti dalle colture primarie di ACC ed ACA sono state seminate in una multi-well da 6 pozzetti alla confluenza di 3.0×10^5 , $1.0 \times$

10^5 e 2.5×10^5 per well, rispettivamente. Il giorno seguente, le mix di silenziamento, preparate come indicato dalla casa produttrice, sono state aggiunte ad ogni pozzetto e le piastre incubate a 37°C per 72h. In ogni esperimento è stato utilizzato come controllo negativo un siRNA con una non-targeting sequence priva di omologia con qualunque trascritto di origine umana, di topo e di ratto acquistato dalla Dharmacon. Inoltre, in ogni esperimento, al fine di controllare l'espressione di FLNA in seguito a silenziamento, è stata effettuata un'analisi in western blot utilizzando l'anticorpo anti-FLNA (diluizione 1:1000) e l'espressione è stata normalizzata sul GAPDH (Ambion, Life Technologies Inc., Carlsband, CA, diluizione 1:4000). Sono stati presi in considerazione solo gli esperimenti aventi un'efficienza di silenziamento superiore all' 80%. Ciascun esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte.

3.5 Western blot

Le analisi in western blot sono state condotte su estratti proteici totali ottenuti dalle cellule di carcinoma surrenalico H295R e SW13, dalle colture primarie e da tessuti congelati di adenomi e carcinomi adrenocorticali umani. Le cellule sono state piastrate in una multi-well da 6 pozzetti e trattate secondo le diverse modalità in base alla tipologia di esperimento condotto.

3.5.1 Estrazione proteica

Per procedere all'estrazione proteica le cellule, al termine dell'esperimento, sono state contemporaneamente lisate e rimosse meccanicamente dalla multi-well in cui erano state seminate grazie all'azione di uno scraper, utilizzato ponendo la multi-well su ghiaccio, rimuovendo il terreno di coltura delle cellule e aggiungendo, dopo un lavaggio con PBS, un tampone di lisi composto da lysis buffer ed inibitori delle proteasi. Le cellule sono state raccolte e centrifugate a 13000 rpm per 10 min a 4°C . Il surnatante, contenente le proteine da analizzare, è stato trasferito in una nuova eppendorf.

Il tessuto congelato, derivante sia da carcinomi che adenomi surrenalici, è stato invece sottoposto a dissezione meccanica con l'uso di un bisturi monouso e poi lisato in 100 µl di lysis buffer (Cell signalling technology, Danvers, MA) con l'aggiunta degli inibitori delle proteasi (Roche, Monza, IT) per 10 min in ghiaccio. Al termine, è stato centrifugato a 13000 rpm per 10 min a 4°C ed il supernatante, contenente le proteine estratte, è stato trasferito in una eppendorf nuova. Le proteine sono state quantificate con il metodo BCA.

3.5.2 Dosaggio delle proteine secondo metodo dell'acido bicinconinico (BCA)

Le proteine ottenute sono state dosate mediante metodo BCA che permette di calcolare la quantità proteica totale dei campioni da una curva di riferimento costruita con concentrazioni note di una proteina standard: la Bovine Serum Albumin (BSA). Questo metodo sfrutta la riduzione da Cu^{2+} a Cu^{1+} mediata dalle proteine in un ambiente alcalino e la capacità dell'acido bicinconinico di chelare gli ioni Cu^{1+} in maniera altamente sensibile e selettiva. Più nel dettaglio, due molecole di BCA chelano un catione Cu^{1+} . Il prodotto della reazione colorimetrica dipende dalla struttura macromolecolare delle proteine, dal numero di legami e dalla presenza di cisteina, triptofano e tirosina, ed esibisce una forte assorbanza a 562 nm proporzionale alla quantità di proteine presenti nel campione. Costruendo una retta di calibrazione, dove l'asse delle ascisse è rappresentato dalla concentrazione dello standard noto, e l'asse delle ordinate è l'assorbanza letta allo spettrofotometro, è possibile derivare la concentrazione del campione in base alla sua lettura a 562 nm. La curva standard è stata costruita su 9 punti in un intervallo che va da 0 a 2000 µg/ml di BSA.

3.5.3 Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide

La separazione delle proteine è stata eseguita mediante SDS-PAGE (sodium dodecil sulfate polyacrilamide Gel Electrophoresis). Tale tecnica permette di separare in un campo elettrico le proteine dopo averle denaturate e caricate negativamente in modo uniforme con l'SDS presente nel tampone, usando come supporto un setaccio tridimensionale di

acrilammide polimerizzata (gel). Le proteine migrano attraverso le maglie del gel verso l'anodo positivo in forma linearizzata, in base al loro peso molecolare e non alla loro conformazione. I gel per la separazione elettroforetica sono stati acquistati dalla thermo fisher scientific (Carlsband, CA, USA) e contengono una porzione superiore, lo stacking gel o gel di impacchettamento, nel quale sono presenti i pozzetti per il caricamento dei campioni ed una parte sottostante, chiamata resolving gel, nella quale la percentuale di poliacrilammide aumenta progressivamente a partire dallo stacking gel fino al margine inferiore del gel stesso, consentendo una variazione del diametro dei pori. Questa caratteristica permette la separazione sia di proteine con elevato sia con basso peso molecolare.

Le proteine quantizzate sono state preparate prelevando i μl corrispondenti ad una concentrazione di proteine di 30 o 100 μg , a seconda dell'esperimento, e risospese in una soluzione contenente di-tio treitolo (DTT) concentrazione e Blue loading buffer, diluizione 1:10. Il DTT permette la riduzione dei ponti disolfuro delle proteine facilitandone la successiva linearizzazione. Per favorire ulteriormente la denaturazione i campioni sono stati incubati a 100°C per 5 min ed infine caricati nei pozzetti dello stacking gel. In ogni gel è stato caricato il marker Precision Plus Protein Kaledoscope (Biorad, CA, USA) costituito da una miscela di proteine a peso molecolare noto. La corsa elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 200 mV per 30 min.

3.5.4 Western Blot (trasferimento)

Le proteine separate durante la corsa elettroforetica sono state poi trasferite su membrana di nitrocellulosa (BioRad, CA, USA). Per farlo si è proceduto preparando "il sandwich" nell'apposito apparato nel seguente ordine:

- Spugnetta
- Carta assorbente 3M
- Gel

- Nitrocellulosa
- Carta assorbente 3M
- Spugnetta

Il trasferimento è avvenuto nel tampone di trasferimento a 100 mV per 90 min, al termine del quale la membrana è stata colorata con Ponceau S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), un colorante reversibile delle proteine, per verificare l'avvenuto trasferimento e successivamente decolorata con abbondante tampone TTBS (Tween- tris-buffered saline).

Il tampone di trasferimento è stato preparato con H₂O bidistillata, Tris Glicina al 10% e metanolo al 20%.

Il TTBS è invece stato preparato con TBS 1X, Tween20 0.01% e H₂O bidistillata.

3.5.5 Immunoblotting

Infine, la membrana è stata sottoposta ad immunomarcatura con anticorpi specifici contro le proteine di interesse. I siti aspecifici di legame sono stati bloccati mediante incubazione con TTBS contenente 5% di latte in polvere (Nestlè, Vevey, Switzerland) per 1h a temperatura ambiente su un agitatore. In seguito, sono stati effettuati 3 lavaggi, da 5 min ciascuno, con TTBS 0.1% Tween 20, e successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario over-night a 4°C sempre in agitazione. L'anticorpo è stato diluito in TTBS contenente 5% di latte o 5% di BSA a seconda delle indicazioni del produttore. Gli anticorpi utilizzati sono:

- Anti-FLNA diluita 1:1000 in latte (Cell signalling technology, Danvers, MA)
- Anti-IGF1R (privo di cross-link con IR) diluito 1:1000 in BSA (Cell signalling technology, Danvers, MA)
- Anti-IR (privo di cross-link con IGF1R) diluito 1:1000 in BSA (Cell signalling technology, Danvers, MA)

- Anti-fosfo p44/42 MAPK ERK1/2 diluito 1:1000 in BSA (Immunological Sciences, Rome, Italy)
- Anti-total p44/42 MAPK ERK1/2 diluito 1:1000 in BSA (Immunological Sciences, Rome, Italy)
- Anti-fosfo AKT (Ser473) diluito 1:2000 in BSA (Immunological Sciences, Rome, Italy)
- Anti-total AKT diluito 1:1000 in latte (Immunological Sciences, Rome, Italy)
- Anti-GAPDH diluito 1:4000 in latte (Ambion, Life Technologies Inc., Carlsband, CA)

Al termine dell'incubazione over-night sono stati effettuati 3 lavaggi da 5 min ciascuno per eliminare l'anticorpo primario non legatosi alle proteine di interesse e poi si è proceduto all'incubazione con l'anticorpo secondario per 1h a temperatura ambiente, sempre in agitazione. Gli anticorpi secondari utilizzati sono:

- Anti-Rabbit IgG coniugato ad HRP (horseradish peroxidase) diluito 1:2000 in latte (Cell signalling technology, Danvers, MA)
- Anti-Mouse IgG coniugato ad HRP diluito 1:2000 in latte (Cell signalling technology, Danvers, MA)

Terminata l'incubazione con l'anticorpo secondario si è passati al saggio di chemiluminescenza che viene effettuato aggiungendo alla membrana una soluzione contenente H₂O₂ e luminolo LiteAblot PLUS (Euroclone, Pero, IT). La perossidasi legata all'anticorpo secondario reagisce con H₂O₂ e luminolo e si registra l'emissione di luce con lo strumento ChemiDoc-It (UVP, Upland, CA). In questo modo la proteina di interesse in ciascun campione apparirà sottoforma di banda più o meno intensa a seconda del quantitativo di proteina presente.

3.5.6 Analisi quantitativa

Per la quantificazione è stato utilizzato il programma ImageJ. Per ogni banda del gel è stata calcolata la media dell'intensità e sottratto il valore di background, ottenendo un valore che correla con la quantità di proteina presente nel campione analizzato.

3.6 Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata misurata mediante saggio colorimetrico basato sull'incorporazione della 5-bromo-2-deossipurina (BrdU) durante la sintesi di DNA nelle cellule in proliferazione utilizzando apposito kit (GE Healthcare, Life Science, Buckinghamshire, UK). Brevemente, le cellule sottoposte a silenziamento per FLNA al termine delle 72h sono state trasferite in una multi-well da 96 pozzetti alla densità di 1.7×10^4 cellule per well. Il giorno seguente, sono state trattate o meno o con gli inibitori Linsitinib (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) o NVP-ADW742 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) alle concentrazioni indicate o solamente con IGF2 100 ng/ml per 24h. La linea cellulare SW13, dopo trattamento con gli inibitori dell'IGF1R o IGF1R/IR, è stata inoltre incubata per ulteriori 24h con IGF2 100 ng/ml. Al termine, è stata aggiunta la BrdU alle H295R e alle SW13 per 2h mentre alle colture primarie di ACAs per 24h a 37°C. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno 3 volte ed ogni condizione testata in triplicato.

3.7 Saggio per la valutazione dell'apoptosi cellulare

L'apoptosi nelle cellule è stata saggiata mediante la determinazione dell'attività delle caspasi effettrici 3 e 7 con il kit Apo-ONE™ Homogenous caspase 3/7 (Promega, WI, USA). Questo saggio è basato sul clivaggio del substrato non fluorescente Z-DEVD R110 da parte delle caspasi 3/7, a dare il prodotto fluorescente Rhodamina 110 che viene liberato dalle cellule apoptotiche. Il substrato viene diluito nell'apposito buffer (diluzione 1:100), aggiunto alle cellule ed il quantitativo del prodotto fluorescente misurato a 485 nm di eccitazione e 535 nm di emissione.

Negli esperimenti da noi condotti, le cellule silenziate come sopra descritto sono state trasferite in una multi-well da 96 pozzetti alla densità di 1.7×10^4 cellule per well. È stato eseguito il saggio in accordo con le istruzioni del produttore del kit e l'attività delle caspasi è stata indicata come fluorescenza netta (RFU(relative fluorescent unit)-RFU bianco).

3.8 Analisi statistiche

I risultati sono stati espressi come media \pm S.D. Per le analisi statistiche tra due serie di dati è stato utilizzato il test parametrico t di student. Il confronto dei dati densitometrici tra gli ACAs e gli ACCs è stato effettuato con test non parametrico chi quadrato di Pearson e il coefficiente di correlazione di Spearman è stato invece utilizzato per mostrare le dirette correlazioni. I calcoli sono stati effettuati con il software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Sono stati accettati come statisticamente significativi i dati con $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 La FLNA interagisce con IGF1R e IR nelle linee cellulari umane di ACC

I dati presenti in letteratura dimostrano che entrambe le linee cellulari da noi usate, H295R ed SW13, esprimono endogenamente sia il trascritto che la proteina, quest'ultima anche da noi testata (Fig.1B&C), di IGF1R (Barlaskar 2009, De Martino 2012, Buck 2010), IRA (Buck 2010) e FLNA.

È stato già precedentemente dimostrato sia mediante saggio di glutathione S-transferase (GST) pull-down sia con saggio di immunoprecipitazione, che la FLNA interagisce direttamente con IR nelle cellule umane di melanoma A7 (He 2003), mentre non sono disponibili dati che dimostrino l'interazione tra FLNA ed IGF1R.

Per testare l'interazione FLNA-IGF1R abbiamo condotto degli esperimenti di PLA nelle H295R (Fig.1A). I segnali, che appaiono come puntini verdi, indicano la stretta vicinanza tra le due proteine e più precisamente una distanza inferiore ai 40 nm.

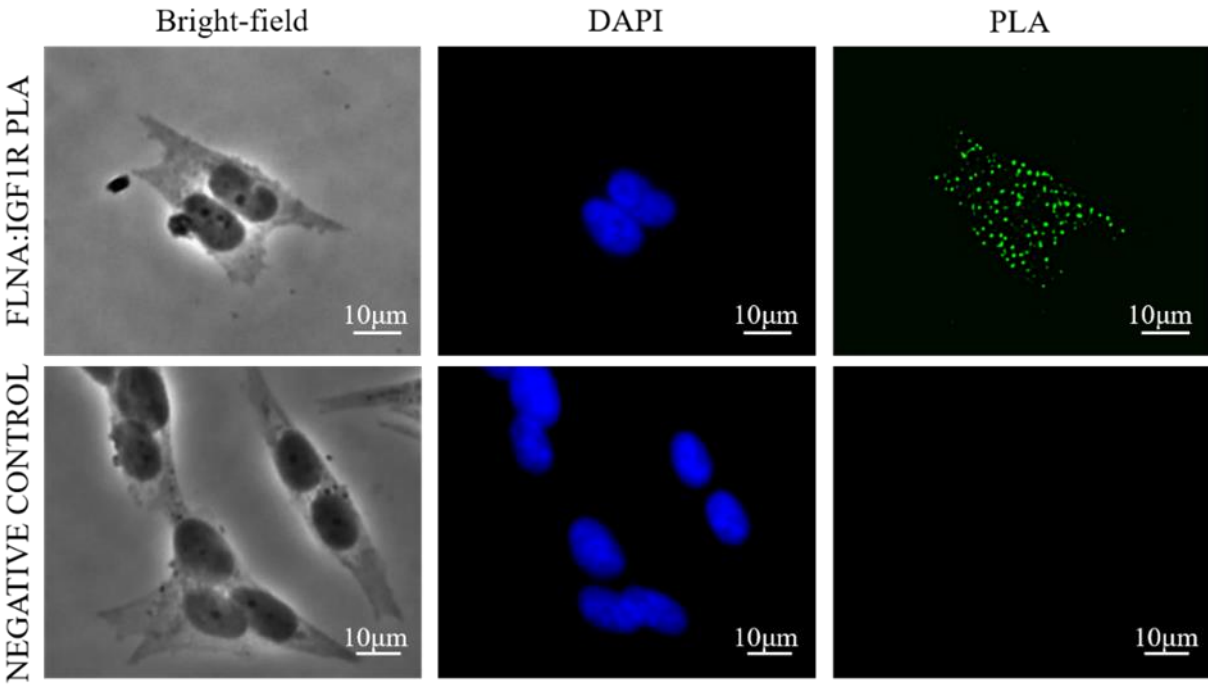
In accordo, il saggio di immunoprecipitazione ha dimostrato che la FLNA coimmunoprecipita con IGF1R in condizioni basali (Fig.1B). Inoltre, il reclutamento di FLNA al recettore aumenta in seguito a 10 min di stimolazione con IGF2 100 ng/ml (1.7 ± 0.1 -volte vs basale, $p < 0.001$) e tale aumento rimane stabile anche dopo 30 min di stimolo. Dato che le cellule H295R, ma non le SW13, esprimono e secernono nel mezzo di coltura un elevato quantitativo di IGF2 (Barlaskar 2009, Buck 2010, Logié 1999), per testare l'interazione IGF1R-FLNA in assenza di IGF2 abbiamo usato la linea cellulare SW13. I nostri risultati mostrano la presenza di IGF1R nell'immunoprecipitato anche in condizioni basali (Fig.1C), suggerendo un'interazione costitutiva tra IGF1R e FLNA. Inoltre, come osservato nelle H295R, il reclutamento di FLNA all'IGF1R aumenta dopo stimolo con IGF2 (1.8 ± 0.3 -volte a 30 min vs basale, $p < 0.001$).

Infine, in entrambe le linee cellulari FLNA coimmunoprecipita in condizioni basali con IR ma, in contrasto con i dati su IGF1R, l'interazione FLNA-IR diminuisce dopo la

stimolazione con IGF2 ($-35.7 \pm 20.2\%$ e $-46.7 \pm 22.6\%$ dopo 10 min di incubazione con IGF2 nelle H295R e nelle SW13, rispettivamente, $p < 0.05$) (Fig.1D&E).

Fig.1

A)



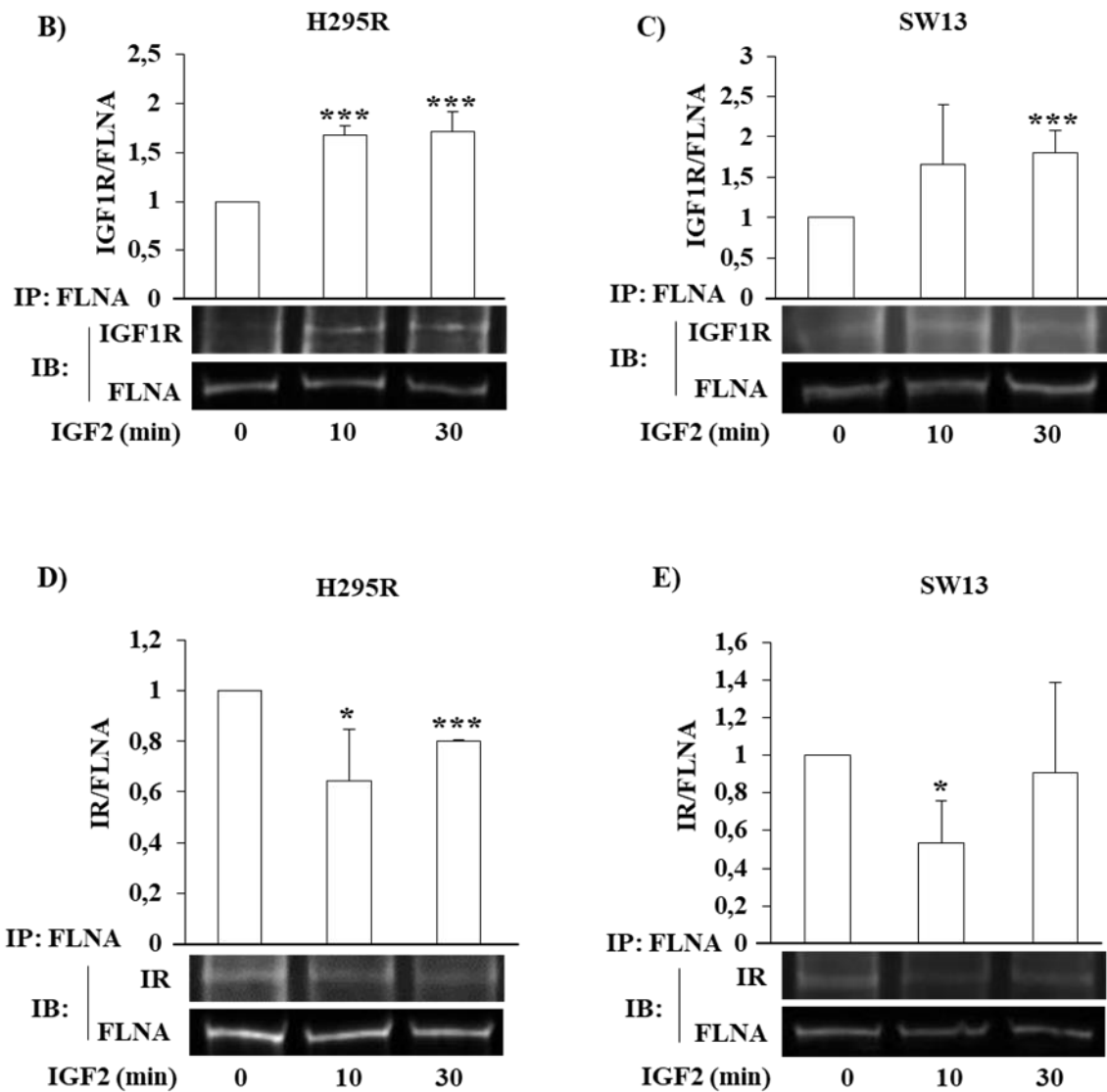


Fig.1: L'interazione di FLNA con IGF1R e IR. A) Interazione tra FLNA e IGF1R testata con saggio PLA nelle H295R. I segnali positivi per la PLA sono visibili come puntini verdi fluorescenti. I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Nel controllo negativo non sono stati aggiunti gli anticorpi primari durante il saggio della PLA. **B-E)** Saggio di coimmunoprecipitazione. Le H295R e le SW13 sono state trattate ai tempi indicati con IGF2 100 ng/ml. Le proteine estratte sono state immunoprecipitate con l'anticorpo anti-FLNA e la presenza di IGF1R, IR e FLNA negli immunoprecipitati è stata testata con immunoblotting. Sono mostrate le immagini rappresentative di uno dei 3 esperimenti indipendenti condotti. I grafici mostrano la media \pm S.D. di 3 esperimenti indipendenti, normalizzati rispetto al basale. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$ vs basale.

4.2 Il silenziamento di FLNA aumenta l'espressione di IGF1R e diminuisce quella di IR

Per testare gli effetti di FLNA sull'espressione di IGF1R e IR, abbiamo silenziato le cellule con siRNA specifici per la FLNA.

Nelle cellule H295R silenziate per FLNA si è osservato un aumento significativo del livello di espressione di IGF1R rispetto alle cellule trasfettate con il controllo negativo (1.4 ± 0.2 -volte, $p < 0.01$). In contrasto, nelle cellule SW13, che non secernono IGF2, il knockdown di FLNA non altera l'espressione di IGF1R in condizioni basali, ma la incrementa dopo incubazione con IGF2 per 24h (2.3 ± 0.8 -volte vs cellule controllo stimulate con IGF2, $p < 0.05$) (Fig.2A&B).

Al contrario, il silenziamento di FLNA riduce l'espressione di IR sia nelle H295R ($-85.5 \pm 9.1\%$, $p < 0.001$) che nelle SW13 dopo stimolazione con IGF2 ($-27.2 \pm 18.2\%$ vs le cellule controllo stimulate con IGF2, $p < 0.05$) (Fig.2C&D).

Al fine di replicare gli esperimenti nelle culture primarie di ACC, abbiamo testato l'espressione di FLNA in 3 ACCs. Tuttavia, solo uno di questi esprimeva la FLNA a livelli detectabili ed è pertanto stato sottoposto a silenziamento con il siRNA per FLNA. Le immagini ottenute mediante western blot indicano un aumento dell'espressione di IGF1R (2.9 -volte vs cellule controllo) ma non di IR (Fig.2E).

Fig.2

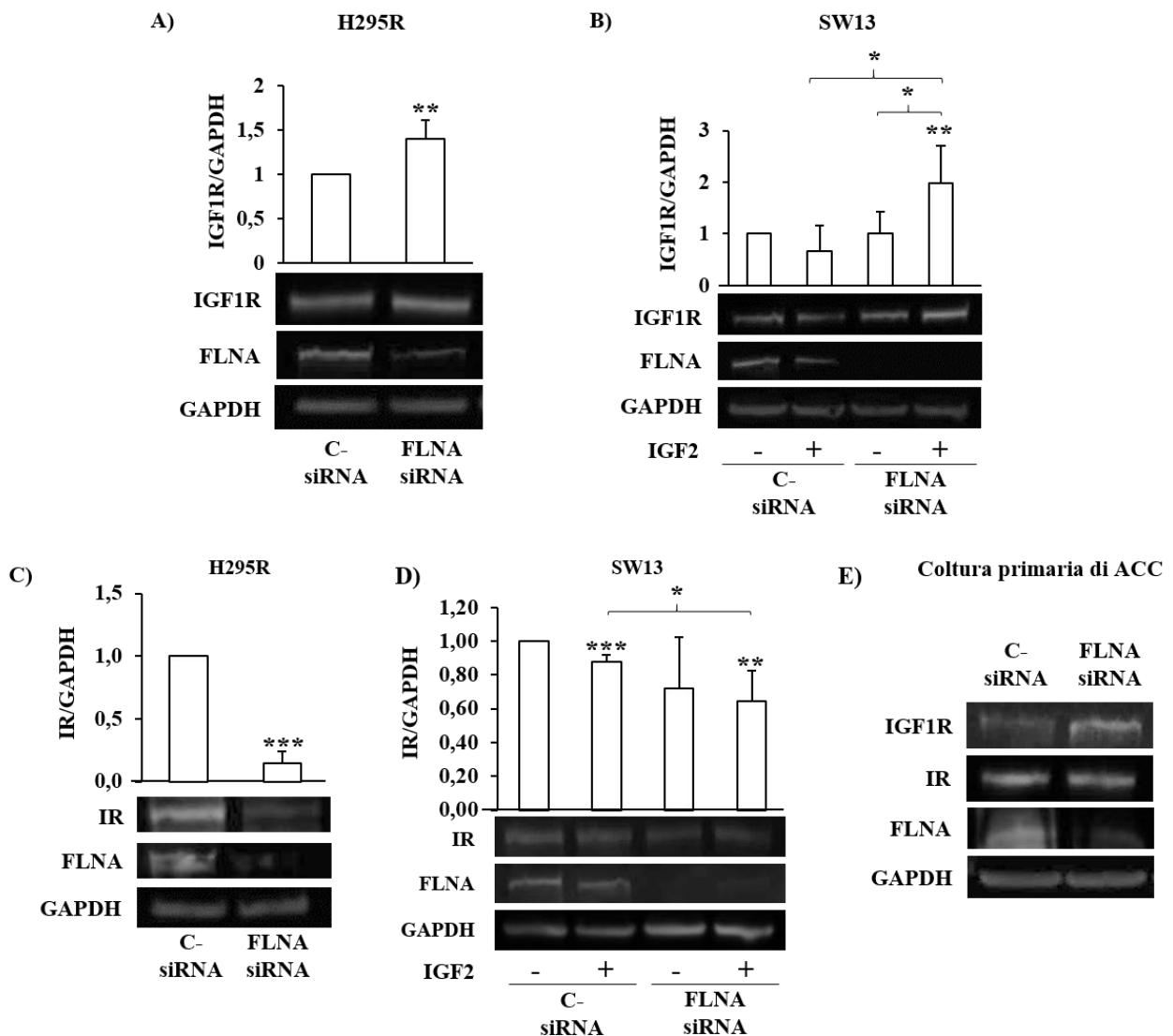


Fig.2: Il silenziamento di FLNA aumenta l'espressione di IGF1R e riduce quella di IR. Le H295R (A&C), le SW13 (B&D) e le cellule derivanti dalla coltura primaria di ACC (E) sono state trasfettate transientemente con il siRNA per FLNA o con il controllo negativo (C- siRNA) per 72h. Le cellule SW13 sono state anche trattate o non con IGF2 100 ng/ml per 24h. Le membrane sono state incubate con gli anticorpi anti FLNA, IGF1R o IR, strippate e re-incubate con l'anticorpo diretto contro il GAPDH. I grafici mostrano le analisi densitometriche di IGF1R (A&B) o IR (C&D) normalizzate sul GAPDH (media \pm S.D. di 3 esperimenti indipendenti). Sono mostrati immunoblot rappresentativi. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. E) Espressione di IGF1R e IR nelle cellule derivanti dalla coltura primaria di ACC silenziate per FLNA. Il silenziamento di FLNA induce un aumento dell'espressione di IGF1R rispetto alle cellule controllo.

4.3 Il silenziamento di FLNA aumenta gli effetti proliferativi di IGF2

Abbiamo successivamente esaminato gli effetti del silenziamento di FLNA sulle risposte intracellulari generate da IGF2.

Il silenziamento di FLNA aumenta significativamente la proliferazione nelle H295R ($130\pm 13.4\%$ vs cellule controllo, $p<0.01$) (Fig.3A) e determina nelle SW13 un incremento basale della proliferazione ($131.2\pm 6.7\%$ vs cellule controllo, $p<0.001$) ed un innalzamento degli effetti mitogenici di IGF2 ($144.3\pm 23.8\%$ vs cellule controllo stimolate con IGF2, $p<0.05$) (Fig.3B).

Al contrario, gli esperimenti condotti sulle H295R sull'attività della caspasi 3/7 hanno evidenziato che il knockdown di FLNA non altera l'apoptosi (Fig.3C).

In accordo, misurando lo stato di fosforilazione di ERK ed AKT, abbiamo trovato che il silenziamento di FLNA induce nelle H295R un aumento del rapporto p-ERK/total ERK (1.3 ± 0.1 -volte vs cellule controllo, $p<0.01$), ma non di p-AKT/total AKT (Fig.3D&E).

In linea con questi risultati, abbiamo osservato che nella coltura primaria derivante da ACC il silenziamento di FLNA aumenta fortemente la fosforilazione di ERK, sia in assenza dell'incubazione con IGF2 (4.3-volte vs cellule controllo) sia dopo aggiunta di IGF2 nel mezzo di coltura (2.2-volte vs cellule controllo stimolate con IGF2) (Fig.3F).

A causa della rarità degli ACCs, abbiamo deciso di replicare gli esperimenti di proliferazione in colture primarie derivanti da adenomi del surrene le quali, esprimendo maggiori quantitativi di FLNA rispetto agli ACCs (vedi paragrafo 5 dei risultati), risultano inoltre più idonee agli esperimenti di silenziamento. In accordo con i risultati ottenuti con la coltura primaria ottenuta dal carcinoma surrenalico, abbiamo osservato che il silenziamento di FLNA aumenta sia la fosforilazione di ERK (2.68 ± 1.18 -volte vs cellule controllo, $p<0.05$) (Fig.3G) che la proliferazione cellulare ($127.6\pm 14.3\%$ vs cellule controllo, $p<0.01$) (Fig.3H).

Fig.3

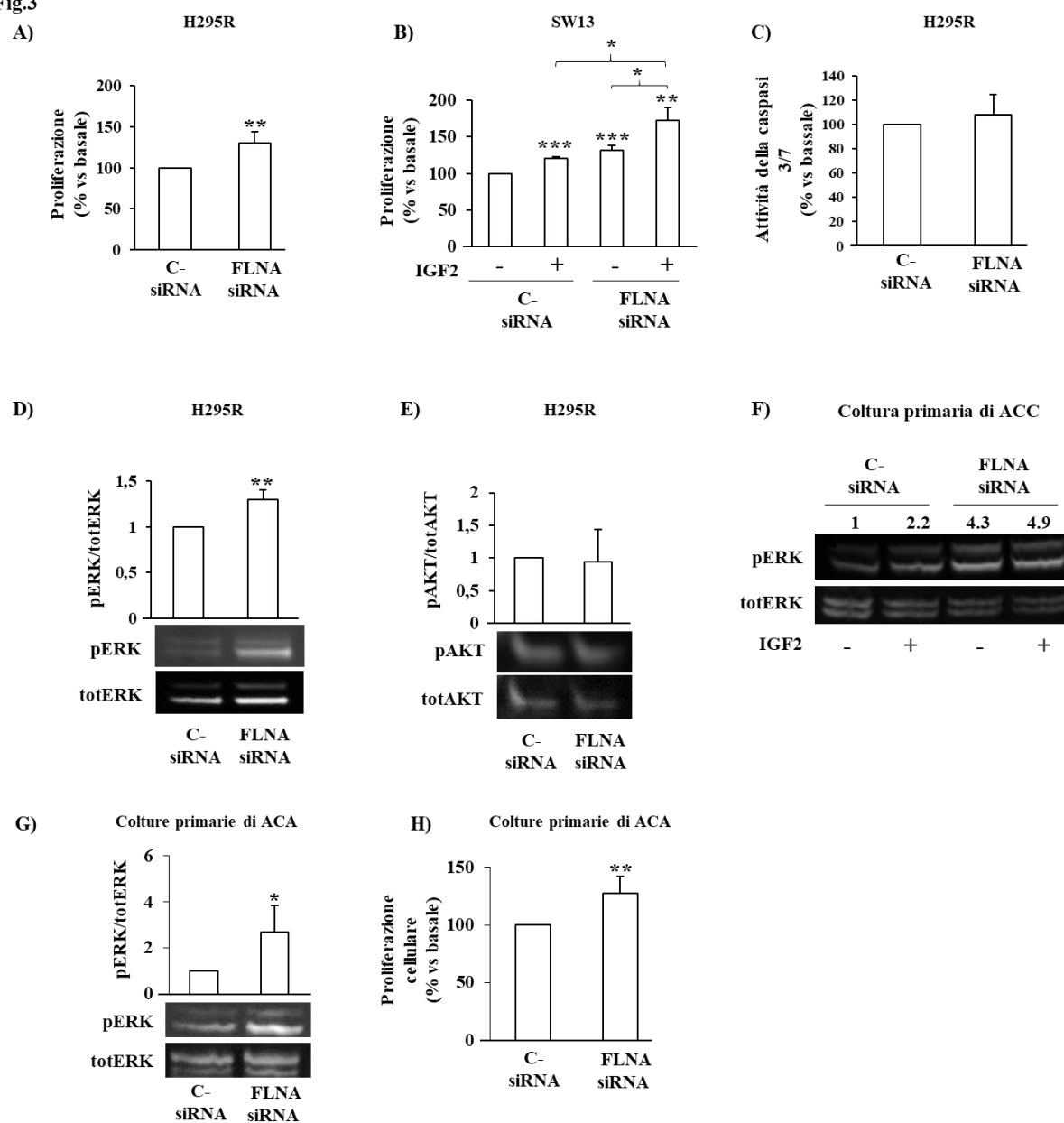


Fig.3: Il silenziamento di FLNA potenzia gli effetti di IGF2 sulla proliferazione cellulare e la fosforilazione di ERK. Saggi di proliferazione nelle cellule H295R (A) e SW13 (B) silenziate per FLNA. Le cellule SW13 sono state stimulate o no con IGF2 100 ng/ml per 24h. La BrdU è stata aggiunta per 2h alle cellule silenziate ed è stata misurata la sua incorporazione nel DNA di nuova sintesi. Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno 3 volte ed ogni condizione analizzata in triplicato. I valori rappresentati (\pm S.D.) sono espressi come percentuale rispetto al basale C-siRNA. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ C) Il knockdown di FLNA non espleta effetti

sull'apoptosi cellulare. È stata misurata l'attività della caspasi-3/7. I dati sono rappresentati come media \pm S.D. di 3 esperimenti indipendenti. Ogni condizione è stata analizzata in quintuplicato.

D&E) Le proteine sono state estratte da cellule H295R silenziate per FLNA. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo diretto contro p-ERK, strippate e re-incubate con l'anticorpo anti-total ERK oppure incubate con l'anticorpo p-AKT (Ser473), strippate e ibridate con total AKT. Sono mostrati gli immunoblot rappresentativi e le analisi densitometriche di p-ERK normalizzato su total ERK e p-AKT normalizzato su total AKT (media \pm S.D. di 3 esperimenti indipendenti). ** = $p < 0.01$ vs cellule controllo.

F) Rapporto tra p-ERK e total ERK nelle cellule derivanti dalla coltura primaria di ACC silenziate per FLNA e incubate o meno con IGF2 100 ng/ml per 10 min. I valori presenti sopra le immagini del western blot indicano l'analisi densitometrica di p-ERK normalizzato su total ERK.

G) Western blot rappresentativo con correlata analisi densitometrica del rapporto tra p-ERK e total-ERK nelle cellule derivate dalle colture primarie di ACAs silenziate per FLNA. I valori rappresentano la media (\pm S.D.) di 4 ACAs. * = $p < 0.05$ vs cellule controllo.

H) Saggio di proliferazione nelle cellule derivate dalle colture primarie di ACAs silenziate per FLNA e stimulate con IGF2 100 ng/mL per 24h. Il silenziamento di FLNA induce un aumento della proliferazione cellulare rispetto alle cellule controllo. I valori rappresentano la media (\pm S.D.) di 4 ACAs espressi come percentuale rispetto al basale C- siRNA. ** = $p < 0.01$.

4.4 Il silenziamento di FLNA potenzia gli effetti antiproliferativi degli inibitori di IGF1R Linsitinib e NVP-ADW742

Per valutare il ruolo di FLNA nel modulare gli effetti antiproliferativi degli inibitori di IGF1R, abbiamo usato sia il Linsitinib, un inibitore di IGF1R e di IR, che NVP-ADW742, un inibitore selettivo di IGF1R (Mitsiades 2004), al fine di discriminare lo specifico ruolo di IGF1R rispetto ad IR.

Nelle H295R silenziate per FLNA la più bassa concentrazione di Linsitinib che ha effetti antiproliferativi dopo 24h di incubazione è 0.1 μM ($-9.9\pm 4\%$ proliferazione vs basale, $p<0.001$), mentre nessun effetto è stato osservato in queste condizioni sperimentali nelle cellule trasfettate con il controllo negativo (Fig.4A). Inoltre, è stato dimostrato che la dose a 1 μM riduce la proliferazione cellulare del $38.2\pm 16.6\%$ vs basale ($p<0.001$) nelle cellule silenziate per FLNA e del $22.2\pm 13.5\%$ nelle cellule controllo ($p<0.001$ vs basale e $p<0.05$ vs cellule silenziate) (Fig.4A).

Le cellule SW13 non sono invece risultate responsive a basse dosi di Linsitinib (Fig.4B). In maniera interessante, una significativa riduzione della proliferazione cellulare è stata osservata alla dose a 5 μM nelle cellule silenziate per FLNA ($-37.3\pm 9.4\%$ vs basale, $p<0.05$) ma non nelle cellule controllo. Tuttavia, questa concentrazione è superiore alla concentrazione massima 3.1 μM rilevata nel sangue dei pazienti sottoposti allo studio di fase III e corrispondente all'assunzione di due dosi giornaliere da 150 mg raccomandate dallo studio di fase II sul Linsitinib. (Fassnacht 2015, Puzanov 2015). Non possiamo escludere effetti tossici nelle cellule trattate con concentrazioni più elevate di 5 μM .

Nelle H295R, l'NVP-ADW742 induce alla dose a 0.5 μM una diminuzione della proliferazione cellulare nelle cellule silenziate per FLNA ($-24.6\pm 13.5\%$ vs basale, $p<0.05$) e solo una leggera riduzione non significativa nelle cellule controllo. Inoltre, a 1 μM risulta più efficiente nelle cellule silenziate ($46.3\pm 16.1\%$ proliferazione cellulare, $p<0.001$ vs basale) rispetto alle cellule controllo ($-26.5\pm 13.8\%$, $p<0.001$ vs basale and $p<0.05$ vs cellule silenziate) (Fig.4C).

In maniera analoga a quanto osservato per il Linsitinib, le SW13 non sono responsive alle basse dosi di NVP-ADW742, ma è stata osservata una forte riduzione della proliferazione cellulare in entrambe le condizioni (cellule silenziate per FLNA e controllo) a 5 μ M e 10 μ M (Fig.4D).

Tutti questi dati suggeriscono che il knockdown di FLNA sia in grado di potenziare gli effetti degli inibitori sia di IGF1R/IR che di IGF1R sulla proliferazione cellulare delle H295R.

Fig.4

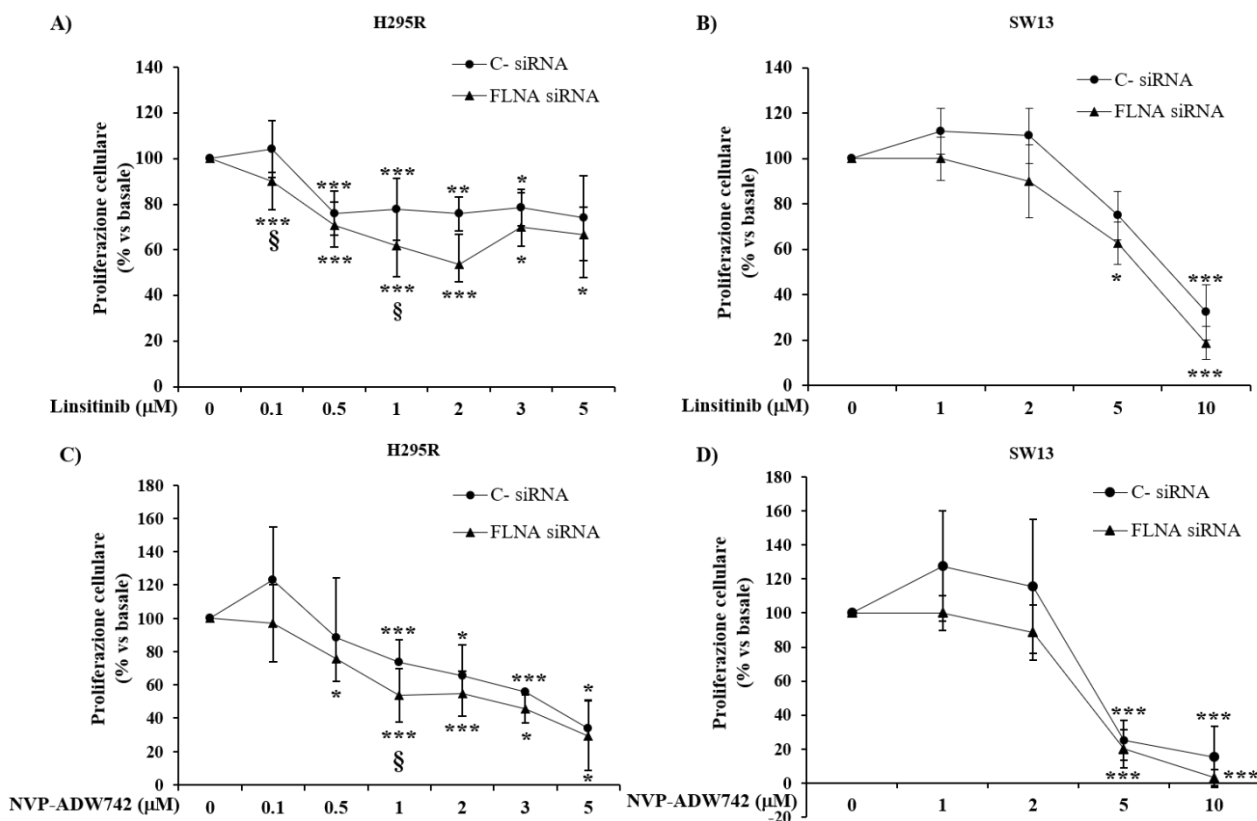


Fig.4: Il silenziamento di FLNA aumenta gli effetti antiproliferativi del Linsitinib e di NVP-ADW742. Saggi di proliferazione delle H295R e SW13. Le cellule silenziate per FLNA sono state incubate per 24h con o senza Linsitinib (A&B) o NVP-ADW742 (C&D) alle concentrazioni indicate. Le SW13 sono inoltre state stimulate con IGF2 100 ng/ml per ulteriori 24h. La BrdU è stata aggiunta per 2h. I valori rappresentano la media (\pm S.D.) espressa come % rispetto al basale. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno 3 volte e ogni condizione è stata effettuata in triplicato. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ vs condizione basale. §, $p < 0.05$ vs controllo negativo.

4.5 Gli effetti di IGF2 e Linsitinib sulla fosforilazione di ERK nelle cellule A7 ed M2

Negli esperimenti da noi condotti abbiamo ottenuto un'efficienza di silenziamento di FLNA nelle H295R e nelle SW13 di circa il 90%. Per testare quindi gli effetti di una completa assenza di FLNA abbiamo usato le cellule umane di melanoma M2, completamente mancanti dell'espressione di FLNA, e come controllo il loro subclone A7, in cui l'espressione di FLNA è stata stabilmente reintrodotta (Cunningham 1992). Queste cellule esprimono IGF1R a livelli simili sia in condizioni basali che dopo stimolo con IGF2 per 24h (Fig.5A). Le immagini derivanti dal western blot evidenziano che IGF2 è capace di aumentare la fosforilazione di ERK nelle cellule M2 mancanti di FLNA (2.1 ± 0.5 -volte vs basale, $p < 0.05$), ma non nelle A7 confermando quindi il ruolo di FLNA nell'ostacolare il signalling di IGF1R solo erk specifica (Fig.5B). In aggiunta, solo le cellule M2 sono responsive agli effetti inibitori del Linsitinib sulla fosforilazione di ERK in presenza di IGF2 ($-81.6 \pm 32\%$ vs cellule trattate solo con IGF2, $p < 0.01$) (Fig.5B).

Fig.5

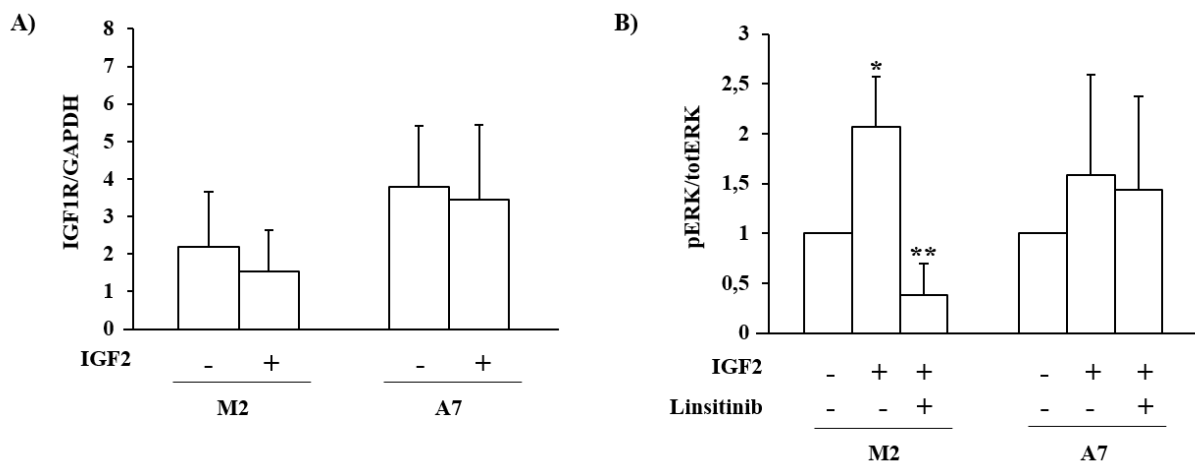


Fig.5: Effetti dell'IGF2 e del Linsitinib sulla fosforilazione di ERK nelle cellule di melanoma A7 ed M2. A) L'espressione di FLNA non impatta sull'espressione basale di IGF1R. Le cellule sono state incubate con IGF2 100 ng/ml per 24h. Il grafico mostra la quantizzazione di IGF1R normalizzata su GAPDH (media \pm S.D. di 3 esperimenti indipendenti). B) Analisi al western blot della fosforilazione di ERK. Le cellule M2 (prive dell'espressione di FLNA) e A7 sono state pretrattate con Linsitinib 1 μ M per 24h e poi stimolate con IGF2 100 ng/ml per 10 min. Le

membrane sono state incubate con l'anticorpo anti p-ERK, strippate e re-incubate con total ERK. Il grafico mostra l'analisi densitometrica di p-ERK normalizzata su total ERK (media \pm S.D. di 3 esperimenti indipendenti). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ vs basale.

4.6 L'espressione di FLNA negli ACCs e negli ACAs e la correlazione con il pathway di IGF

Abbiamo analizzato mediante western blot l'espressione di FLNA in 10 tessuti derivanti da carcinomi del surrene e 10 derivanti da adenomi del surrene (Fig.6A). I livelli di FLNA sono risultati altamente variabili nei campioni di ACC, ma significativamente più bassi rispetto agli ACAs (media del rapporto FLNA/GAPDH 0.37 ± 0.38 negli ACCs e 0.90 ± 0.63 negli ACAs, $p < 0.05$) (Fig.6B). L'espressione invece di IGF1R è risultata comparabile tra i due gruppi (media del rapporto IGF1R/GAPDH 0.129 ± 0.126 per gli ACCs e 0.190 ± 0.185 per gli ACAs).

Dall'analisi statistica mediante coefficiente Spearman che ha evidenziato una correlazione inversa tra il rapporto FLNA/IGF1R e FLNA/IR con p-ERK/total ERK negli ACCs (-0.68 e -0.71 rispettivamente, $p < 0.05$) ma non negli ACAs. Tale correlazione suggerisce che bassi livelli di FLNA, in presenza di alti livelli di IGF1R e/o IR, corrispondono ad un innalzamento del pathway di IGF1R negli ACCs.

Fig.6

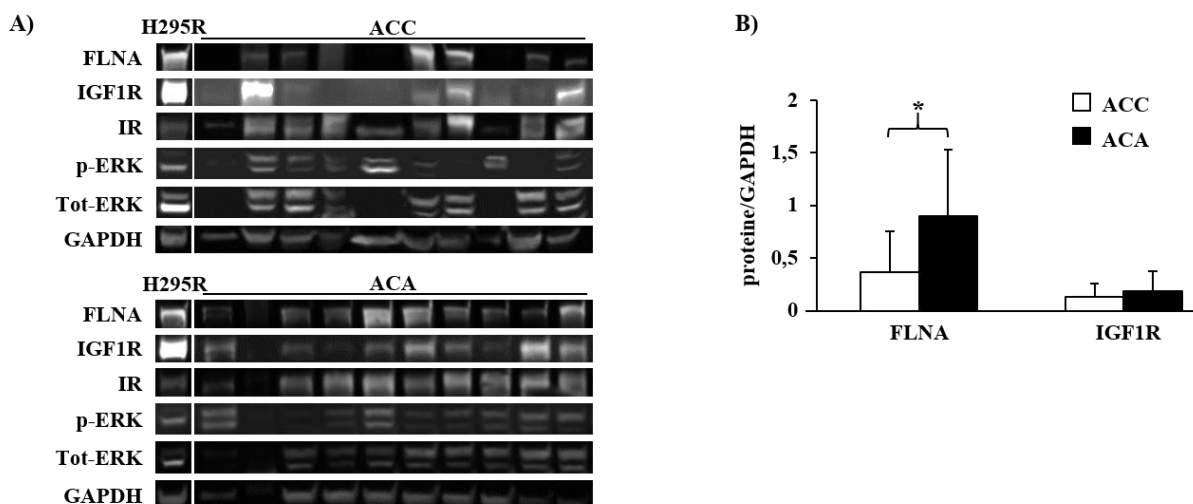


Fig.6: L'espressione di FLNA negli ACCs e negli ACAs. A) Immagini del western blot rappresentative dell'espressione di FLNA, IGF1R, IR, p-ERK, total ERK e GAPDH in 10 ACCs, 10 ACAs e nelle H295R. B) Il grafico mostra le analisi densitometriche dell'espressione di FLNA e

IGF1R normalizzate sul GAPDH (media \pm S.D.). * = $p < 0.05$. Il lisato cellulare delle H295R è stato incluso al fine di normalizzare tutte le bande rispetto allo stesso campione controllo.

5. Discussione

Il presente studio ha permesso di identificare la proteina del citoscheletro FLNA come un repressore del pathway di IGF2 e ha dimostrato l'abilità di FLNA di influenzare il signalling e la risposta alla terapia con gli inibitori di IGF1R e IGF1R/IR.

Negli ACCs l'IGF2, overespresso nel 90% dei casi, è responsabile della crescita delle cellule di carcinoma del surrene. Come precedentemente descritto, tale fattore di crescita lega IGF1R inducendo l'attivazione del pathway delle MAPK e PI3K/AKT. Inoltre, esso presenta un'affinità di legame anche per l'isoforma A del recettore dell'insulina (IRA), che è maggiormente espressa in tali tumori, ma ad oggi non è ancora noto come tale interazione contribuisca agli effetti mitogenici di IGF2. Data la centralità di IGF2, numerosi gruppi di ricerca hanno testato gli effetti degli inibitori di IGF1R ed IR osservando promettenti effetti sulla riduzione della crescita tumorale sia *in vitro* che nel modello murino (Almeida 2008, Barlaskar 2009). Tuttavia, nel trial clinico di fase III recentemente condotto con l'inibitore Linsitinib, è stato evidenziato un effetto terapeutico statisticamente significativo solo nel 3% dei pazienti (Fassnacht 2015).

A fronte di tale recente risultato, il nostro lavoro si pone nell'ottica di meglio comprendere i meccanismi molecolari alla base del complesso pathway dell'IGF. A tal proposito sono state utilizzate due diverse linee cellulari: le H295R e le SW13. Le H295R presentano un'elevata espressione dell'IGF2, confermata in diversi lavori sia da un incremento dell'RNA messaggero sia della proteina (Barlaskar 2009, Buck 2010, Logié 1999) e rappresentano pertanto un buon modello per lo studio della regolazione dell'IGF nello sviluppo di tali tumori. L'utilizzo delle SW13 come modello del carcinoma del surrene risulta invece controverso in letteratura. Sono numerosi i lavori in cui vengono usate come modello del carcinoma del surrene non funzionante, ma non è chiaro se derivino da un tumore primitivo della corteccia surrenalica o da metastasi insidiate nella corteccia del surrene (Wang 2012). Essendo tuttavia una linea cellulare che esprime endogenamente IGF1R ma non IGF2, il loro utilizzo ci ha permesso di testare gli effetti del silenziamento di

FLNA in assenza di IGF2. In aggiunta, per testare gli effetti di FLNA in un modello più rappresentativo, abbiamo replicato i nostri esperimenti in colture primarie derivanti da carcinomi ed adenomi del surrene.

Abbiamo innanzitutto dimostrato che FLNA interagisce con IGF1R nelle H295R mediante PLA, un metodo che permette di detectare se due proteine sono ad una distanza inferiore ai 40nm. Abbiamo inoltre constatato che IGF2 induce un effetto opposto nel binding di FLNA con i due recettori IGF1R e IR. È in grado di aumentare l'interazione IGF1R-FLNA e ridurre quella IR-FLNA.

Grazie al silenziamento di FLNA in entrambe le linee cellulari, abbiamo inoltre testato l'effetto sull'espressione di IGF1R e IR in condizioni di stimolo con IGF2. Quest'ultimo viene prodotto e secreto nel mezzo di coltura dalle H295R e dalle cellule derivanti dalla coltura primaria di ACC mentre è stato aggiunto esogenamente nel terreno di coltura delle SW13. Gli esperimenti condotti hanno rivelato che il silenziamento di FLNA, in condizioni di stimolo con IGF2, è in grado di aumentare l'espressione di IGF1R in entrambe le linee cellulari e nella coltura primaria di ACC. Al contrario, l'espressione di IR risulta ridotta nelle linee cellulari ed invariata nelle cellule derivanti dalla coltura primaria del carcinoma del surrene. Per poter spiegare il meccanismo mediante il quale FLNA impatta sull'espressione di IGF1R e IR, saranno necessari ulteriori esperimenti. Ad oggi, basandoci sui dati pubblicati precedentemente, possiamo ipotizzare che FLNA, in condizioni di stimolo con IGF2, sia in grado di promuovere la downregolazione di IGF1R e di proteggere invece IR dalla degradazione. È stato infatti ampiamente dimostrato che FLNA è direttamente coinvolta nella regolazione dei processi endocitici, nel trafficking post-endocitico e nella downregolazione di differenti recettori presenti sulla membrana cellulare (Peverelli 2012, Peverelli 2014, Treppiedi 2019, Pons 2017, Fiori 2009, Nakamura 2011). Tra questi vi è il recettore tirosin chinasi del fattore di crescita epiteliale (EGFR), protagonista di un recente lavoro di Fiori et al, nel quale è stato visto che il recettore necessita di FLNA per procedere verso il pathway di degradazione nelle cellule di melanoma (Fiori 2009). Infatti, nelle linee cellulari di melanoma M2 (mancanti di FLNA)

ed A7 (esprimenti FLNA), EGFR pur avendo lo stesso rate di endocitosi EGF mediata, presenta nelle M2 una marcata resistenza alla degradazione rispetto alle A7. In accordo, l'EGFR internalizzato collocalizza con il marker lisosomiale LAMP-1 nelle cellule A7 ma non nelle M2 (Fiori 2009). A fronte di tale lavoro, è possibile ipotizzare che nelle cellule di carcinoma del surrene, in seguito al binding di IGF2, IGF1R recluti FLNA, che a sua volta permette l'internalizzazione di IGF1R e l'inizio del successivo processo di degradazione. L'ipotesi di un meccanismo agonista dipendente è supportata dall'osservazione che il silenziamento di FLNA induce un effetto sui livelli di espressione di IGF1R solo in presenza di stimolazione con IGF2, ma non in condizioni basali.

È importante inoltre sottolineare che per ciò che concerne IR non sono disponibili in commercio anticorpi in grado di distinguere le due isoforme IRA e IRB. Entrambe le isoforme sono espresse nell'ACC (De Martino 2019) ma mentre IRA stimola la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, IRB è maggiormente coinvolto nella regolazione metabolica cellulare (Belfiore 2009). Dato che IRA, ma non IRB, ha un'elevata affinità per IGF2 (Hakuno 2018, Vella 2018), possiamo ipotizzare che l'alterazione di IR, indotta da IGF2, sia imputabile a IRA.

Abbiamo successivamente esaminato l'effetto dell'alterazione di espressione di FLNA sugli eventi intracellulari. In entrambe le linee cellulari e nelle cellule derivate dalla coltura primaria abbiamo osservato dopo knockdown di FLNA un aumento degli effetti di IGF2 sulla proliferazione cellulare e la fosforilazione di ERK. Al contrario, non abbiamo visto effetti sulla fosforilazione di AKT e l'induzione della via apoptotica. Questo aumento selettivo di uno specifico pathway indica che gli effetti osservati non sono semplicemente il risultato di un aumento dell'espressione di IGF1R ma sono anche dovuti ad un'assenza di un'attività regolatoria negativa della FLNA sulla cascata delle MAPK. Tale effetto inibitorio osservato nel carcinoma del surrene era stato già visto precedentemente nelle cellule di carcinoma del colon, dove il silenziamento di FLNA induce un'attivazione di EGFR, AKT ed ERK (Wang 2019). Al contrario, in altri tumori FLNA gioca un ruolo

opposto. Per esempio, il knockdown di FLNA nel polmone del topo determina riduzione dell'attivazione di ERK e AKT (Nallapalli 2012).

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che FLNA nel carcinoma del surrene è un repressore specifico del signalling IGF2 indotto. In assenza di FLNA, l'aumentata espressione di IGF1R, associata alla perdita dell'attività regolatoria di FLNA sul pathway di ERK, concorre alla promozione della crescita cellulare IGF2 indotta. Dato che in assenza di FLNA l'espressione di IR è notevolmente bassa, abbiamo ritenuto opportuno considerare trascurabile invece il contributo di IR alla crescita cellulare. In accordo con quanto da noi osservato, in uno studio precedente era stato dimostrato che la perdita di Flna determina un innalzamento del signalling di IGF1R nelle cellule progenitrici neuronali (Houlihan 2016). Inoltre, un simile ruolo di FLNA nel regolare ERK ma non AKT era stato descritto nelle cellule di melanoma A7 ed M2 con regolazione del signalling del recettore IR (He 2003). Gli autori hanno mostrato che le cellule M2, mancanti di FLNA, esibiscono un normale signalling di IR mentre nelle A7, esprimenti FLNA, non si ha fosforilazione della tirosina Shc insulina-dipendente ed attivazione di ERK. Tuttavia non sono state osservate alterazioni nella fosforilazione dell'IRS1 o dell'attivazione della cascata del fosfatidilinositolo-3 chinasi/AKT. È altresì importante notare che essi osservano una ridotta traslocazione di Shc, SOS1 ed ERK ai lipid raft in presenza di FLNA. Inoltre, hanno dimostrato che l'overespressione di un frammento C terminale di FLNA nelle cellule epatiche HepG2 blocca l'interazione IR-FLNA e potenzia l'attività di ERK ma non di AKT, suggerendo quindi che FLNA interagisce con IR per esercitare un effetto inibitorio sul pathway delle MAPK (He 2003).

Dato che FLNA impatta negativamente sull'attivazione dell'asse IGF2/IGF1R, abbiamo deciso di testare un possibile ruolo di FLNA nel determinare la risposta delle cellule di ACC agli inibitori di IGF1R. I nostri risultati mostrano che la perdita di FLNA nelle H295R aumenta la risposta cellulare al Linsitinib, inibitore di IGF1R e IR, e all'NVP-ADW742, specifico inibitore di IGF1R. In particolare, il silenziamento di FLNA rende le cellule responsive a concentrazioni più basse degli inibitori. Inoltre, alla concentrazione ad

1 μ M l'inibizione è significativamente più elevata nelle cellule silenziate rispetto al controllo. Le SW13 non sono invece responsive ad entrambi gli inibitori se consideriamo il range di concentrazioni massime riscontrate nel plasma umano (1.7-3.1 μ M) e corrispondenti all'assunzione delle due dosi giornaliere da 150mg ciascuna raccomandate dallo studio di fase II sul Linsitinib (Fassnacht 2015, Puzanov 2015), tuttavia alla dose a 5 μ M, il Linsitinib esplica un significativo effetto antiproliferativo solo in assenza di FLNA.

Per poter studiare al meglio gli effetti della completa assenza di espressione di FLNA abbiamo usato la linea cellulare di melanoma M2, deficiente per l'espressione di FLNA, e confrontato i risultati con il suo subclone, le cellule A7, in cui l'espressione di FLNA è stata stabilmente reintrodotta (Cunningham 1992). Queste linee cellulari esprimono IGF1R a livelli comparabili sia in condizioni basali che dopo stimolo con IGF2, suggerendo che gli effetti di FLNA sulla regolazione dell'espressione di IGF1R dopo legame con l'agonista, sono specifici delle cellule di ACC. Gli esperimenti condotti ci hanno permesso di confermare il ruolo di FLNA come soppressore del signalling di IGF1R. IGF2 è in grado di indurre la fosforilazione di ERK nelle M2 ma non nelle A7. In aggiunta, le cellule A7 sono completamente resistenti agli effetti inibitori del Linsitinib, mentre l'attivazione di ERK è fortemente ridotta nelle cellule M2, in linea con quanto osservato nelle cellule di ACC silenziate per FLNA.

Infine, le analisi condotte sui campioni di tessuto di carcinoma del surrene supportano quanto osservato nelle linee cellulari. Sebbene l'espressione di FLNA sia variabile negli ACCs, la sua espressione media è significativamente ridotta rispetto a quella degli ACAs, supportando l'idea di un aumento dell'attivazione dell'asse dell'IGF2 che deriva dai nostri risultati in vitro. In accordo con i dati in letteratura, abbiamo osservato un'espressione di IGF1R comparabile tra i due gruppi (Almeida 2008). Tuttavia, il rapporto FLNA/IGF1R è inversamente correlato con il rapporto ERK fosforilato/ERK totale negli ACCs ma non negli ACAs. Questo suggerisce che bassi livelli di FLNA negli ACCs, in presenza di elevata espressione di IGF1R, aumentano il signalling di IGF2 ed in particolar modo la via di ERK. A causa del basso numero di campioni di ACC non sono

state condotte analisi di correlazione tra le caratteristiche clinico-patologiche e l'espressione di FLNA. Saranno pertanto necessari ulteriori indagini su una maggiore coorte di pazienti al fine di confermare i dati ed valutare l'utilizzo di FLNA come nuovo fattore prognostico per gli ACCs.

Complessivamente questi dati supportano il ruolo di FLNA nel ridurre sia gli effetti mitogenici di IGF2 che l'efficacia degli inibitori di IGF1R. Possiamo ipotizzare che in assenza di FLNA il pathway IGF2/IGF1R rappresenti il meccanismo centrale per la crescita del tumore e che in queste condizioni l'inibizione di IGF1R possa raggiungere un impatto maggiore sulla proliferazione cellulare. La perdita di FLNA può quindi rappresentare un nuovo biomarcatore predittivo per l'identificazione di una sottopopolazione di pazienti nei quali la terapia con i target di IGF1R possa essere efficace.

6. REFERENZE

Adam P, Hahner S, Hartmann M, et al. Epidermal growth factor receptor in adrenocortical tumors: analysis of gene sequence, protein expression and correlation with clinical outcome. *Mod Pathol.* **2010**;23(12):1596-1604. doi:10.1038/modpathol.2010.153. PMID: 20693985.

Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* **2006**;91(6):2027-37. doi:10.1210/jc.2005-2639. PMID: 16551738.

Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **2008**;93(9):3524-31. doi:10.1210/jc.2008-0065. PMID: 18611974.

Anastasi G. *Trattato di Anatomia Umana.* 4a ed. Edi.Ermes. **2007.**

Angelousi A, Kyriakopoulos G, Nasiri-Ansari N, et al. The Role of Epithelial Growth Factors and Insulin Growth Factors in the Adrenal Neoplasms. *Ann Transl Med.* **2018**;6(12):253. doi:10.21037/atm.2018.05.52. PMID: 30069455.

Arlt W, Biehl M, Taylor AE, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **2011**;96(12):3775-84. doi:10.1210/jc.2011-1565. PMID: 21917861.

Assié G, Jouinot A, Fassnacht M, et al. Value of Molecular Classification for Prognostic Assessment of Adrenocortical Carcinoma. *JAMA Oncol.* **2019**;5(10) doi:10.1001/jamaoncol.2019.1558. PMID: 31294750.

Baldissera F. *Fisiologia e biofisica medica*. 4a ed. Poletto. **2009**.

Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, et al. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. **2009**;94(1):204-12. doi:10.1210/jc.2008-1456. PMID: 18854392.

Baudin E, Endocrine Tumor Board of Gustave Roussy. Adrenocortical carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am*. **2015**;44(2):411-34. doi:10.1016/j.ecl.2015.03.001. PMID: 26038209.

Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2000**;278(6):E967-76. doi:10.1152/ajpendo.2000.278.6.E967. PMID: 10826997.

Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, et al. Nuclear versus cytoplasmatic localisation of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clin Cancer Res*. **2009**;15(3):788-796. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1402. PMID: 19188148.

Beekman JM, van der Poel CE, van der Linden JA, et al. Filamin A stabilizes Fc gamma RI surface expression and prevents its lysosomal routing. *J Immunol*. **2008**;180(6):3938-45. doi:10.4049/jimmunol.180.6.3938. PMID: 18322202.

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. **2009**;30(6):586-623. doi:10.1210/er.2008-0047. PMID: 19752219.

Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, et al. Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma. *Surgery*. **1997**;122(6):1212-8. doi:10.1016/s0039-6060(97)90229-4. PMID: 9426440.

Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, et al. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*. **2002**;87(11):4961-5. doi:10.1210/jc.2001-011799. PMID: 12414859.

Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A et al. ACTHreceptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol*. **2001**;144(3):199-206. doi:10.1530/eje.0.1440199. PMID: 11248736.

Bonnet-Serrano F, Bertherat J. Genetics of tumors of the adrenal cortex. *Endocr Relat Cancer*. **2018**;25(3):R131-52. doi:10.1530/ERC-17-0361. PMID: 29233839.

Boulle N, Logié A, Gicquel C, et al. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. **1998**;83(5):1713-20. doi:10.1210/jcem.83.5.4816. PMID: 9589681.

Brito LP, Ribeiro TC, Almeida MQ, et al. The role of fibroblast growth factor receptor 4 overexpression and gene amplification as prognostic markers in pediatric and adult adrenocortical tumors. *Endocr Relat Cancer*. **2012**;19(3):L11-3. doi:10.1530/ERC-11-0231. PMID: 22241720.

Buck E, Gokhale PC, Koujak S, et al. Compensatory insulin receptor (IR) activation on inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R): rationale for cotargeting IGF-

1R and IR in cancer. *Mol Cancer Ther.* **2010**;9(10):2652-64. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0318. PMID: 20924128.

Cai W, Sakaguchi M, Kleinridders A, et al. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun.* **2017**;8:14892. doi:10.1038/ncomms14892. PMID: 28345670.

Cho EY, Cho DI, Park JH, et al. Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor. *Mol Endocrinol.* **2007**;21(9):2242-54. doi:10.1210/me.2007-0202. PMID: 17536008.

Cordera F, Grant C, van Heerden J, et al. Androgen-secreting adrenal tumors. *Surgery.* **2003**;134(6):874-80. doi:10.1016/s0039-6060(03)00410-0. PMID: 14668717.

Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, et al. Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science.* **1992**;255(5042):325-7. doi:10.1126/science.1549777. PMID: 1549777.

de Fraipont F, El Atifi M, Gicquel C, et al. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000**;85(12):4734-41. doi:10.1210/jcem.85.12.7012. PMID: 11134136.

de Fraipont F, Le Moigne G, Defaye G, et al. Transcription profiling of benign and malignant adrenal tumors by cDNA macro-array analysis. *Endocr Res.* **2002**;28(4):785-6. doi:10.1081/erc-120017073. PMID: 12530698.

De Martino MC, van Koetsveld PM, Feelders RA, et al. IGF and mTOR pathway expression and in vitro effects of linsitinib and mTOR inhibitors in adrenocortical cancer. *Endocrine*. **2019**;64(3):673-84. doi:10.1007/s12020-019-01869-1. PMID: 30838516.

De Martino MC, van Koetsveld PM, Feelders RA, et al. The role of mTOR inhibitors in the inhibition of growth and cortisol secretion in human adrenocortical carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*. **2012**;19(3):351-64. doi:10.1530/ERC-11-0270. PMID: 22420007.

de Reyniès A, Assié G, Rickman DS, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*. **2009**;27(7):1108-15. doi:10.1200/JCO.2008.18.5678. PMID: 19139432.

de Wit MC, de Coo IF, Lequin MH, et al. Combined cardiological and neurological abnormalities due to filamin a gene mutation. *Clin Res Cardiol*. **2011**;100(1):45–50. doi:10.1007/s00392-010-0206-y. PMID: 20730588.

Egbert N, Elsayes KM, Azar S, et al. Computed tomography of adrenocortical carcinoma containing macroscopic fat. *Cancer Imaging*. **2010**;10(1):198-200. doi:10.1102/1470-7330.2010.0029. PMID: 21067996.

Else T, Kim AC, Sabolch A, et al. Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev*. **2014**;35(2):282-326. doi:10.1210/er.2013-1029. PMID: 24423978.

Erickson LA, Jin L, Sebo TJ, et al. Pathologica features and expression of insulin-like growth factor-2 in adrenocortical neoplasms. *Endocr Pathol*. **2001**;12(4):429-35. doi:10.1385/ep:12:4:429. PMID: 11949624.

Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **2015**;16(4):426-35. doi:10.1016/S1470-2045(15)70081-1. PMID: 25795408.

Fassnacht M, Dekkers OM, Else T, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* **2018**;179(4):G1-46. doi:10.1530/EJE-18-0608. PMID: 30299884.

Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, et al. German Adrenocortical Carcinoma Registry Group. European Network for the Study of Adrenal Tumors. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer.* **2009**;115(2):243-50. doi:10.1002/cncr.24030. PMID: 19025987.

Fassnacht M, Kenn W, Allolio B. Adrenal tumors: how to establish malignancy? *J Endocrinol Invest.* **2004**;27(4):387-99. doi:10.1007/BF03351068. PMID: 15233562.

Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, et al. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *PNAS.* **2006**;103(52):19836-41. doi:10.1073/pnas.0609628104. PMID: 17172441.

Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005**;90(2):615-9. doi:10.1210/jc.2004-0942. PMID: 15546904.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*. **2006**;43(1):91–6. doi:10.1136/jmg.2004.030551. PMID: 16033918.

Fiori JL, Zhu TN, O'Connell MP, et al. Filamin A modulates kinase activation and intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors in human melanoma cells. *Endocrinology*. **2009**;150(6):2551-60. doi:10.1210/en.2008-1344. PMID: 19213840.

Flynn SD, Murren JR, Kirby WM, et al. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in adrenocortical carcinoma. *Surgery*. **1992**;112(6):981-6. PMID: 1360713.

Fonseca AL, Kugelberg J, Starker LF, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. **2012**;51(10):949-60. doi:10.1002/gcc.21978. PMID: 22733721.

Fottner Ch, Hoeflich A, Wolf E, et al. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm Metab Res*. **2004**;36(6):397-405. doi:10.1055/s-2004-814563. PMID: 15241731.

Frasca F, Pandini G, Sciacca L, et al. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch Physiol Biochem*. **2008**;114(1):23-37. doi:10.1080/13813450801969715. PMID: 18465356.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat*. **2010**;31(2):143–50. doi:10.1002/humu.21151. PMID: 19877175.

Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, et al. β -catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res.* **2011**;17(2):328-36. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2006. PMID: 21088256.

Gicquel C, Bertagna X, Le Bouc Y. Recent advances in the pathogenesis of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol* **1995**;133(2):133-44. doi:10.1530/eje.0.1330133. PMID: 7655635.

Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and over expression of insulin-like growth factor II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **1994**;78(6):1444-53. doi:10.1210/jcem.78.6.7911125. PMID: 7911125.

Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997**;82(8):2559-65. doi:10.1210/jcem.82.8.4170. PMID: 9253334.

Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* **2003**;162(2):521-31. doi:10.1016/S0002-9440(10)63846-1. PMID: 12547710.

Girnita L, Worrall C, Takahashi SI, et al. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signalling regulation. *Cell Mol Life Sci.* **2014**;71(13):2403-27. doi:10.1007/s00018-013-1514-y. PMID: 24276851.

Guillaud-Bataille M, Ragazzon B, de Reyniès A, et al. IGF2 promotes growth of adrenocortical carcinoma cells, but its overexpression does not modify phenotypic and

molecular features of adrenocortical carcinoma. *PLoS One*. **2014**;9(8):e103744. doi:10.1371/journal.pone.0103744. PMID: 25089899.

Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, et al. [123 I]Iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes. *J Clin Endocrinol Metab*. **2008**;93(6):2358-65. doi:10.1210/jc.2008-0050. PMID: 18397978.

Hakuno F, Takahashi SI. IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. **2018**;61(1):T69-86. doi:10.1530/JME-17-0311. PMID: 29535161.

Han VK, Lu F, Bassett N, et al. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid is expressed in steroidogenic cells of the developing ovine adrenal gland: evidence of an autocrine/paracrine role for IGF-II. *Endocrinology*. **1992**;131(6):3100-09. doi:10.1210/endo.131.6.1446644. PMID: 1446644.

He HJ, Kole S, Kwon YK, et al. Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. **2003**;278(29):27096-104. doi:10.1074/jbc.M301003200. PMID: 12734206.

Heinz-Peer G, Honigschnabl S, Schneider B, et al. Characterization of adrenal masses using MR imaging with histopathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol*. **1999**;173(1):15-22. doi:10.2214/ajr.173.1.10397092. PMID: 10397092.

Hermsen IG, Haak HR, de Krijger RR, et al. Mutational analyses of epidermal growth factor receptor and downstream pathways in adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol*. **2013**;169(1):51-8. doi:10.1530/EJE-13-0093. PMID: 23585556.

Hernandez-Sanchez C, Mansilla A, de Pablo F, et al. Evolution of insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. *Mol Biol Evol.* **2008**;25(6):1043-53. doi:10.1093/molbev/msn036. PMID: 1831066.

Honigschnabl S, Gallo S, Niederle B, et al. How accurate is MR imaging in characterisation of adrenal masses: update of a long-term study. *Eur J Radiol.* **2002**;41(2):113-22. doi:10.1016/s0720-048x(01)00443-0. PMID: 11809540.

Houlihan SL, Lanctot AA, Guo Y, et al. Upregulation of neurovascular communication through filamin abrogation promotes ectopic periventricular neurogenesis. *Elife.* **2016**;5:17823. doi:10.7554/eLife.17823. PMID: 27664421.

Hubard SR. The Insulin Receptor: Both a Prototypical and Atypical Receptor Tyrosine Kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2013**;5:a008946. doi:10.1101/cshperspect.a008946. PMID: 23457259.

Iams WT, Lovly CM. Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade. *Clin Cancer Res.* **2015**;21(19):4270-77. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2518. PMID: 26429980.

Icard P, Goudet P, Charpenay C, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* **2001**;25(7):891-7. doi:10.1007/s00268-001-0047-y. PMID: 11572030.

Ilvesmaki V, Kahri A, Miettinen P, et al. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* **1993**;77(3):852-8. doi:10.1210/jcem.77.3.8370710. PMID: 8370710.

Johnson PT, Horton KM, Fishman EK. Adrenal mass imaging with multidetector CT: pathologic conditions, pearls, and pitfalls. *Radiographics*. **2009**;29(5):1333-51. doi:10.1148/rg.295095027. PMID: 19755599.

Jones RL, Kim ES, Nava-Parada P, et al. Phase I study of intermittent oral dosing of the insulin-like growth factor-1 and insulin receptors inhibitor OSI-906 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. **2015**;21(4):693-700. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0265. PMID: 25208878.

Jouinot A, Bertherat J. Diseases Predisposing to Adrenocortical Malignancy (Li-Fraumeni Syndrome, Beckwith-Wiedemann Syndrome, and Carney Complex). *Exp Suppl*. **2019**;111:149-69. doi:10.1007/978-3-030-25905-1_9. PMID: 31588532.

Kamio T, Shigematsu K, Kawai K, et al. Immunoreactivity and receptor expression of insulinlike growth factor I and insulin in human adrenal tumors. An immunohistochemical study of 94 cases. *Am J Pathol*. **1991**;138(1):83-91. PMID: 1702931.

Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Van der Zwan JM, et al. Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. *Eur J Cancer*. **2013**;49(11):2579-86. doi:10.1016/j.ejca.2013.02.034. PMID: 23561851.

Kolomecki K, Stepien H, Bartos M, et al. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. *Endocr Regul*. **2001**;35(1):9-16. PMID: 11308991.

Kołomecki K, Stepień H, Narebski JM. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor evaluation in blood serum of patients with hormonally active and inactive adrenal gland tumours. *Cytobios*. **2000**;101(396):55-64. PMID: 10697745.

Kotoula V, Sozopoulos E, Litsiou H, et al. Mutational analysis of the BRAF, RAS and EGFR genes in human adrenocortical carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. **2009**;16(2):565-72. doi:10.1677/ERC-08-0101. PMID: 19190079.

Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, et al. Mutations in the gene encoding filamin a as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*. **2007**;115(1):40–9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.622621. PMID: 17190868.

Lacroix A, Hammer GD. Treatment of adrenocortical carcinoma. Post TW, ed. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com>.

Lau J, Balk E, Rothberg M, et al. Management of clinically inapparent adrenal mass. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*. **2002**;(56):1-5. PMID: 12945556.

Leboulleux S, Dromain C, Bonniaud G, et al. Diagnostic and prognostic value of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in adrenocortical carcinoma: a prospective comparison with computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab*. **2006**;91(3):920-5. doi:10.1210/jc.2005-1540. PMID: 16368753.

Lerario AM, Worden FP, Ramm CA, et al. The combination of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) antibody cixutumumab and mitotane as a first-line therapy for patients with recurrent/metastatic adrenocortical carcinoma: a multi-institutional NCI-sponsored trial. *Horm Cancer*. **2014**;5(4):232-9. doi:10.1007/s12672-014-0182-1. PMID: 24849545.

Libe R, Groussin L, Tissier F, et al. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res.* **2007**;13(3):844-50. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2085. PMID: 17289876.

Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Front Cell Dev Biol.* **2015**;3:45. doi:10.3389/fcell.2015.00045. PMID: 26191527.

Libé R. Clinical and molecular prognostic factors in adrenocortical carcinoma. *Minerva Endocrinol.* **2019**;44(1):58-69. doi:10.23736/S0391-1977.18.02900-0. PMID: 30221891.

Liu J, Kahri AI, Heikkila P, et al. H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **1995**;80(2):492-6. doi:10.1210/jcem.80.2.7531713. PMID: 7531713.

Logié A, Boulle N, Gaston V, et al. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J Mol Endocrinol.* **1999**;23(1):23-32. doi:10.1677/jme.0.0230023. PMID: 10425444.

Martinerie C, Gicquel C, Louvel A, et al. Altered Expression of novH is Associated with Human Adrenocortical Tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* **2001**;86(8):3929-40. doi:10.1210/jcem.86.8.7718. PMID: 11502835.

Minsaas L, Planagumà J, Madziva M, et al. Filamin a binds to CCR2B and regulates its internalization. *PLoS One.* **2010**;5(8):e12212. doi:10.1371/journal.pone.0012212. PMID: 20808917.

Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other

hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*. **2004**;5(3):221-30. doi:10.1016/s1535-6108(04)00050-9. PMID: 15050914.

Moreno S, Guillermo M, Decoulx M, et al. Feminizing adreno-cortical carcinomas in male adults. A dire prognosis. Three cases in a series of 801 adrenalectomies and review of the literature. *Ann Endocrinol (Paris)*. **2006**;67(1):32-8. doi:10.1016/s0003-4266(06)72537-9. PMID: 16596055.

Moreno S, Montoya G, Armstrong J, et al. Profile and outcome of pure androgen-secreting adrenal tumors in women: experience of 21 cases. *Surgery*. **2004**;136(6):1192-8. doi:10.1016/j.surg.2004.06.046. PMID: 15657575.

Moutton S, Fergelot P, Naudion S, et al. Otopalatodigital spectrum disorders: refinement of the phenotypic and mutational spectrum. *J Hum Genet*. **2016**;61(8):693–9. doi:10.1038/jhg.2016.37. PMID: 27193221.

Naing A, Lorusso P, Fu S, et al. Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *Br J Cancer*. **2013**;108(4):826-30. doi:10.1038/bjc.2013.46. PMID: 23412108.

Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The Filamins: Organizers of Cell Structure and Function. *Cell Adh Migr*. **2011**;5(2):160-9. doi:10.4161/cam.5.2.14401. PMID: 21169733.

Nakamura M, Miki Y, Akahira J, et al. An analysis of potential surrogate markers of target-specific therapy in archival materials of adrenocortical carcinoma. *Endocr Pathol*. **2009**;20(1):17-23. doi:10.1007/s12022-009-9058-2. PMID: 19184558.

Nallapalli RK, Ibrahim MX, Zhou AX, et al. Targeting filamin A reduces K-RAS-induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice. *Molecular Cancer*. **2012**;11:50. doi:10.1186/1476-4598-11-50. PMID: 22857000.

Onoprishvili I, Andria ML, Kramer HK, et al. Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking. *Mol Pharmacol*. **2003**;64(5):1092-100. doi:10.1124/mol.64.5.1092. PMID: 14573758.

Papotti M, Libè R, Duregon E, et al. The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer*. **2011**;2(6):333-40. doi:10.1007/s12672-011-0088-0. PMID: 21997290.

Paragliola RM, Torino F, Papi G, et al. Role of Mitotane in Adrenocortical Carcinoma - Review and State of the art. *Eur Endocrinol*. **2018**;14(2):62-6. doi:10.17925/EE.2018.14.2.62. PMID: 30349596.

Peixoto Lira RC, Fedatto PF, Marco Antonio DS, et al. IGF2 and IGF1R in pediatric adrenocortical tumors: roles in metastasis and steroidogenesis. *Endocr Relat Cancer*. **2016**;23(6):481-93. doi:10.1530/ERC-15-0426. PMID: 27185872.

Penhoatt A, Rainey WE, Viard I, et al. Regulation of adrenal cell-differentiated functions by growth factors. *Hormone Research*. **1994**;42(1-2):39-43. doi:10.1159/000184143. PMID: 7959633.

Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, et al. Filamin A (FLNA) plays an essential role in somatostatin receptor 2 (SST2) signalling and stabilization after agonist stimulation in human and rat somatotroph tumor cells. *Endocrinology*. **2014**;155(8):2932-41. doi:10.1210/en.2014-1063. PMID: 24828612.

Peverelli E, Mantovani G, Vitali E, et al. Filamin-A is essential for dopamine d2 receptor expression and signalling in tumorous lactotrophs. *J Clin Endocrinol Metab.* **2012**;97(3):967-77. doi:10.1210/jc.2011-2902. PMID: 22259062.

Phan AT. Adrenal cortical carcinoma--review of current knowledge and treatment practices. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2007**;21(3):489-507; viii-ix. doi:10.1016/j.hoc.2007.04.007. PMID: 17548036.

Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer.* **2006**;42(8):1040-3. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.022. PMID: 16574405.

Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, et al. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer.* **2006**;47(1):56–60. doi:10.1002/pbc.20624. PMID: 16200634.

Pingle SR, Jalil F, Millar D, et al. Isolated DHEAS production by an adrenal neoplasm: Clinical, biochemical and pathologic characteristics. *Urol Case Rep.* **2020**;31:101148. doi:10.1016/j.eucr.2020.101148. PMID: 32195126.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* **2004**;48(5):647–50. doi:10.1590/s0004-27302004000500009. PMID: 15761534.

Pons M, Izquierdo I, Andreu-Carbó M, et al. Phosphorylation of filamin A regulates chemokine receptor CCR2 recycling. *J Cell Sci.* **2017**;130(2):490-501. doi:10.1242/jcs.193821. PMID: 27909248.

Puzanov I, Lindsay CR, Goff L, et al. A phase I study of continuous oral dosing of OSI-906, a dual inhibitor of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* **2015**;21(4):701-11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0303. PMID: 25212606.

Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, et al. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab.* **2008**;93(6):2057-62. doi:10.1210/jc.2007-2564. PMID: 18334586.

Ragazzon B, Libe R, Gaujoux S, et al. Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res.* **2010**;70(21):8276-81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2014. PMID: 20959480.

Rechache NS, Wang Y, Stevenson HS, et al. DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **2012**;97(6):E1004–13. doi:10.1210/jc.2011-3298. PMID: 22472567.

Reincke M, Karl M, Travis WH, et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* **1994**;78(3):790-4. doi:10.1210/jcem.78.3.8126158. PMID: 8126158.

Reincke M, Mora P, Beuschlein F, et al. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997**;82(9):3054-8. doi:10.1210/jcem.82.9.4211. PMID: 9284742.

Ribeiro RC, Sandrini Neto RS, Schell MJ, et al. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. *J Clin Oncol.* **1990**;8(1):67-74. doi:10.1200/JCO.1990.8.1.67. PMID: 2295912.

Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin a cause diverse malformations in humans. *Nat Genet.* **2003**;33(4):487–91. doi:10.1038/ng1119. PMID: 12612583.

Rosa JP, Raslova H, Bryckaert M. Filamin A: key actor in platelet biology. *Blood.* **2019**;134(16):1279-1288. doi:10.1182/blood.2019000014. PMID: 31471375.

Savoy RM, Ghosh PM. The dual role of filamin A in cancer: can't live with (too much of) it, can't live without it. *Endocr Relat Cancer.* **2013**;20(6):R341-56. doi:10.1530/ERC-13-0364. PMID: 24108109.

Sbiera S, Schmull S, Assie G, et al. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **2010**;95(10):E161-71. doi:10.1210/jc.2010-0653. PMID: 20660055.

Schneid H, Seurin D, Noguez P, et al. Abnormalities of insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) genes in human tumor tissue. *Growth Regulation* **1992**;2(1):45-54. PMID: 1362510.

Shao QQ, Zhang TP, Zhao WJ, et al. Filamin A: Insights into its Exact Role in Cancers. *Pathol Oncol Res.* **2016**;22(2):245-52. doi:10.1007/s12253-015-9980-1. PMID: 26341089.

Singh P, Soon PS, Feige JJ, et al. Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol.* **2012**;351(1):118-28. doi:10.1016/j.mce.2011.09.041. PMID: 21996374.

Soon PS (A), Gill AJ, Benn DE, et al. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer.* **2009**;16(2):573-83. doi:10.1677/ERC-08-0237. PMID: 19218281.

Soon PS (B), Tacon LJ, Gill AJ et al. miR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer. *Clin Cancer Res.* **2009**;15(24):7684-92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1587. PMID: 19996210.

Stossel TP, Hartwig JH. Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin Mg-2+-adenosine triphosphatase requires a cofactor for activation by actin. *Journal of Biological Chemistry.* **1975**;250(14):5706-12. PMID: 124735.

Sundin A. Imaging of adrenal masses with emphasis on adrenocortical tumors. *Theranostics.* **2012**;2(5):516-22. doi:10.7150/thno.3613. PMID: 22737189.

Szabó PM, Tamási V, Molnár V, et al. Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene.* **2010**;29(21):3163-72. doi:10.1038/onc.2010.80. PMID: 20305693.

Tatulian SA. Structural dynamics of insulin receptor and transmembrane signalling. *Biochemistry.* **2015**;54(36):5523-32. doi:10.1021/acs.biochem.5b00805. PMID: 26322622.

Tian HM, Liu XH, Han W, et al. Differential expression of filamin A and its clinical significance in breast cancer. *Oncol Lett.* **2013**;6(3):681-686. doi:10.3892/ol.2013.1454. PMID: 24137390.

Tissier F, Cavard C, Groussin L, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signalling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* **2005**;65(17):7622-7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0593. PMID: 16140927.

Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer.* **2009**;16(3):895-906. doi:10.1677/ERC-09-0096. PMID: 19546168.

Toretsky JA, Helman Lj. Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol.* **1996**;149(3):367-72. doi:10.1677/joe.0.1490367. PMID: 8691094.

Torti JF, Correa R. *Cancer, Adrenal.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2020. PMID: 31536189.

Treppiedi D, Jobin ML, Peverelli E, et al. Single-Molecule Microscopy Reveals Dynamic FLNA Interactions Governing SSTR2 Clustering and Internalization. *Endocrinology.* **2018**;159(8):2953-65. doi:10.1210/en.2018-00368. PMID: 29931263.

Treppiedi D, Mangili F, Giardino E, et al. Cytoskeleton Protein Filamin A Is Required for Efficient Somatostatin Receptor Type 2 Internalization and Recycling through Rab5 and Rab4 Sorting Endosomes in Tumor Somatotroph Cells. *Neuroendocrinology.* **2020**;110(7-8):642-52. doi:10.1159/000503791. PMID: 31574507.

Ullrich A, Gray A, Tam AW, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* **1986**;5(10):2503-2512. PMID: 2877871.

van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta.* **2001**;1538(2-3):99-117. PMID: 11336782.

van Nederveen FH & de Krijger RR. Precursor lesions of the adrenal gland. *Pathobiology.* **2007**;74(5):285–90. doi:10.1159/000105811. PMID: 17890895.

Vanbrabant T, Fassnacht M, Assie G, et al. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* **2018**;179(6):429-36. doi:10.1530/EJE-18-0450. PMID: 30325179.

Vella V, Milluzzo A, Scalisi NM, et al. Insulin Receptor Isoforms in Cancer. *Int J Mol Sci.* **2018**;19(11):3615. doi:10.3390/ijms19113615. PMID: 30453495.

Voutilainen R, Miller WL. Coordinate tropic hormone regulation of mRNA for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450ssc, in human steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1997**;84(6):1590-4. doi:10.1073/pnas.84.6.1590. PMID: 3031644.

Wagner J, Portwine C, Rabin K, et al. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst.* **1994**;86(22):1707-10. doi:10.1093/jnci/86.22.1707. PMID: 7966399.

Wang K, Zhu TN, Zhao RJ. Filamin A regulates EGFR/ERK/Akt signalling and affects colorectal cancer cell growth and migration. *Mol Med Rep.* **2019**;20(4):3671-8. doi:10.3892/mmr.2019.10622. PMID: 31485594.

Wang T, Rainey WE. Human Adrenocortical Carcinoma Cell Lines. *Mol Cell Endocrinol.* **2012**;351(1):58-65. doi:10.1016/j.mce.2011.08.041. PMID: 21924324.

Ward C, Lawrence M, Streltsov V, et al. Structural insights into ligand-induced activation of the insulin receptor. *Acta Physiol (Oxf).* **2008**;192(1):3-9. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01781.x. PMID: 18171424.

Weber MM, Fottner C, Engelhardt D. Adrenocortical and adrenomedullary cells. In: Bidley S (ed). *Endocrine cell culture.* Cambridge University Press. **1998**:5:74-93.

Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol.* **1989**;13(3):202-6. doi:10.1097/00000478-198903000-00004. PMID: 2919718.

Whittaker J, Groth AV, Mynarcik DC, et al. Alanin scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site. *J Biol Chem.* **2001**;276(47):43980-6. doi:10.1074/jbc.M102863200. PMID: 11500492.

Wilkin F, Gagné N, Pasquette J, et al. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000**;85(5):2048-56. doi:10.1210/jcem.85.5.6589. PMID: 10843195.

Xu L, Qi Y, Xu Y, et al. Co-inhibition of EGFR and IGF1R synergistically impacts therapeutically on adrenocortical carcinoma. *Oncotarget*. **2016**;7(24):36235-46. doi:10.18632/oncotarget.8827. PMID: 27105537.

Xu Y, Qi Y, Zhu Y, et al. Molecular markers and targeted therapies for adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **2014**;80(2):159-68. doi:10.1111/cen.12358. PMID: 24304415.

Xu YZ, Zhu Y, Shen ZJ, et al. Significance of heparanase-1 and vascular endothelial growth factor in adrenocortical carcinoma angiogenesis: potential for therapy. *Endocrine*. **2011**;40(3):445-51. doi:10.1007/s12020-011-9502-1. PMID: 21706269.

Zacharieva S, Atanassova I, Orbetzova M, et al. Circulating vascular endothelial growth factor and active renin concentrations and prostaglandin E2 urinary excretion in patients with adrenal tumours. *Eur J Endocrinol*. **2004**;150(3):345-9. doi:10.1530/eje.0.1500345. PMID: 15012620.

Zhang M, Breitwieser GE. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J Biol Chem*. **2005**;280(12):11140-6. doi:10.1074/jbc.M412242200. PMID: 15657061.

Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell*. **2016**; 29(5):723-736. doi:10.1016/j.ccell.2016.04.002. PMID: 27165744.