



Molecular pathways of human adrenocortical carcinoma — translating cell signalling knowledge into diagnostic and treatment options

Szlaki molekularne w raku kory nadnercza — od wiedzy o sygnalizacji komórkowej do metod diagnostyki i leczenia

Paulina Szyszka¹, Ashley B. Grossman², Salvador Diaz-Cano³, Krzysztof Sworczak⁴, Dorota Dworakowska^{1, 5, 6}

¹Department of Nuclear Medicine, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

²OCDEM, Churchill Hospital, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

³Department of Pathology, King's College Hospital, London, United Kingdom

⁴Department of Endocrinology and Medicine, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

⁵Department of Endocrinology and Medicine, King's College Hospital, London, United Kingdom

⁶Guys Richard Dimbleby Department of Cancer Research, King's College London, London, United Kingdom

Abstract

Adrenocortical carcinoma is associated with a low cure rate and a high recurrence rate. The prognosis is poor, and at diagnosis 30–40% of cases are already metastatic. The current therapeutic options (surgical resection, followed by adjuvant mitotane treatment +/– chemotherapy) are limited, and the results remain unsatisfactory.

Key molecular events that contribute to formation of adrenocortical cancer are *IGF2* overexpression, *TP53*-inactivating mutations, and constitutive activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway via activating mutations of the β-catenin gene.

The underlying genetic causes of inherited tumour syndromes have provided insights into molecular pathogenesis. The increased occurrence of adrenocortical tumours in Li-Fraumeni and Beckwith-Wiedemann syndromes, and Carney complex, has highlighted the roles of specific susceptibility genes: *TP53*, *IGF2*, and *PRKAR1A*, respectively. Further studies have confirmed that these genes are also involved in sporadic tumour cases. Crucially, transcriptome-wide studies have determined the differences between malignant and benign adrenocortical tumours, providing potential diagnostic tools.

In conclusion, enhancing our understanding of the molecular events of adrenocortical tumourigenesis, especially with regard to the signalling pathways that may be disrupted, will greatly contribute to improving a range of available diagnostic, prognostic, and treatment approaches. (*Endokrynol Pol* 2016; 67 (4): 427–440)

Key words: adrenocortical carcinoma; adrenal cortex neoplasms; molecular pathology; signal transduction pathways; hereditary neoplastic syndromes; molecular targeted therapy

Streszczenie

Rak kory nadnercza charakteryzuje się niską wyleczalnością i wysokim ryzykiem nawrotu. Rokowanie jest złe, a 30–40% przypadków okazuje się być przerzutami już przy diagnozie. Obecnie dostępne opcje terapeutyczne (chirurgiczna resekcja z następującym adjuwantowym leczeniem mitotanem, czasem połączonym z chemoterapią) są ograniczone, a ich wyniki są mało satysfakcyjne.

Kluczowe zmiany molekularne przyczyniające się do rozwoju raka kory nadnercza to nadekspresja *IGF2*, mutacje inaktywujące *TP53* oraz konstytutywna aktywacja szkłaku sygnalowego Wnt/β-katentyna poprzez mutacje aktywujące gen β-katentyny.

Genetyczne przyczyny leżące u podstaw dziedzicznych zespołów nowotworowych dostarczyły wgląd w ich patogenezę molekularną. Zespoły: Li-Fraumeni, Beckwitha-Wiedemanna oraz Carneya, charakteryzujące się zwiększoną predyspozycją do nowotworów kory nadnercza, uwidocznili określone geny podatności, odpowiednio: *TP53*, *IGF2* oraz *PRKAR1A*. Dalsze badania potwierdziły udział tych genów także w nowotworach sporadycznych. Co istotne, badania transkryptomu wykazały istotne różnice między nowotworami złośliwymi i łagodnymi, dostarczając potencjalnych opcji diagnostycznych.

Podsumowując, wzbogacenie wiedzy na temat molekularnych podstaw, a szczególnie szlaków sygnalowych, które mogą być zaburzone w procesie nowotworzenia w obrębie kory nadnercza znacznie przyczyni się poprawieniu możliwości diagnostycznych, rokowniczych oraz leczniczych. (*Endokrynol Pol* 2016; 67 (4): 427–440)

Słowa kluczowe: rak kory nadnercza; nowotwory kory nadnercza; patologia molekularna; szlaki transdukcji sygnałów; zespoły nowotworowe dziedziczne; terapia celowana molekularnie

Introduction

Adrenocortical tumours (ACTs) are relatively common tumours, the prevalence of which tends to increase

with patient age. Adrenal incidentalomas are found in approximately 4% of CT scans and in 6% of autopsies, but this is probably still an underestimate. Although the majority of ACTs are non-functional adrenocorti-

cal adenomas (ACAs), there are cases of functional adenomas associated with hypercortisolaemia and/or hyperaldosteronism [1, 2]. On the other hand, the malignant form, adrenocortical carcinoma (ACC), occurs rarely, with an annual incidence of 0.5–2 per million population [3] and 0.3 per million for children younger than 15 years [4]. ACC generally presents either during childhood (prior to the age of five years) or during the fourth and fifth decade, being more common in women than in men [1, 5].

The histopathological diagnosis of ACC has been controversial, and several scoring systems have been proposed to establish a reliable diagnosis [6–9]. The Weiss system has been the most frequently used since 1984 [10]. It is based on histological analysis and is valued for its simplicity and ease of use. Still, there arises a clinical requisite for a reliable classification of a tumour to either benign or malignant group in order to discern the possible metastatic conditions as soon as possible.

The prognosis of adrenocortical cancer is very poor, with an overall five-year survival rate of less than 35%. The majority of patients at diagnosis present with advanced but localised disease, which is limited to adrenal glands and qualifies for surgical removal. Nevertheless, around 30–40% of ACCs have clear evidence of metastasis at clinical presentation, and the available systematic treatments rarely yield a complete remission [11, 12].

The first-line therapeutic approach for ACC is a complete surgical resection of the tumour; however, it does not guarantee full recovery; post-surgery recurrence occurs in around 70–80% of cases [13]. In order to improve the prognosis, the administration of mitotane is recommended, alone or in combination with cytotoxic chemotherapy. Mitotane is considered the first-line adjuvant therapy, improving recurrence-free survival, but at best 24% of the patients show an objective tumour response [11, 14, 15]. As this therapeutic strategy remains unsatisfactory, there is a requirement for new therapeutic options for ACC that would improve survival rates and decrease recurrences.

Most ACCs are sporadic; however, the literature provides numerous reports of familial syndromes associated with an increased prevalence of ACC, such as Li-Fraumeni or Beckwith-Wiedemann syndromes, which have characteristic genetic alterations [16]. Likewise, ACC has been intensively studied from the molecular perspective, offering insights into the molecular basis of this cancer [17–24].

In this article, we review the molecular alterations that may play a role in adrenocortical carcinogenesis, and we have attempted to define the interactions between the involved genes, proteins and signalling pathways, and diagnostic and treatment options.

Molecular pathology of adrenocortical carcinoma

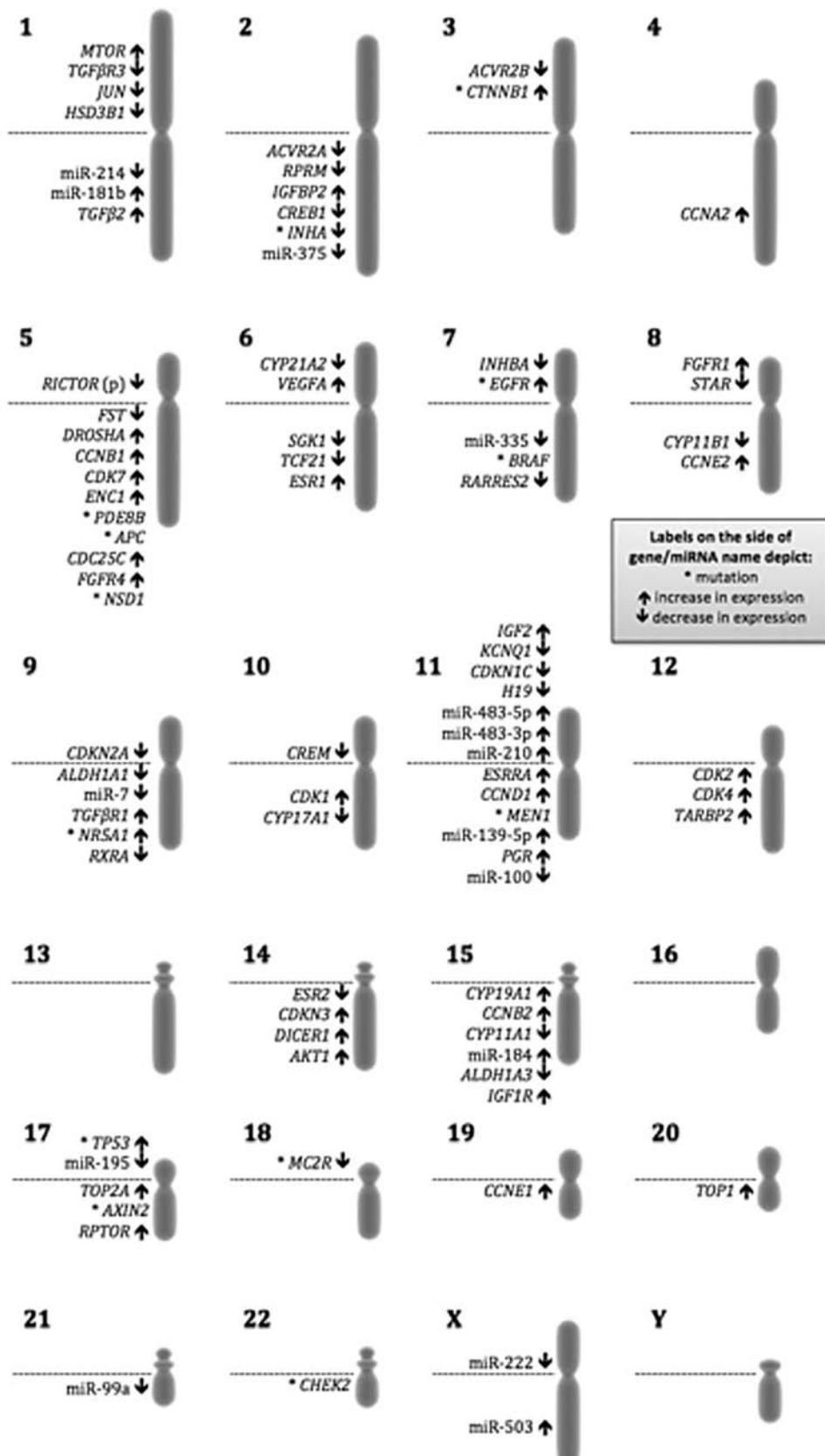
Our knowledge of the molecular events underlying adrenocortical carcinoma has improved in recent years, but still the precise mechanisms and interactions between various contributing factors need to be elucidated. High-throughput gene expression assays based on transcriptomes, which enable the study of a large number of genes in a single experiment, have revealed distinct profiles for benign and malignant adrenocortical tumours, offering a new diagnostic tool and possibly improved treatment [17–24]. The mean number of genetic alterations was reported to be considerably higher for carcinomas than for adenomas [17, 18, 20, 25]. The alterations occurring in ACCs include changes in expression, mutations, copy-number variations, and loss of heterozygosity (LOH); they span the whole genome (Fig. 1) and are associated with multiple cellular processes.

Among the most frequent molecular events playing crucial roles in the formation of malignant adrenocortical lesions are: *IGF2* (insulin-like growth factor) over-expression, *TP53*-inactivating mutations (p53 protein), and constitutive activation of Wnt/β-catenin signalling pathway via activating mutations of the β-catenin gene (*CTNNB1*). Alterations in protein kinase A (PKA) and steroidogenic factor 1 (SF-1) are also involved in adrenocortical carcinogenesis. Recent studies have revealed that these cannot be treated as the only drivers of malignant adrenocortical tumourigenesis, but as secondary contributors, and other accompanying factors may also play a role [26, 27]. The types of mutations observed in sporadic ACCs are very similar to that of inherited tumours (see next section), with missense changes being the most common.

Insulin-like growth factor 2 pathway

Insulin-like growth factor 2 (IGF2) exerts its function through binding to the membrane tyrosine kinase receptor (TKR), IGF1R. After the ligand is bound, the receptor autophosphorylates and the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) is recruited [28]. Tyrosine phosphorylation of IRS-1 activates the downstream signalling of pathways, such as PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK.

The genetic alterations at the 11p15.5 locus in sporadic ACCs primarily include: rearrangements, LOH, paternal isodisomy, and abnormal imprinting. These events result in a decrease in p57^{kip2} and H19, and an increase in IGF2 mRNA levels, which have been correlated with a worse prognosis and higher risk for ACC recurrence [29, 30]. However, the most frequent transcrip-

**Figure 1.** Molecular alterations characteristic for adrenocortical carcinoma.

It is indicated within which arm of the respective chromosomes (upper p or lower q) the genes/miRNAs are located. Labels on the side of gene/miRNA name depict: asterisk — mutation, up arrow — increase in expression, down arrow — decrease in expression. Chromosome illustrations sourced from Somersault 18:24 — Library of Science Illustrations (www.somersault1824.com).

tional change in ACC, occurring in over 80% of cases, is over-expression of the *IGF2* gene [21, 24, 26, 31–36]. Later referred to as “the adrenal-specific malignancy signature”, as it is characteristic of ACC, but not ACA or the normal adrenal gland, this molecular alteration was initially studied in association with Beckwith-Wiedemann syndrome (see next section). The *IGF2* cluster is a group of related genes that also show elevated expression in ACC and includes predominantly genes for growth factors and their receptors [18, 37]. The *IGF2* cluster also contains a gene for insulin-like growth factor-binding protein 2 (*IGFBP2*), acting as a carrier protein for *IGF2*; its expression and plasma level have been correlated with tumour mass in ACC [38]. For paediatric tumours, *IGF2* levels are similar in adenomas and carcinomas. However, the difference lies in *IGF1R* gene expression, which seems to be the prime indicator of malignant adrenocortical tumours in children [39, 40].

TP53 signalling pathway

The alterations within *TP53* gene in ACCs occur mainly within exon 5, the ‘hot spot’, but exons 6, 7, 8, and 10 are also affected [41, 42]. *TP53* mutations occur side by side with p53 accumulation, as revealed by immunohistochemistry [43]. Somatic inactivating *TP53* mutations are among the most frequently reported in ACC, estimated to occur in 15–70% of cases [19, 44–46] and correlating with larger size, more advanced stage, higher metastatic rate, and shorter disease-free survival [43, 47].

Wnt/β-catenin signalling pathway

The Wnt/β-catenin cascade regulates proliferation, differentiation, survival, and apoptosis, with overlapping actions in a range of pathways, such as: TP53, TGF β , PI3K/Akt/mTOR, and Ras/Raf/MEK/ERK. In the adrenal cortex, the Wnt/β-catenin cascade is involved in adrenal development and differentiation [48, 49]. Abnormal functioning of this system may lead to adrenal tumorigenesis. The most pronounced underlying molecular implications include abnormal cytoplasmic and nuclear accumulation of β-catenin as well as somatic activating mutations of the β-catenin gene (*CTNNB1*). These events occur almost exclusively in ACCs with poor prognosis [19, 46, 50, 51]. Another target for the Wnt/β-catenin pathway, ectodermal-neural cortex protein 1 (ENC1), is up-regulated in adrenocortical carcinomas [52]. Recently, in ACA and ACC samples, an in-frame 12-bp deletion has been found in the *AXIN2* gene, a negative regulator of Wnt/β-catenin signalling [53].

cAMP/PKA pathway

Modifications in the protein kinase A (PKA) R1A subunit, the core of the cAMP pathway, occur repeatedly

among Carney complex patients (see next section). Bertherat et al. have shown that losses of 17q23-q24 loci are frequent in adrenocortical tumours, with a higher frequency in carcinomas than in adenomas. However, *PRKAR1A* gene mutations were detected in ACAs but not ACCs, suggesting a different role of PKA in tumorigenesis in benign and malignant lesions [54]. Consistently, defective R2B subunit (*PRKAR2B* gene, 7q22.3) expression is present in secreting adenomas with no change in secreting carcinomas and non-secreting adenomas [55]. Loss of the R1A subunit was reported to increase mTOR signalling [56]. The cAMP-dependent ACTH/G/PKA cascade plays a key role in regulating glucocorticoid and androgen production. Genetic modifications or expression changes of cAMP pathway genes associated with altered secretion and formation of adrenocortical carcinomas include:

- decreased expression and LOH of the ACTH receptor [57];
- genetic defects in *PDE8B* gene (phosphodiesterase 8B) [58];
- decreased expression of cAMP-responsive element binding protein (CREB) [59, 60];
- higher telomerase activity [60];
- decreased expression of ICER (inducible cAMP early repressor) isoforms, derived from an internal promoter of *CREM* gene (for cAMP responsive element modulator) [60].

Opposite changes are reported in ACA, suggesting that such changes may be indicators of malignancy. However, most of these alterations are associated with Cushing’s syndrome, which suggests that altered functioning of cAMP signalling is strongly correlated with that specific type of tumour of the adrenal cortex.

Steroidogenic pathway

Nuclear receptor steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1) acts as a master regulator of adrenocortical differentiation and steroidogenesis by controlling the expression of cytochrome P450 steroidogenic enzymes. SF-1 is involved in the proliferation, apoptosis, angiogenesis, adhesion, and cytoskeleton dynamics of adrenocortical cells [61, 62]. High levels of SF-1 were reported to increase the proliferation rate of adrenocortical cells and to decrease the secretion of cortisol and aldosterone, with no effect on dehydroepiandrosterone (DHEA). Multiple copies of *SF-1* (NR5A1) gene stimulate tumour development [63]. A study focusing on the SF-1 inhibitor, Pod-1 (capsulin, epicardin, Tcf21), established that the *TCF21* gene is down-regulated in ACCs, compared with ACAs and normal tissue [64]. SF-1 over-expression is much more significant in childhood than in adult ACTs. In the majority of paediatric tumours the number of *SF-1* gene copies is increased as a result of chromo-

some gain or amplification at 9q33 [65–67]. SF-1 also shows prognostic information: higher expression correlates with more advanced tumour stage, poorer clinical outcome, and shorter overall survival [68, 69].

Another factor involved in steroidogenesis is ACTH (adrenocorticotrophic hormone, corticotrophin); it plays a key role in the maximal cell-specific expression of steroidogenic enzymes needed for the synthesis of glucocorticoids and androgens in the zona reticularis and zona fasciculata. It acts through receptors coupled to G_s protein, increasing the levels of cAMP and thus inducing PKA, which in turn stimulates the expression of P450 steroidogenic enzymes. Generally, the ACTH/G_s/PKA cascade is crucial for maintaining a highly differentiated adrenal phenotype, but is only of moderate importance for cell proliferation [70, 71]. Adrenocortical carcinomas show decreased expression levels and LOH of the *ACTH-R* gene encoding the corticotrophin receptor [57, 60].

A cluster of steroidogenesis genes also differentiates ACC from ACA and contains: *CYP11A1* (cytochrome P450scc, cholesterol desmolase), *CYP11B1* (P450c11B1, 11 β -hydroxylase), *CYP17A1* (P450c17, 17 α -hydroxylase), *CYP21A2* (P450c21, 21-hydroxylase), *HSD3B1* (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ -5-4 isomerase type), and *STAR* (StAR, steroidogenic acute regulatory protein). In contrast to IGF2 cluster expression, this steroidogenesis cluster shows low expression in adrenocortical carcinomas and is high in adenomas. This is in line with glucocorticoid overproduction in ACAs [37]. The link between IGF2 and steroidogenesis pathways is observed particularly during adrenal development and differentiation. IGF2 stimulates expression of ACTH-regulated steroidogenic enzymes, such as P450scc, P450c17, and HSD3B1 [29]. Recent studies also indicate connections with TGF β and Wnt/ β -catenin signalling. However, the precise mechanisms of that interrelation are yet to be identified [62, 72]. The suggested explanation indicates the involvement of a downstream target for Wnt/ β -catenin signalling pathways, SGK1, serum and glucocorticoid-regulated kinase 1, which has been reported to show lower expression in adrenocortical carcinomas. SGK1 is a serine/threonine kinase that may be regulated by a number of factors, including corticosteroid hormones, growth factors, p53, and mTORC2 [73].

Other growth factors and their receptors

As well as IGF2, several other growth factors play a role in adrenocortical tumourigenesis, indicating cell signalling network interconnections. The mTOR upstream factors involved in ACC development include vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), and IGF2; additionally, mTOR

may modulate IGF2 and VEGF expression, acting as its stimulator [74]. As one of the major angiogenesis agents in solid tumours, VEGF showed highest levels in carcinomas among various adrenal neoplasm types [75–77]. Increased VEGF concentration is highly correlated with IGF2 over-expression, in line with its autocrine/paracrine regulation of tumour cell growth [77].

Likewise, epidermal growth factor receptor (EGFR) shows elevated levels in adrenocortical carcinomas [78–81]. EGFR is a potential malignancy marker, as its expression is significantly higher in carcinomas than in adenomas. The EGF receptor belongs to the ErbB family of TKRs and is involved in cell proliferation and survival. Downstream signalling pathways include Ras/Raf/MEK and STAT cascades [81]. Kotoula et al. performed a study focused on mutations in the *EGFR* gene, which were detected in its TK domain in relatively small numbers (11%) of carcinomas [82].

Fibroblast growth factor receptors (FGFR1 and FGFR4) may serve as malignancy markers, as their concentration is markedly higher in ACCs than in ACAs and normal tissue [33, 37, 46, 52, 83–85]. They reveal interactions with IGF2 (suppression by basic FGF2) and *NRAS*, an immediate downstream target for FGFR signalling. FGFR1 and FGFR4 belong to the IGF2 cluster genes, their over-expression correlating directly with IGF2 [33].

Transforming growth factors α (TGF α) and β (TGF β 1 and TGF β 2) are produced in normal adrenocortical cells to control steroidogenesis by inhibiting the expression of *STAR* (for steroidogenic acute regulatory protein), *CYP17A1*, and other genes [79, 86]. These two growth factors share the same receptors, type 1 and 2. Their over-expression in ACCs, but not in ACAs, was observed for *TGF β 2* and *TGF β R1* genes, suggesting their possible use as markers of malignancy. Conversely, the expression of *TGF β R3* (encoding beta glycan, transforming growth factor β receptor 3) is markedly higher in adenomas when compared with carcinomas. *TGF β 2* and *TGF β R1* belong to the IGF2 cluster, while *TGF β R3* is part of the steroidogenesis cluster [37].

In the TGF β superfamily, activins and inhibins are closely related protein complexes with a structure based on collective elements, but exerting almost opposite effects. Inhibin is composed of an α -subunit and a β -subunit that has two variants, β A and β B, and is expressed only by ovary, testis, placenta, and adrenal cortex, i.e. steroidogenic tissues. Activin comprises two β subunits (β A, β B, β C, β E), shows more generalised presence in tissues, has an inhibitory effect on adrenocortical cell growth and steroid production, but stimulate apoptosis in the adrenal foetal zone. The role of inhibins is indirect regulation of steroid production via blockade of the binding between activins and their

receptors [87]. The profiles of expression of *INHA* (inhibin α -subunit), *INHBA* (inhibin β A-subunit), *ACVR2A* (activin type IIA receptor), *ACVR2B* (activin type IIB receptor), and *FST* (follistatin, activin-binding protein) seem to be similar to that of *TGF β R3*, being lower in ACCs and higher in ACAs [37, 88]. However, most ACTs are positive for *INHA* expression, making it a possible marker for distinguishing them from non-adrenocortical tumours. ACTs characterised by sporadic chromosomal losses in *INHA* gene are predominant among childhood neoplasms [89].

Cell cycle

Proteins involved in G1/S transition that are over-expressed in adrenocortical carcinomas include: cyclins D1 (*CCND1* gene), E1 (*CCNE1*), and E2 (*CCNE2*), cyclin-dependent kinases 1 (*CDK1*, previously *CDC2*), 2 (*CDK2*), and 4 (*CDK4*), as well as cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) (*CDKN3*) [21, 46, 52, 90–93]. Among G2/M proteins, over-expression was described for cyclins A2 (*CCNA2*), B1 (*CCNB1*), and B2 (*CCNB2*), cyclin-dependent kinases 1 (*CDK1*) and 7 (*CDK7*), cell division cycle 25 homologue C (*CDC25C*), and DNA topoisomerases I (*TOP1*), and II α (*TOP2A*) [21, 52, 90–92, 94]. Compared with ACA and controls, ACC also reveal decreased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors 1C (p57, Kip2) (*CDKN1C*) [33, 52, 93] and 2A (p16) (*CDKN2A*) [37, 46], as well as the jun proto-oncogene (*JUN*) [91] and reproto, TP53-dependent G2 arrest mediator candidate (*RPRM*) [90]. Proteins p57, p16, and jun are involved in G1/S phases, while reproto acts in G2/M.

MicroRNAs

MicroRNAs are small, 20–22 nucleotides in length, non-coding RNAs that act at a transcript level, regulating gene expression in a sequence-specific manner; they are deregulated in many types of cancer, indicating their role in tumourigenesis [95]. One of the most extensively studied miRNAs is hsa-miR-483-5p. It is up-regulated in ACCs in comparison with ACAs and normal tissue, and is associated with a poorer prognosis [96–98]. miR-483-5p lies at the 11p15.5 locus within the most frequently over-expressed gene in ACCs, namely *IGF2* [97]. Therefore, the level of miR-483-5p may be used as an indicator of the level of *IGF2* in ACTs, and it enables straightforward patient assignment for treatment and clinical trials aiming for *IGF2*-related signalling pathways. Another microRNA is expressed from the same intron 2 of *IGF2* gene, but it originates from the 3' arm of the precursor miR-483 and, consequently, was named hsa-miR-483-3p and revealed similar changes in ACC [97, 98]. In childhood adrenocortical tumours, over-expression of miR-483-3p, but not miR-483-5p, has been reported [99].

Other microRNAs over-expressed in ACCs include hsa-miR-139-5p (11q13.4), hsa-miR-181b (1q32.1), hsa-miR-184 (15q25.1), hsa-miR-210 (11p15.5), and hsa-miR-503 (Xq26.3) [90, 96, 98, 99]. Conversely, a number of miRNAs are under-expressed in ACC; these include hsa-miR-7 (9q21.32), has-miR-99a (21q21.1)/hsa-miR-100 (11q24.1), hsa-miR-195 (17p13.1), hsa-miR-214 (1q24.3), hsa-miR-222 (Xp11.3), hsa-miR-335 (7q32.2), and hsa-miR-375 (2q35) [90, 96–100]. The activity of microRNAs may influence a number of cell-signalling cascades. For example, miR-184, miR-7, miR-99a, and miR-100 regulate at multiple levels the PI3K/Akt/mTOR pathway, while miR-335 and miR-375 have an impact on the Wnt signalling. Furthermore, miR-503 and miR-195 are involved in the regulation of the cell cycle G1/S transition [95, 99]. A recent study by Caramuta et al. was the first to investigate the components of the microRNA biogenesis pathway. The results uncovered a set of genes shown to have higher expression in ACC than in ACA and controls: *TARBP2* (TAR RNA binding protein 2), *DICER1* (dicer 1, ribonuclease type III), and *DROSHA* (drosha, ribonuclease type III), key factors in miRNA processing [101].

Steroid hormone receptors

Sex steroids (oestrogens and androgens) have been reported to be crucial in the aetiology and development of endocrine-related malignancies of breast, ovary, and prostate [102]. Symptomatically, androgen-secreting ACCs cause virilisation in women, while oestrogen-secreting ACCs result in male feminisation [3]. Oestrogens may stimulate proliferation in adrenal cortex via autocrine/paracrine mechanisms; higher levels of the oestrogen receptor-1 (*ESR1*, *Era*) are reported in ACCs, with the opposite effect for the oestrogen receptor-2 (*ESR2*, *Erb*). As a result, adrenocortical carcinomas show an elevated ER1/ER2 ($ER\alpha/ER\beta$) ratio [102]. Another study has associated the increase in this ratio with raised expression of a receptor for another sex hormone: progesterone (*PGR*) [103]. Moreover, the nuclear hormone receptor, namely oestrogen-related receptor- α (*ESRRA*, or *ERR α*), shows elevated concentrations in ACCs compared with normal tissue and other adrenocortical tumours [104]. Furthermore, ACCs reveal an increase in expression of aromatase (*CYP19A1*), the enzyme synthesising oestrogen [102].

Retinoic acid pathway

Retinoids are generally involved in proliferation, differentiation, and apoptosis. A number of studies report the decreased expression in ACCs of retinoid X receptor- α (*RXRA*), retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 (*RARRES2*), and aldehyde dehydrogenase 1 family, members A1 and A3 (*ALDH1A1* and *ALDH1A3*) [21, 31, 32, 52, 83, 85, 90, 92, 94].

Table I. Genes involved in genetic/familial syndromes associated with adrenocortical tumours

Familial Syndrome	ACA/ACC	Locus	Gene	Protein
Li-Fraumeni Syndrome 1 (LFS1)	ACC	17p13.1	<i>TP53</i>	Tumour protein p53
Li-Fraumeni Syndrome 2 (LFS2)	—	22q12.1	<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2
Li-Fraumeni Syndrome 3 (LFS3)	—	1q23	(not known yet)	
Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS)	ACA, ACC	5q35.2-q35.3	<i>NSD1</i>	Nuclear receptor binding SET domain protein 1
		11p15.5	<i>H19</i>	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
		11p15.5	<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor II
		11p15.5	<i>KCNQ1OT1</i>	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1 (non-protein coding)
		11p15.4	<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
Multiple Endocrine Neoplasia, Type 1 (MEN1)	ACA/(rare ACC)	11q13.1	<i>MEN1</i>	Menin
Familial Adenomatous Polyposis-1 (FAP1) and its variant Gardner Syndrome	ACA/(rare ACC)	5q22.2	<i>APC</i>	APC
Carney complex, Type 1 (CNC1)	ACA	17q24.2	<i>PRKAR1A</i>	Regulatory subunit of protein kinase, cAMP-dependent, type I, alpha
Carney complex, Type 2 (CNC2)	ACA	2p16	(not known yet)	
McCune-Albright Syndrome (MAS)	ACA	20q13.32	<i>GNAS</i>	G _s -alpha (the alpha subunit of the guanine nucleotide-binding protein [G protein])

ACA — adrenocortical adenoma, ACC — adrenocortical carcinoma. Prepared based on [16, 106, 121, 183]

Genetic/familial syndromes

In the majority of cases familial cancer syndromes originate from a specific underlying molecular profile with germline mutations, which may be as simple as a point mutation, but more often are complex alterations affecting multiple genes and molecular pathways [38]. Adrenocortical tumours occur in the course of a number of familial disorders, such as: Li-Fraumeni syndrome (LFS), Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS), Carney complex (CNC), multiple endocrine neoplasia (MEN1), McCune–Albright syndrome (MAS), and familial adenomatous polyposis coli (FAP) with its variant Gardner syndrome (familial colorectal polyposis) – which are summarised in Table I [105, 106]. The focus of this review is the adrenocortical carcinoma, and consequently the syndromes characterised by increased prevalence of this kind of cancer are described in detail.

Li-Fraumeni syndrome

Inherited in an autosomal dominant manner, Li-Fraumeni syndrome (OMIM 151623) is characterised by multiple types of early onset non-site specific neoplasms, occurring in patients younger than 45 years. The most prevalent are pre-menopausal breast cancer, soft-tissue sarcoma, brain tumours, osteosarcoma, adrenocortical carcinoma, and lung carcinoma, with leukaemia as the least frequent neoplasm of this group (data obtained from IARC TP53 Database) [42, 107, 108].

ACC develops in less than 10% of LFS-patients and, compared with the other neoplasms mentioned, is diagnosed in the youngest patients in early childhood [41, 42, 109].

Most patients with Li-Fraumeni (LFS) or Li-Fraumeni-like (LFL) syndromes carry heterozygous mutations in the *TP53* gene (17p13.1), encoding the p53 tumour suppressor protein, also called the ‘guardian of the genome’. The p53 transcription factor acts by activating the expression of genes involved in: cell cycle control, arrest in G1 phase in case of DNA damage (maintenance of genomic stability), and apoptosis [110]. There is much variation in the reported incidence of mutations in the *TP53* gene in LFS/LFL patients — being around 80% and 40%, respectively [111], or almost 30% as a combined value for both syndromes [112]. For all familial tumour cases in general, up to 17% are reported to be the effect of alterations in the *TP53* gene [109]. It is worth noting that, in line with the Chompret criteria for LFS, every single patient with ACC, regardless of their age at diagnosis or family history, demonstrates a high probability (usually 50-80%) of having a germline mutation in *TP53* [109, 113]. According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), LFS-related mutations concentrate in *TP53* in exons 5–8 (around 80–90%) and then in exons 4 and 10 (below 10% altogether), most of them being missense (almost 70%), followed by splicing (10%), nonsense (9%), and frame-shift (7%) changes [42].

Two main functions of p53 are affected by alterations in those regions: the DNA contact via DNA binding domain (DBD) and the support of the structure of protein-DNA contact surface, obtained by two large loops (L2 and L3), stabilised by zinc binding and a loop-sheet-helix motif (loop L1). Consequently, the mutant proteins are divided into two groups: "contact" (results of mutations, such as S241F, R248W, and C277F) and "structural" (R175H, C176E, H179R, and C242F). Other suggested mechanisms for altered p53 functioning include: gain-of-function (GOF) and dominant-negative effects (DNE) over the wild-type protein, when no selective pressure is exerted for the loss of the wild-type allele [113, 114].

Studies of individuals from Southern Brazil with family history compliant with the clinical definitions of LFS or LFL syndrome have shown that around 13% of them are carriers of the c.1010G > A (p.R337H) mutation in exon 10 of *TP53* gene [112]. Despite the previous alternative theories, a recent study has confirmed that the high prevalence of this mutation, around 0.3% in the population of this region, results from the occurrence of a founder effect in the Brazilian population. In Southern Brazil the incidence of childhood ACC is 10–15 higher compared with other parts of the world, being strongly associated with the p.R337H mutation [115–117].

A small number of the families afflicted with LFS carry a mutation in another gene — *CHEK2* (22q12.1); this has led to its renaming as Li-Fraumeni Syndrome 2 (LFS2) (OMIM 609265) [41, 118]. There is also the LFS3 (OMIM 609266), associated with the region 1q23, which requires further investigation [118, 119].

Beckwith-Wiedemann syndrome

Beckwith-Wiedemann syndrome (OMIM 130650) is a rare imprinting disorder, mostly sporadic with familial cases representing less than 15% of cases. This paediatric syndrome is predominantly characterised by anterior abdominal wall defects, macroglossia, and overgrowth. Around 10% of Beckwith-Wiedemann cases are associated with an increased risk of tumour development, the most frequent being Wilms tumours, hepatoblastomas, rhabdomyosarcomas, and adrenocortical tumours [120, 121]. Genetically, Beckwith-Wiedemann syndrome is caused by altered expression of imprinted genes in the region 11p15.4–p15.5. The telomeric domain (called imprinting centre 1, IC1 or differentially methylated region 1, DMR1) contains *IGF2* and *H19* genes. The centromeric domain 2 (IC2, DMR2) comprises around 10 imprinted genes, encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C gene, *CDKN1C* or *p57kip2*), a subunit of a potassium voltage-gated channel (*KCNQ1*), and its overlapping transcript (*KCNQ1OT1* or *LIT1*) [120, 122].

The majority of BWS-related genetic defects are due to the loss of imprinting, caused by abnormal methylation in the IC2, whilst most familial cases are associated with alterations in *CDKN1C* gene or microdeletions along IC1, presenting an autosomal dominant pattern of inheritance [121, 123]. Another gene implicated in the development of Beckwith-Wiedemann syndrome is *NSD1* (5q35.2–q35.3). Baujat et al. described its mutations in a small number of BWS patients and suggested the possible influence of the product of this gene, the nuclear receptor binding SET domain protein 1, on the imprinting in the 11p15 region. It acts also as a co-regulator of the androgen receptor [124].

Multiple endocrine neoplasia type 1

Multiple endocrine neoplasia type 1 (OMIM 131100) is a highly penetrant, autosomal dominant condition, presenting with tumours of the parathyroid glands, endocrine pancreas, anterior pituitary gland, thymus (carcinoids), thyroid (adenomas), and, in up to 40% of patients, adrenocortical neoplasm or hyperplasia. ACCs occur but are extremely rare. The majority of affected families (75–95%) have a heterozygous inactivating germline mutation in the *MEN1* gene (11q13.1) [125, 126], but major deletions are also seen. The menin protein is a tissue-specific tumour suppressor and has been reported to interact with a variety of proteins such as: transcriptional factors (e.g. Jun D, NF κ B and Smad3) or histone H3 methyltransferases (e.g. MLL, MLL2) [127]. Consequently, its field of action is the regulation of cell cycle, proliferation, and apoptosis [128]. The impact of menin on cellular growth seems to be quite complex, as it acts as a suppressor in endocrine cells and as an activator in certain types of leukaemia cells [127].

Familial adenomatous polyposis 1

Familial adenomatous polyposis (FAP) 1 and its variant Gardner syndrome (OMIM 175100) are autosomal dominant disorders. In its typical form, FAP manifests as hundreds to thousands of colorectal adenomatous polyps and cancer [129], while Gardner syndrome reveals gastrointestinal polyposis and other lesions, such as osteomas, epidermoid cysts, hepatoblastoma, papillary or follicular thyroid cancer, and adrenal adenomas [130]. The molecular cause underlying these syndromes is found at the locus 5q22.2, containing the adenomatous polyposis coli (APC) gene, which acts as a tumour suppressor by decreasing the activity of β -catenin. In the absence of the regulating effect of APC, nuclear β -catenin accumulation leads to up-regulation of genes involved in the cell cycle entry and progression. The pathogenic alterations in APC gene are mainly frame-shift or nonsense mutations, then large gene deletions

and splice site changes [129]. It was observed that FAP patients show increased risk for the ACC formation, compared with the general population. That may be explained by the fact that increased levels of β -catenin possibly play role in the ACC development, as this protein potently activates a spectrum of genes essential for adrenocortical tissue development and homeostasis [131, 132].

Promising therapeutic targets in adrenocortical cancer

Mentioned above as the cascades involved in cross talk and regulation by a number of factors of the cell signalling system, PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK pathways are both initiated by TKR activation. Recent reports have identified a number of their elements as promising targets for ACC therapy, along with studies demonstrating the anti-proliferative activity of PI3K/mTOR inhibitors in adrenocortical cancer cells [99, 133–141].

Fassnacht et al. described elevated total Akt protein expression in ACCs, but not in ACAs or normal tissue. This research group also assessed the level of phosphorylated Akt (pAkt) and showed that in fact the pAkt/Akt ratio was not altered in carcinomas [142]. However, another study reported that expression of pAkt was higher in ACCs [34]. Additionally, mTOR, phospho-mTOR, and raptor protein levels were markedly increased in adrenocortical tumours. Accordingly, mTOR activity was higher in ACTs than in controls. On the other hand, RICTOR was not detectable in tumour or normal adrenal tissue [99].

A few reports regarding Ras proteins describe overexpression of KRAS mRNA and mutations in KRAS gene in benign adrenal alterations [143] and carcinomas [82] as well as mutations in NRAS gene in both ACCs and ACAs [82, 144]. However, some other studies have reported a lack of mutation of those genes and HRAS (HRas) in adrenal neoplasms [144–146]. Moreover, Koutoula et al. found activating mutations in the BRAF gene (B-Raf) in almost 6% of carcinomas tested [82]. These observations suggest that alterations in genes encoding elements of Ras and Raf families may occur in adrenal lesions, but are not common events.

Molecular research methods

A range of susceptibility genes, found in affected individuals with a family history, were the initial candidates for determining tumour malignancy and its differentiation from benign neoplasms. Genome-wide studies such as transcriptome analysis allow us to cluster tumours that follow similar molecular and prognostic

profiles. It may represent a real turning point in adrenocortical tumour diagnosis and treatment.

The methods enabling these analyses include: microsatellite analysis, conventional and array-based comparative genomic hybridisation (CGH), cDNA, oligonucleotide, SNP, miRNA microarrays, and PCR arrays. A number of research groups have carried out experiments on the expression of a large number of genes in adrenocortical tumours. While studies using microsatellite markers identify genomic regions of high concentration of LOH [35, 125], conventional comparative genomic hybridisation assesses copy number alterations across the entire genome [25, 147–152]. However, the main disadvantage of conventional CGH is its limited resolution (2 Mbp for amplifications and 10–20 Mbp for single-copy deletions), making it an unreliable method to detect changes at the locus level. This has been addressed by CGH arrays, which allow the detection of DNA copy number aberrations at the gene level, locus by locus [153]. A number of recent studies have reported the results of the CGH array-based experiments for adrenocortical tumours [20, 46, 147, 154].

Other types of DNA microarrays used in ACT research are cDNA, oligonucleotide, and SNP microarrays. The first two form the basis of expression profiling studies, differing slightly in precision and reliability. The volume of research reports based on microarrays 'spotted' with cDNA probes [31, 37, 83, 85, 91, 155, 156] is comparable to the number of studies using *Affymetrix GeneChips* (high-density oligonucleotide microarrays) [19, 21, 32, 33, 52, 92, 94, 157–160]. A few recent reports have focused on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis of adrenocortical tumours employing SNP arrays [73, 161, 162]. SNP microarrays enable the detection of copy number variations and LOH in the samples. Another type of specifically-designed chip is microRNA microarray, allowing the genome-wide investigation of miRNA populations [90, 96–98, 100]. Microarray technology also allows methylation profiling studies, suggesting that it may be another means of differentiating malignant from benign neoplasms [163–165]. As for PCR arrays, they are a method of choice for studies oriented on a specific group of genes, for example implicated in a specific cell-signalling cascade [155, 166, 167].

The techniques used to validate the results of a genome-wide study for chosen samples include immunohistochemistry, Western blotting, qPCR, and fluorescence in situ hybridisation (FISH). Apart from transcriptome analyses, one of the most common methods to screen a large number of samples is tissue microarray: it has been widely used for immunohistochemistry studies on adrenocortical tumours [21, 34, 51, 52, 67, 69, 80, 168].

Selected targeted therapies in adrenocortical cancer

Recent developments in the understanding of molecular mechanisms underlying ACC have led to clinical trials of targeted therapies; however, the results are still unsatisfactory. Reports on salvage therapies with the use of agents targeting specific molecules remain even more pessimistic. However, it should be noted that these treatments were used in ACC patients who initially showed very poor prognosis due to advanced stage of disease and who failed to respond to prior chemotherapy.

As discussed above, an increase of *IGF2* gene expression was observed in the majority of ACC cases [21, 24, 26, 31–36]. Overexpression of *IGF1R* is also thought to play a role in the pathogenesis of ACC [34, 36], but it seems to be primarily an indicator for paediatric ACCs [39, 40]. Promising pre-clinical data of anti-proliferative effects of *IGF1R* inhibition in ACC [34] provided the basis for phase I trials of *IGF1R* inhibitors. The anti-*IGF1R* monoclonal antibody figitumumab has demonstrated biological activity in refractory ACC [169]. Another phase I trial assessed a combination of *IGF1R* inhibitor cixutumumab with mTOR inhibitor temsirolimus in metastatic ACC patients. Eleven of 26 enrolled patients (42%) achieved stable disease for six months, demonstrating biological activity of this regimen in metastatic ACC [170]. Disappointingly, a multi-centre, randomised phase II trial in patients with irresectable recurrent/metastatic ACC assessing the efficacy of cixutumumab combination with mitotane failed to prove clinical benefit as a first-line therapy. It proved to be efficient in some patient subgroups, but overall showed relatively low therapeutic efficacy, which prevents this regimen from proceeding in further studies [171]. Another *IGF1R* inhibitor to present potential anti-tumour ability in preliminary studies and further undergo a clinical trial was Linsitinib (OSI-906). However, in a double-blind, randomised, phase 3 study in patients with locally advanced or metastatic ACC Linsitinib did not improve overall survival, failing to present efficacy for this type of cancer [172].

With mTOR being a downstream effector of the *IGF2* signalling pathway, its inhibitor everolimus (rapamycin derivative) might have therapeutic potential in ACC patients. *In vitro* studies demonstrated that everolimus exerts an inhibitory effect on ACC cell proliferation [99, 134, 173, 174]. However, a study, which enrolled four women with advanced ACC, demonstrated no clinically meaningful response to everolimus. This cohort included patients who developed stage IV disease after surgery and progressed despite treatment with mitotane and other modalities including chemotherapy,

thalidomide, and *IGF1R* antagonist. Everolimus was added to the treatment (two out of four patients also continued mitotane) but did not prevent disease progression in any of the patients [175].

EGFR was found to be a malignancy marker for adrenal tumours [80]; however, the *EGFR* mutations in exons 18–21 were observed in up to 11% of ACC cases [82, 176]. Erlotinib is an *EGFR*-specific tyrosine kinase inhibitor that is FDA approved for the treatment of NSCLC. Pre-clinical results of erlotinib in ACC cell lines and primary cultures are promising [177–179]. The efficacy of combined treatment with erlotinib and gemcitabine as salvage therapy was assessed in the group of patients with progressive ACC after two to four previous systemic therapies. Only one in 10 patients experienced a minor response, whereas eight patients progressed, suggesting that salvage chemotherapy using this regimen has no benefit in patients with very advanced ACC [180].

Summary, final conclusions, and future opportunities

The molecular studies of aberrations of signalling pathways in adrenocortical tumours have revealed a spectrum of underlying alterations both at the DNA sequence and expression levels. Many of these changes are differentially present in adrenocortical carcinomas and adenomas, thus providing diagnostic utility by defining a malignancy signature. The pipeline of diagnostic markers includes proliferation assessment by Ki-67 labelling index [181]. Similarly, steroidogenic factor-1 shows great diagnostic and prognostic value, as its increased expression correlates with more advanced tumour stage and poorer prognosis [68]. Other examples of molecular events that may be potentially used for this purpose include increased levels of insulin-like growth factor II, fibroblast growth factor receptors 1 and 4, or cyclins (D1, E1, and E2). However, their usage in clinical practice needs to be carefully formulated and validated. In addition, altered genes, miRNAs, and/or proteins are prospective targets for a more personalised therapy of ACC.

Further investigation may lead to the development of novel treatment options, which may replace the highly damaging regimen of choice in the case of metastasis or recurrence despite the surgery, namely mitotane as a single agent or combined with cytotoxic drugs. A number of agents seem to be promising in ACC treatment, such as *IGF1R* antagonists (NVPAEW541, IMC-A12, figitumumab (CP-751,871), OSI-906), β -catenin antagonists (PKF115–584), SF-1 inverse agonists (compounds of the isoquinolinone class), and mTOR antagonists (rapamycin, sirolimus, and its derivatives

everolimus (RAD001) and temsirolimus) [13, 182]. However, single-agent therapy alone, as for everolimus, may not be sufficient for malignant adrenocortical tumours, and negative interactions with other therapies such as mitotane need to be taken into account [175].

In summary, enhancing the understanding of the molecular events of adrenocortical tumourigenesis, especially with regard to the signalling pathways, may greatly contribute to improving a range of available diagnostic, prognostic, and treatment approaches.

Acknowledgements

Dr Dorota Dworakowska was supported by Foundation for Polish Science within the grant 'Bridge' (PO-MOST/2012-5/3), which is co-financed by European Union within Regional Development Programme. Paulina Szyszka was a PhD student to Dr Dworakowska within the frame of this grant.

References

- Fassnacht M, Allolio B. Epidemiology of Adrenocortical Carcinoma. In Adrenocortical Carcinoma. Hammer G.D., Else T. (eds). Basic Science and Clinical Concepts. Springer, New York 2011: 23–29.
- Barzon L, Sonino N, Fallo F et al. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 273–285.
- Lafemina J, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma: past, present, and future. *J Surg Oncol* 2012; 106: 586–94. DOI: 10.1002/jso.23112.
- Klein JD, Turner CG, Gray FL et al. Adrenal cortical tumors in children: factors associated with poor outcome. *J Pediatr Surg* 2011; 46: 1201–1207. dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2011.03.052.
- Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 2000; 88: 711–736.
- Blanes A, Diaz-Cano SJ. Histologic criteria for adrenocortical proliferative lesions: value of mitotic figure variability. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 398–408. 10.1309/MCGUQ3R4A4WWN3LB.
- Hough AJ, Hollifield JW, Page DL et al. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 390–399.
- van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D et al. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer* 1985; 55: 766–773.
- Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and non-metastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 163–169.
- Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum Pathol* 2009; 40: 757–768. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.03.010.
- Glover AR, Ip JC, Zhao JT et al. Current management options for recurrent adrenocortical carcinoma. *Oncotargets Ther*, 2013; 6: 635–643. DOI: 10.2147/OTT.S34956.
- Ronchi CL, Kroiss M, Sbiera S et al. EJE prize 2014: current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go? *Eur J Endocrinol* 2014; 171: R1–R11. DOI: 10.1210/jc.2013-0273.
- Maluf DF, de Oliveira BH, Lalli E. Therapy of adrenocortical cancer: present and future. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 222–232.
- Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 4551–4564. DOI: 10.1210/jc.2013-3020.
- Else T, Williams AR, Sabolch A et al. Adjuvant therapies and patient and tumor characteristics associated with survival of adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 455–461. DOI: 10.1210/jc.2013-2856.
- Else T. Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 66–70. DOI: 10.1016/j.mce.2011.12.008.
- Giordano TJ. Classification of adrenal cortical tumors: promise of the 'molecular' approach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24: 887–892. DOI: 10.1016/j.beem.2010.10.012.
- Bertherat J, Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 261–271. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.beem.2008.10.006.
- 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: 8276–8281. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2014.
- Barreau O, de Reynies A, Wilmet-Roussel H et al. Clinical and pathophysiological implications of chromosomal alterations in adrenocortical tumors: an integrated genomic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E301–E311. DOI: 10.1210/jc.2011-1588.
- Giordano TJ, Kuick R, Else T et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 668–676. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1067.
- Ragazzon B, Assie G, Bertherat J. Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18: R15–27. DOI: 10.1530/erc-10-0220.
- Assie G, Giordano TJ, Bertherat J. Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 111–117. DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.044.
- Assie G, Guillaud-Bataille M, Ragazzon B et al. The pathophysiology, diagnosis and prognosis of adrenocortical tumors revisited by transcriptome analyses. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 325–334. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.009.
- Gruschwitz T, Breza J, Wunderlich H et al. Improvement of histopathological classification of adrenal gland tumors by genetic differentiation. *World J Urol* 2010; 28: 329–334. DOI: 10.1007/s00345-010-0541-7.
- Heaton JH, Wood MA, Kim AC et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *Am J Pathol* 2012; 181: 1017–1033. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.05.026.
- Drelon C, Berthon A, Ragazzon B et al. Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models. *PLoS ONE* 2012; 7: e44171. DOI: 10.1371/journal.pone.0044171.
- Easton JB, Kurnmasheva RT, Houghton PJ. IRS-1: auditing the effectiveness of mTOR inhibitors. *Cancer Cell* 2006; 9: 153–155. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.027.
- Wilkin F, Gagne N, Paquette J et al. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2048–2056.
- Soon PS, McDonald KL, Robinson BG et al. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist* 2008; 13: 548–561. DOI: 10.1634/theoncologist.2007-0243.
- Velázquez-Fernández D, Laurell C, Geli J et al. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery* 2005; 138: 1087–1094. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.surg.2005.09.031.
- Soon PS, 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: 573–583. DOI: 10.1677/erc-08-0237.
- West AN, Neale GA, Pounds S et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2007; 67: 600–608. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3767.
- 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: 204–212. DOI: 10.1210/jc.2008-1456.
- Gicquel C, Bertagna X, Gaston V et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 6762–6767.
- Fottner C, 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: 397–405. DOI: 10.1055/s-2004-814563.
- de Fraipont E, El Atifi M, Cherradi N et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1819–1829. DOI: 10.1210/jc.2004-1075.
- Mazzucco TL, Durand J, Chapman A et al. Genetic aspects of adrenocortical tumours and hyperplasias. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77: 1–10. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2012.04403.x.
- Almeida MQ, Fragozo 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: 3524–3531. DOI: 10.1210/jc.2008-0065.
- El Wakil A, Doghman M, Latre De Late P et al. Genetics and genomics of childhood adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 336: 169–173. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.008.
- Olivier M, Goldgar DE, Soda N et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63: 6643–6650.
- Petitjean A ME, Kato S, Ishioka C et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons

- from recent developments in the IARC TP53 database. (Database version: R16, November 2012), in *Hum Mutat*. 2007; 622–629.
43. 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: 844–850. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2085.
 44. Wasserman JD, Zambetti GP, Malkin D. Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 101–110. DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.010.
 45. Barzon L, Chilos M, Fallo F et al. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 207–212.
 46. De Martino MC, Al Ghuzlan A, Aubert S et al. Molecular screening for a personalized treatment approach in advanced adrenocortical cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 4080–4088. DOI: 10.1210/jc.2013-2165.
 47. Sidhu S, Martin E, Gicquel C et al. Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 549–554. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2005.01.013.
 48. Berthon A, Martinez A, Bertherat J et al. Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 87–95. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.009.
 49. El Wakil A, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332: 32–37. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.014.
 50. Tissier F, Cavard C, Groussin L et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2005; 65: 7622–7627. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0593.
 51. Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M et al. beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2011; 17: 328–336. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2006.
 52. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 2003; 162: 521–531. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63846-1.
 53. Chapman A, Durand J, Ouadi L et al. Identification of genetic alterations of AXIN2 gene in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E1477–1481. DOI: 10.1210/jc.2010-2987.
 54. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res* 2003; 63: 5308–5319.
 55. Mantovani G, Lania AG, Bondioni S et al. Different expression of protein kinase A (PKA) regulatory subunits in cortisol-secreting adrenocortical tumors: Relationship with cell proliferation. *Exp Cell Res* 2008; 314: 123–130. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.08.024.
 56. de Jossineau C, Sahut-Barnola I, Levy I et al. The cAMP pathway and the control of adrenocortical development and growth. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 28–36. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.006.
 57. 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: 3054–3058.
 58. Rothenbuhler A, Horvath A, Libé R et al. Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (PDE8B), a cAMP-specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in a cohort of patients with adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77: 195–199. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2012.04366.x.
 59. Rosenberg D, Groussin L, Julian E et al. Transcription factor 3'5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3958–3965.
 60. Peri A, Luciani P, Conforti B et al. Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5443–5449.
 61. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiére G et al. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*; 2003; 1: 8. DOI: 10.1186/1478-1336-1-8.
 62. Lalli E, Doghman M, Latre de Late P et al. Beyond steroidogenesis: Novel target genes for SF-1 discovered by genomics. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 371: 154–159. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.11.005.
 63. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2968–2987. DOI: 10.1210/me.2007-0120.
 64. França MM, Ferraz-de-Souza B, Santos MG et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 371: 140–147. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.029.
 65. Pianovski MAD, Cavalli LR, Figueiredo BC et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1040–1043. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.022.
 66. 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: 615–619. DOI: 10.1210/jc.2004-0942.
 67. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1458–1462. DOI: 10.1210/jc.2009-2040.
 68. 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: E161–171. DOI: 10.1210/jc.2010-0653.
 69. Duregon E, Volante M, Giorgelli J et al. Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates. *Hum Pathol* 2013; 44: 822–828. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2012.07.025.
 70. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004; 25: 947–970. DOI: 10.1210/er.2003-0030.
 71. Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A et al. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 199–206.
 72. Ehrlund A, Jonsson P, Vedin LL et al. Knockdown of SF-1 and RNF31 affects components of steroidogenesis, TGFbeta, and Wnt/beta-catenin signaling in adrenocortical carcinoma cells. *PLoS One* 2012; 7: e32080. DOI: 10.1371/journal.pone.0032080.
 73. Ronchi CL, Leich E, Sbiera S et al. Single nucleotide polymorphism microarray analysis in cortisol-secreting adrenocortical adenomas identifies new candidate genes and pathways. *Neoplasia* 2012; 14: 206–218.
 74. De Martino MC, van Koetsveld PM, Pivonello R et al. Role of the mTOR pathway in normal and tumoral adrenal cells. *Neuroendocrinology* 2010; 92 (Suppl. 1): 28–34. DOI: 10.1159/000314280.
 75. 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: 345–349.
 76. 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: 9–16.
 77. de Fraipont E, 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: 4734–4741.
 78. Kamio T, Shigematsu K, Sou H et al. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. *Hum Pathol* 1990; 21: 277–282.
 79. Sasano H, Suzuki T, Shizawa S et al. Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Mod Pathol* 1994; 7: 741–746.
 80. 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: 1596–1604. DOI: 10.1038/modpathol.2010.153.
 81. Zhang J, Sun J, Liang Z et al. Myxoid adrenocortical neoplasms: a study of the clinicopathologic features and EGFR gene status of ten Chinese cases. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 783–792. DOI: 10.1309/ajcp7lo3nayqkasz.
 82. 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: 565–572. DOI: 10.1677/ERC-08-0101.
 83. Laurell C, Velazquez-Fernandez D, Lindsten K et al. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol* 2009; 161: 141–152. DOI: 10.1530/EJE-09-0068.
 84. 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: L11–13. DOI: 10.1530/ERC-11-0231.
 85. Slater EP, Diehl SM, Langer P et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 587–598. DOI: 10.1530/eje.1.02116.
 86. Bielinska M, Parviainen H, Kiiveri S et al. Review paper: origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Vet Pathol* 2009; 46: 194–210. DOI: 10.1354/vp.46-2-194.
 87. Beuschlein F, Looyenga BD, Reincke M et al. Role of the inhibin/activin system and luteinizing hormone in adrenocortical tumorigenesis. *Horm Metab Res* 2004; 36: 392–396. DOI: 10.1055/s-2004-814584.
 88. Hofland J, Timmerman MA, de Herder WW et al. Expression of activin and inhibin subunits, receptors and binding proteins in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 792–799. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2006.02668.x.

89. Hofland J, de Jong FH. Inhibins and activins: Their roles in the adrenal gland and the development of adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 359: 92–100. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.005.
90. Tombol Z, Szabo PM, Molnar V et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 895–906. DOI: 10.1677/erc-09-0096.
91. Lombardi CP, Raffaelli M, Pani G et al. Gene expression profiling of adrenal cortical tumors by cDNA macroarray analysis. Results of a preliminary study. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 186–190. DOI: 10.1016/j.biopha.2006.03.006.
92. de Reynies A, Assie 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: 1108–1115. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.5678.
93. Bourcigoux N, Gaston V, Logie A et al. High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 322–330.
94. Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. *Arch Surg* 2008; 143: 841–846; discussion 846. DOI: 10.1001/archsurg.143.9.841.
95. Singh P, Soon PSH, Feige JJ et al. Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 118–128. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.041.
96. Soon PS, 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: 7684–7692. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1587.
97. Patterson EE, Holloway AK, Weng J et al. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* 2011; 117: 1630–1639. DOI: 10.1002/cncr.25724.
98. Ozata DM, Caramuta S, Velazquez-Fernandez D et al. The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18: 643–655. DOI: 10.1530/erc-11-0082.
99. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B et al. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2010; 70: 4666–4675. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3970.
100. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S et al. Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol* 2011; 64: 529–535. DOI: 10.1136/jcp.2010.085621.
101. Caramuta S, Lee L, Ozata DM et al. Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20: 551–564. DOI: 10.1530/ERC-13-0098.
102. Barzon L, Masi G, Pacenti M et al. Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors. *Virchows Arch* 2008; 452: 181–191. DOI: 10.1007/s00428-007-0542-0.
103. de Cremoux P, Rosenberg D, Goussard J et al. Expression of progesterone and estradiol receptors in normal adrenal cortex, adrenocortical tumors, and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 465–474. DOI: 10.1677/erc-07-0081.
104. Felizola SJ, Nakamura Y, Hui XG et al. Estrogen-related receptor alpha in normal adrenal cortex and adrenocortical tumors: involvement in development and oncogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365: 207–211. DOI: 10.1016/j.mce.2012.10.020.
105. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University: Baltimore, MD.
106. Flicek P, Ahmed I, Amode MR et al. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41 (Database issue): D48–55. DOI: 10.1093/nar/gks1236.
107. Li FP, Fraumeni JE Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71: 747–752.
108. Schneider K, Zelley K, Nichols KE et al. Li-Fraumeni Syndrome. In: *GeneReviews™* [Internet]. Pagon R.A., Adam M.P., Bird TD, et al. (eds.). 1999 Jan 19 [Updated 2013 Apr 11]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993–2013.
109. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1250–6. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6959.
110. Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. Mutations Affecting Genome Stability. In: *Molecular Cell Biology*, WH. Freeman, Editor. New York 2000.
111. Varley JM, Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat*, 2003; 21: 313–320. DOI: 10.1002/humu.10185.
112. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 2007; 245: 96–102. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.12.039.
113. Herrmann LJ, Heinze B, Fassnacht M et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E476–485. DOI: 10.1210/jc.2011-1982.
114. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a001008. DOI: 10.1101/cshperspect.a001008.
115. 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: 143–150. DOI: 10.1002/humu.21151.
116. Giacomazzi J, Selstre S, Duarte J et al. TP53 p.R337H is a conditional cancer-predisposing mutation: further evidence from a homozygous patient. *BMC Cancer* 2013; 13: 187. DOI: 10.1186/1471-2407-13-187.
117. Ribeiro RC, Figueiredo B. Childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1117–1126. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2004.01.031.
118. Sidhu S, Gicquel C, Bambach CP et al. Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis. *ANZ J Surg* 2003; 73: 727. DOI: 10.1046/j.1445-2197.2003.02746.x.
119. Bachinski LL, Oluwemi SE, Zhou X et al. Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. *Cancer Res* 2005; 65: 427–431.
120. Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010; 154C: 343–54. DOI: 10.1002/ajmg.c.30267.
121. Hunt JL. Syndromes associated with abnormalities in the adrenal cortex. *Diagn Histopathol (Oxf)* 2009; 15: 69–78. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mpdhp.2009.01.004.
122. Libe R, Bertherat J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 477–487. DOI: 10.1530/eje.1.02004.
123. Mazzucco TL, Chabre O, Feige JJ et al. Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265–266: 23–28. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.034.
124. Baujat G, Rio M, Rossignol S et al. Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 715–720. DOI: 10.1086/383093.
125. Kjellman M, Roshani L, Teh BT et al. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 730–735.
126. Schulte KM, Mengel M, Heinze M et al. Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN 1 gene in adrenal cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 441–448.
127. Wu X, Hua X, Menin, histone h3 methyltransferases, and regulation of cell proliferation: current knowledge and perspective. *Curr Mol Med* 2008; 8: 805–815.
128. Piecha G, Chudek J, Wiecek A. Multiple Endocrine Neoplasia type 1. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 99–103. DOI: 10.1016/j.ejim.2007.08.004.
129. Kerr SE, Thomas CB, Thibodeau SN et al. APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. *J Mol Diagn* 2013; 15: 31–43. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.07.005.
130. Juhn E, Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2010; 11: 117–122. DOI: 10.2165/11311180-000000000-00000.
131. Barlaskar FM, Hammer GD. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8: 343–348. DOI: 10.1007/s11154-007-9057-x.
132. Mazzucco TL, Durand J, Chapman A et al. Genetic aspects of adrenocortical tumours and hyperplasias. *Clinical Endocrinology* 2012; 77: 1–10. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2012.04403.x.
133. Pezzani R, Rubin B, Redaelli M et al. The antiproliferative effects of ouabain and everolimus on adrenocortical tumor cells. *Endocr J* 2014; 61: 41–53.
134. Marinelli B, Rosato A, Zuccolotto G et al. Combination of sorafenib and everolimus impacts therapeutically on adrenocortical tumor models. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: 527–539. DOI: 10.1530/ERC-11-0337.
135. Maira SM, Stauffer F, Brueggemann J et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1851–1863. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0017.
136. Suzuki J, Otsuka F, Inagaki K et al. Novel action of activin and bone morphogenetic protein in regulating aldosterone production by human adrenocortical cells. *Endocrinology* 2004; 145: 639–649. DOI: 10.1210/en.2003-0968.
137. Saha S, Willenberg HS, Bornstein SR et al. Diabetic lipoproteins and adrenal aldosterone synthesis—a possible pathophysiological link? *Horm Metab Res* 2012; 44: 239–244. DOI: 10.1055/s-0031-1295459.
138. Saha S, Bornstein SR, Graessler J et al. Very-low-density lipoprotein mediates transcriptional regulation of aldosterone synthase in human adrenocortical cells through multiple signaling pathways. *Cell Tissue Res* 2012; 348: 71–80. DOI: 10.1007/s00441-012-1346-3.
139. Inagaki K, Otsuka F, Suzuki J et al. Involvement of bone morphogenetic protein-6 in differential regulation of aldosterone production by angio-

- tensin II and potassium in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 2006; 147: 2681–2689. DOI: 10.1210/en.2005-1250.
140. Williams TA, Monticone S, Morello F et al. Teratocarcinoma-derived growth factor-1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas and increases aldosterone secretion and inhibits apoptosis in vitro. *Hypertension* 2010; 55: 1468–1475. DOI: 10.1161/HYPERTENSIO-NAHA.110.150318.
141. Zheng X, Bollag WB. AngII induces transient phospholipase D activity in the H295R glomerulosa cell model. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 206: 113–122.
142. Fassnacht M, Weismann D, Ebert S et al. AKT is highly phosphorylated in pheochromocytomas but not in benign adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4366–4370. DOI: 10.1210/jc.2004-2198.
143. Lin SR, Tsai JH, Yang YC et al. Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumours in Taiwan. *Br J Cancer* 1998; 77: 1060–1065.
144. Yashiro T, Hara H, Fulton NC et al. Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. *World J Surg* 1994; 18: 455–460; discussion 460–1.
145. Moul JW, Bishoff JT, Theune SM et al. Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas. *J Urol* 1993; 149: 1389–1394.
146. Ocker M, Sachse R, Rico A et al. PCR-SSCP analysis of human adrenocortical adenomas: absence of K-ras gene mutations. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 513–514. DOI: 10.1055/s-2000-11006.
147. Mateo EC, Lorea CF, Duarte AA et al. A study of adrenocortical tumors in children and adolescents by a comparative genomic hybridization technique. *Cancer Genet* 2011; 204: 298–308. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2011.02.006.
148. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3467–3474.
149. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1116–1121.
150. Zhao J, Speel EJ, Muleta-Feurer S et al. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1039–1045. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65205-4.
151. Dohm M, Reincke M, Mincheva A et al. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 145–152.
152. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 1996; 56: 4219–4223.
153. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S et al. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 172–175.
154. Stephan EA, Chung TH, Grant CS et al. Adrenocortical carcinoma survival rates correlated to genomic copy number variants. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 425–431. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0267.
155. Almeida MQ, Azevedo MF, Xekouki P et al. Activation of cyclic AMP signaling leads to different pathway alterations in lesions of the adrenal cortex caused by germline PRKAR1A defects versus those due to somatic GNAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E687–693. DOI: 10.1210/jc.2011-3000.
156. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A et al. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 2004; 23: 1575–1585. DOI: 10.1038/sj.onc.1207277.
157. Herbet M, Salomon A, Feige JJ et al. Acquisition order of Ras and p53 gene alterations defines distinct adrenocortical tumor phenotypes. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002700. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002700.
158. Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF et al. Candidate diagnostic markers and tumor suppressor genes for adrenocortical carcinoma by expression profile of genes on chromosome 11q13. *World J Surg* 2008; 32: 873–881. DOI: 10.1007/s00268-008-9521-0.
159. Ye P, Mariniello B, Mantero F et al. G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol* 2007; 195: 39–48. DOI: 10.1677/JOE-07-0037.
160. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K et al. Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5446–5455. DOI: 10.1210/jc.2005-0836.
161. Keren B, Chantot-Bastaraud S, Brioude F et al. SNP arrays in Beckwith-Wiedemann syndrome: An improved diagnostic strategy. *Eur J Med Genet* 2013; 10.1016/j.ejmg.2013.06.005.
162. Letouze E, Rosati R, Komechen H et al. SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E1284–E1293. DOI: 10.1210/jc.2012-1184.
163. 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: E1004–E1013. DOI: 10.1210/jc.2011-3298.
164. Barreau O, Assie G, Wilmot-Roussel H et al. Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E174–E184. DOI: 10.1210/jc.2012-2993.
165. Fonseca AL, Kugelberg J, Starker LF et al. Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 949–960. DOI: 10.1002/gcc.21978.
166. Almeida MQ, Harran M, Bimpaki EI et al. Integrated genomic analysis of nodular tissue in macronodular adrenocortical hyperplasia: progression of tumorigenesis in a disorder associated with multiple benign lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E728–E738. DOI: 10.1210/jc.2010-2420.
167. Almeida MQ, Muchow M, Boikos S et al. Mouse Prkar1a haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the Trp53+/- or Rb1+/- backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 1387–1398. DOI: 10.1093/hmg/ddq014.
168. Fenske W, Volker HU, Adam P et al. Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 919–928. DOI: 10.1677/ERC-08-0211.
169. Haluska P, Worden F, Olmos D et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65: 765–773. DOI: 10.1007/s00280-009-1083-9.
170. Naing A, Lorusso P, Fu S et al. Insulin growth factor receptor (IGF1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 108: 826–830. DOI: 10.1038/bjc.2013.46.
171. 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: 232–239. DOI: 10.1007/s12672-014-0182-1.
172. 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: 426–435. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70081-1.
173. Dworakowska D, Dudka D, Weitsman G et al. Simultaneous Targeting PI3K/Akt/mTOR and MEK/RAF/ERK Pathways Results in a Synergistic Anti-Proliferative Effect in an Adrenocortical Carcinoma Model. In: Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo. 2014. Chicago, USA: Therapies for Cancer (SAT-0325). DOI: 10.1210/endo-meetings.2014.TB.8.SAT-0325.
174. Doghman M, Lalli E. Efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in a preclinical model of adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 364: 101–104. DOI: 10.1016/j.mce.2012.08.014.
175. Fraenkel M, Gueorguiev M, Barak D et al. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine* 2013; 44: 187–192. DOI: 10.1007/s12020-013-9878-1.
176. Hermans 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: 51–58. DOI: 10.1530/EJE-13-0093.
177. Diaz-Cano SJ, Szyszka P, Weitsman G et al. Effect of Erlotinib on Proliferation and Steriodogenesis in Primary Cultures of Adrenocortical Carcinoma. In: United States & Canadian Academy of Pathology 104th Annual Meeting 2015. Boston, USA: Mod Pathol 2015; 28 (Suppl. 2):133. DOI: 10.1038/modpathol.2015.14.
178. Dworakowska D, Dudka D, Weitsman G et al. The anti-proliferative effect of anti-EGFR tyrosine kinase inhibitor in combination with mitotane on H295R adrenocortical cancer cells. In: European Society of Endocrinology 2014. Wrocław, Poland: Endocrine Abstracts 2014; 35: P586. DOI: 10.1530/endoabs.35.P586.
179. Gagliano T, Gentilini E, Tagliati F et al. Inhibition of epithelial growth factor receptor can play an important role in reducing cell growth and survival in adrenocortical tumors. *Biochem Pharmacol* 2015; 98: 639–648. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.10.012.
180. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S et al. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2057–2062. DOI: 10.1210/jc.2007-2564.
181. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M. Contemporary Management of Adrenocortical Carcinoma. *Eur Urol* 2011; 60: 1055–1065. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.eurouro.2011.07.062.
182. Tacon LJ, Prichard RS, Soon PS et al. Current and emerging therapies for advanced adrenocortical carcinoma. *Oncologist* 2011; 16: 36–48. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-0270.
183. Faria AM, Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 52–57. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.040.

Polish version

Wstęp

Guzy kory nadnercza (ACT, *adrenocortical tumours*) są dość rozpowszechnionymi nowotworami, a częstość ich występowania zwiększa się wraz z wiekiem pacjenta. Incydentalomia nadnercza wykrywa się podczas wykonywania około 4% badań CT (*computed tomography*) i 6% autopsji, prawdopodobnie jest ich jednak znacznie więcej. Aż do 20 lat wieku większość ACT to niefunkcjonalne gruczolaki kory nadnercza (ACA, *adrenocortical adenomas*), zdarzają się też przypadki gruczolaków funkcjonalnych związanych z hiperkortyzolemią i/lub hiperaldosteronizmem [1, 2]. Z drugiej strony, postać złośliwa, rak kory nadnercza (ACC, *adrenocortical carcinoma*), występuje rzadko z roczną zapadalnością na poziomie 0,5–2 na milion mieszkańców [3] i 0,3 na milion w przypadku dzieci poniżej 15. roku życia [4]. Zazwyczaj ACC rozwija się w dzieciństwie (przed 5. rokiem życia) lub w czwartej i piątej dekadzie życia i jest częstszy u kobiet niż u mężczyzn [1, 5].

Rozpoznanie histopatologiczne ACC jest nadal przedmiotem kontrowersji, zaproponowano kilka sposobów punktacji, których celem jest postawienie wiarygodnej diagnozy [6–9]. Najczęściej stosowanym systemem jest skala Weissa, która jest w użytkowaniu od 1984 roku [10]. Opiera się ona na analizie histologicznej i jest ceniona ze względu na prostotę i łatwość zastosowania. Mimo to, niezbędny jest niezawodny system klasyfikacji nowotworów, umożliwiający rozróżnienie między łagodnymi i złośliwymi formami guza oraz rozpoznanie nowotworów przerzutujących najszybciej jak to jest możliwe.

Rokowanie w przypadku raka kory nadnercza jest bardzo złe, a wskaźnik 5-letnich przeżyć plasuje się na poziomie poniżej 35%. U większości pacjentów już na etapie rozpoznania nowotwór znajduje się w stadium zaawansowanym, ale ogranicza się do nadnercza i kwalifikuje się do leczenia operacyjnego. Mimo to, w okolo 30–40% przypadków ACC przerzuty są obecne w momencie ustalenia rozpoznania choroby, a dostępne metody leczenia rzadko umożliwiają uzyskanie całkowitej remisji [11, 12].

Pierwsza linia leczenia ACC to całkowita chirurgiczna resekcja guza, nie zapewnia ona jednak pełnego wyleczenia, gdyż pooperacyjny nawrót choroby występuje w 70–80% przypadków [13]. W celu poprawy rokowania zaleca się leczenie mitotanem, pojedynczo lub w połączeniu z chemioterapią. Mitotan traktowany jest jako pierwsza linia leczenia adjuwantowego, wydłużająca czas bez nawrotu choroby, jednak w najlepszym wypadku jedynie 24% pacjentów wykazuje obiektywną odpowiedź na leczenie [11, 14, 15]. Jako

że ta strategia leczenia daje niezadowalające wyniki, niezbędne są nowe metody leczenia ACC, które naprawiąby wskaźniki przeżywalności i zmniejszyłyby liczbę nawrotów choroby.

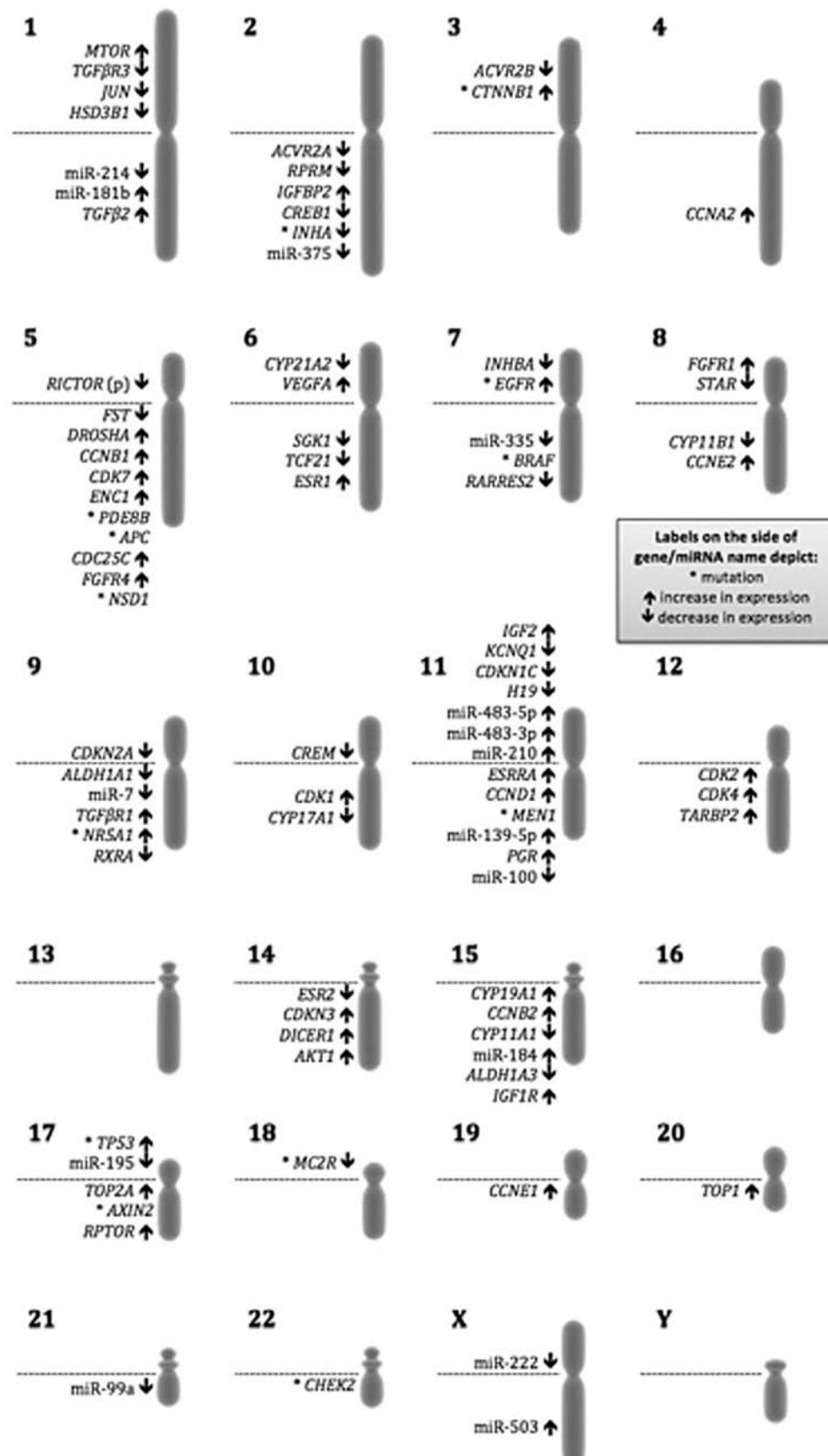
Większość przypadków ACC to przypadki sporadyczne; literatura zawiera jednak wiele opisów rodzinnych zespołów uwarunkowanych genetycznie, które charakteryzują się zwiększoną częstością występowania ACC, jak zespół Li-Fraumeni czy Beckwitha-Wiedemann [16]. Stąd też intensywne badania molekularne ACC, które dają wgląd w podstawy molekularne tego rodzaju nowotworów [17–24].

W pracy omówiono zmiany molekularne, które mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju raka kory nadnercza ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań między genami, białkami i szlakami sygnalizacyjnymi oraz przedstawiono możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

Patologia molekularna raka kory nadnercza

Nasza wiedza na temat podstaw molekularnych raka kory nadnercza poprawiła się w ciągu ostatnich lat, jednak dokładne mechanizmy i interakcje między różnymi czynnikami przyczyniającymi się do rozwoju ACC nadal są niejasne. Wysokowydajne testy ekspresji genów oparte na badaniach transkryptomów, umożliwiające badanie dużej liczby genów podczas jednego eksperymentu, wykazały różnice pomiędzy guzami łagodnymi i złośliwymi, zapewniając nowe narzędzia diagnostyczne oraz wskazały możliwości ulepszenia obecnie dostępnych metod leczenia [17–24]. Średnia liczba zmian genetycznych jest znacznie wyższa dla raka kory nadnercza niż gruczolaka [17, 18, 20, 25]. Zmiany zachodzące w komórkach ACC obejmują: zmiany ekspresji, mutacje, zmienność liczby kopii oraz utratę heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*). Pojawiają się one w obrębie całego genomu (ryc. 1) i są zaangażowane w wiele procesów komórkowych.

Zmiany molekularne odgrywające kluczową rolę w powstawaniu złośliwych zmian kory nadnercza to: nadekspresja *IGF2* (insulinopodobnego czynnika wzrostu), mutacje inaktywujące *TP53* (gen kodujący białko p53), konstytutywna aktywacja szlaku sygnalizacyjnego *Wnt/β-katenina* poprzez aktywujące mutacje genu *β-kateniny* (*CTNNB1*). Zmiany w kinazie białkowej A (PKA) i steroidogennym czynniku 1 (SF-1) również zaangażowane są w powstawanie raka kory nadnercza. Najnowsze badania wykazały, że opisane zmiany nie mogą być traktowane pojedynczo, jako samodzielne czynniki prowadzące do rozwoju złośliwych nowotworów nadnercza, ale zbiorowo — każda z nich

**Rycina 1.** Molekularne zmiany charakterystyczne dla raka kory nadnercza

Przy rysunkach chromosomów wskazano, które ramie (krótkie p lub długie q) odpowiedniego chromosomu zawiera dany gen/miRNA. Oznaczenia: * — mutacja, ↑ — nadekspresja, ↓ — obniżenie ekspresji. Ilustracje chromosomów pochodzą z Somersault 18: 24 — Library of Science Illustrations (www.somersault1824.com)

może przyczynić się do rozwoju ACC wraz z innymi czynnikami współtowarzyszącymi [26, 27]. Rodzaje mutacji obserwowanych w sporadycznych ACC są bardzo podobne do tych, które wykazano w dziedzicznych nowotworach (patrz następny rozdział) i najczęściej są to mutacje zmiany sensu.

Szak sygnałowy insulinopodobnego czynnika wzrostu 2

Insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (IGF2, *insulin-like growth factor 2*) odgrywa swoją rolę poprzez wiązanie z błonowym receptorem kinazy tyrozynowej (TKR, *tyrosine kinase receptor*), IGF1R. Po związaniu ligandu następuje autofosforylacja receptora i przyłączenie substratu dla receptora insulinowego (IRS-1, *insulin receptor substrate 1*) [28]. Fosforylacja tyrozyny w IRS-1 aktywuje kaskadę sygnałową takich szlaków, jak PI3K/Akt/mTOR oraz Ras/Raf/MEK/ERK.

Zmiany genetyczne w locus 11p15.5 opisane w sporadycznych ACC to przede wszystkim: przegrupowania, LOH, izodisomia ojcowska i zmiany imprintingu. Zmiany te skutkują zmniejszeniem ilości mRNA p57^{kip2} i H19 oraz zwiększeniem IGF2, co wiąże się z gorszym rokowaniem i zwiększoną ryzykiem nawrotu ACC [29, 30]. Jednak najczęstszą zmianą transkrypcyjną w ACC, występującą w ponad 80% przypadków, jest nadekspreśja genu IGF2 [21, 24, 26, 31–36]. Zmiana ta jest charakterystyczna dla złośliwych zmian nadnercza (*the adrenal-specific malignancy signature*), ale nie dla ACA i niezmienionej tkanki nadnercza. Pierwszy raz opisano ją w przypadkach zespołu Beckwitha-Wiedemanna (patrz następny rozdział). Klaster IGF2 obejmuje grupę powiązanych genów, które również wykazują zwiększoną ekspresję w ACC, i zawiera głównie geny czynników wzrostu i ich receptorów [18, 37]. Klaster IGF2 zawiera również gen kodujący białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (IGF-BP2, *insulin-like growth factor-binding protein 2*), które pełni funkcję nośnika IGF2. Jego ekspreśja i poziom w osoczu korelują z masą guza w przypadkach ACC [38]. W przypadku guzów wieku dziecięcego poziom IGF2 jest podobny w obu typach guza — ACA i ACC. Różnica polega na ekspreśji genu IGF1R, który wydaje się być podstawową cechą charakterystyczną złośliwych guzów kory nadnercza u dzieci [39, 40].

Szak sygnałowy TP53

Zmiany w obrębie genu TP53 związane z ACC występują głównie w obrębie eksonu 5, tak zwanego gorącego miejsca (*hot spot*), ale także w eksonach 6, 7, 8 i 10 [41, 42]. Mutacje TP53 obserwowane są razem z akumulacją p53, co wykazano przy użyciu metod immunohistochemicznych [43]. Inaktywujące mutacje somatyczne TP53 należą do jednych z najczęściej obserwowanych

w ACC, według szacunków występują w 15–70% przypadków [19, 44–46], a ich obecność koreluje z większymi wymiarami guza, bardziej zaawansowanym stadium, większą ilością przerzutów i skróconym czasem przeżycia wolnego od choroby [43, 47].

Szak sygnałowy Wnt/β-katenina

Kaskada sygnałowa Wnt/β-katenina reguluje proliferację, różnicowanie, przeżywalność i apoptozę, współpracując z innymi ścieżkami sygnalizacyjnymi: TP53, TGF, PI3K/Akt/mTOR oraz Ras/Raf/MEK/ERK. W korze nadnerczej, szlak Wnt/β-katenina bierze udział w rozwoju i różnicowaniu nadnerczej [48, 49]. Nieprawidłowe funkcjonowanie tego systemu może prowadzić do rozwoju nowotworu nadnercza. Najbardziej wyraziste skutki na poziomie molekularnym obejmują zaburzenia akumulacji β-kateniny w cytoplazmie i jądrze komórkowym oraz aktywujące mutacje somatyczne genu β-kateniny (CTNNB1). Zmiany te występują prawie wyłącznie w ACC o złym rokowaniu [19, 46, 50, 51]. Inne białko docelowe szlaku Wnt/β-kateniny, kodowane przez gen ENC1 (*ectodermal-neural cortex protein 1*), jest aktywowane w raku kory nadnercza [52]. Ostatnie badania wykazały w próbce ACA i ACC delecję 12 par zasad w regionie kodującym genu AXIN2, negatywnego regulatora szlaku Wnt/β-katenina [53].

Szak sygnałowy cAMP/PKA

Modyfikacje podjednostki R1A kinazy białkowej A (PKA, *protein kinase A*), stanowiącej rdzeń szlaku cAMP, często występują wśród osób z zespołem Carneya (patrz następny rozdział). Bertherat i wsp. wykazali, że braki w loci 17q23-q24 są częste w przypadkach nowotworów kory nadnercza, częściej w ACC niż w ACA. Jednakże, mutacje genu PRKAR1A zaobserwowano w przypadkach ACA, ale nie ACC, co sugeruje odmienną rolę PKA w nowotworzeniu guzów łagodnych i złośliwych [54]. Zgodnie z tym, nadmierna ekspreśja podjednostki R2B (gen PRKAR2B, 7q22.3) obserwowana jest w gruczolakach wydzielających hormony, natomiast nie jest zmieniona w rakach wydzielających i gruczolakach niewydzielających hormonów [55]. Utrata podjednostki R1A skutkuje zwiększoną sygnalizacją mTOR [56]. Kaskada ACTH/G/PKA zależna od cAMP odgrywa kluczową rolę w regulowaniu produkcji glikokortykosteroidów i androgenów. Modyfikacje genetyczne lub zmiany ekspreśji genów elementów szlaku cAMP wiążące się ze zmienionym wydzieleniem i rozwojem raka kory nadnercza to:

- zmniejszenie ekspreśji i LOH receptora hormonu adrenokortykotropowego (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*) [57];
- defekty genetyczne w genie PDE8B fosfodiesterazy 8B [58];

- zmniejszenie ekspresji białka wiążącego element odpowiedzi na cAMP (CREB, *cAMP-responsive element binding protein*) [59, 60];
- wyższa aktywność telomerazy [60];
- zmniejszenie ekspresji izoform ICER (wcześnego represora indukowanego cAMP, *inducible cAMP early repressor*), które wywodzą się z wewnętrznego promotoru genu *CREM* (kodujący białkowy modulator odpowiedzi na cAMP, *cAMP responsive element modulator*) [60].

Odmienne zmiany zaobserwowano w przypadkach ACA, co sugeruje, że powyższe zmiany mogą być wskaźnikami złośliwości nowotworu. Jednakże, większość z tych zmian związana jest z zespołem Cushinga, co sugeruje, że zmiany w sygnalizacji cAMP wykazują silną zależność z tym określonym rodzajem nowotworu kory nadnercza.

Szak steroidogenezy

Receptor jądrowy steroidogennego czynnika 1 (SF-1, NR5A1, *nuclear receptor steroidogenic factor 1*) odgrywa rolę głównego regulatora różnicowania i steroidogenezy w nadnerczach poprzez kontrolę ekspresji enzymów cytochromu P450. Receptor jądrowy steroidogennego czynnika 1 jest zaangażowany w regulację proliferacji, apoptozy, angiogenezy, przyczepności oraz dynamiki cytoszkieletu komórek kory nadnercza [61, 62]. Wysoki poziom SF-1 zwiększa proliferację komórek kory nadnercza oraz zmniejsza wydzielanie kortyzolu i aldosteronu, za to nie wywiera on wpływu na produkcję dehydroepiandrosteronu (DHEA). Zwiększenie liczby kopii genu *SF-1* (*NR5A1*) stymuluje nowotworzenie [63]. Badania inhibitora SF-1, Pod-1 (*capsulin*, *epicardin*, *Tcf21*), wykazały, że gen *TCF21* jest zahamowany w ACC, ale nie w ACA i normalnej tkance [64]. Nadekspresja SF-1 jest o wiele bardziej znacząca w nowotworach u dzieci niż u dorosłych. W większości nowotworów wieku dziecięcego liczba kopii SF-1 jest zwiększena w wyniku posiadania dodatkowego chromosomu lub amplifikacji w 9q33 [65–67]. Receptor jądrowy steroidogennego czynnika 1 jest również przydatny jako marker rokowniczy: jego zwiększena ekspresja koreluje z bardziej zaawansowanym stadium nowotworu, gorszymi efektami leczenia i krótszym całkowitym czasem przeżycia [68, 69].

Innym czynnikiem zaangażowanym w steroidogenzę jest ACTH (hormon adrenokortykotropowy, kortykotropina), który odgrywa kluczową rolę w maksymalizacji specyficznej ekspresji enzymów steroidogennych, które niezbędne są do syntezy glikokortykoidów i androgenów w warstwach siatkowej (*zona reticularis*) i pasmowej (*zona fasciculata*) nadnercza. Hormon adrenokortykotropowy działa poprzez receptory sprzężone z białkiem G_s, zwiększając poziom cAMP, a tym

samym aktywując PKA, co z kolei stymuluje ekspresję enzymów steroidogennych P450. Kaskada ACTH/G_s/PKA odgrywa zasadnicze znaczenie w utrzymaniu wysoko zróżnicowanego fenotypu nadnercza, a jedynie umiarkowane znaczenie w proliferacji komórek [70, 71]. Rak kory nadnercza wykazuje obniżony poziom ekspresji i LOH genu *ACTH-R*, kodującego receptor kortykotropiny [57, 60].

Klaster genów steroidogenezy, również wykazujący zróżnicowanie pomiędzy ACC a ACA zawiera: *CYP11A1* (cytochrom P450sc, desmolaza cholesterolu), *CYP11B1* (P450c11B1, 11 β -hydroksylaza), *CYP17A1* (P450c17, 17 α -hydroksylaza), *CYP21A2* (P450c21, 21-hydroksylaza), *HSD3B1* (dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa/ Δ -5-4 izomeraza) oraz *STAR* (StAR, białko ostrej regulacji steroidowej, *steroidogenic acute regulatory protein*). W przeciwieństwie do ekspresji klastra IGF2, klaster genów steroidogenezy wykazuje niską ekspresję w raku kory nadnercza, a wysoką w gruczołaku. Jest to zgodne z zaobserwowaną zwiększoną produkcją glukokortykoidów w ACA [37]. Związek między szlakami IGF2 i steroidogenezy jest widoczny zwłaszcza w okresie rozwoju i różnicowania nadnercza. Insulinopodobny czynnik wzrostu 2 pobudza ekspresję enzymów steroidogennych regulowanych przez ACTH, takich jak P450sc, P450c17 i HSD3B1 [29]. Ostatnie badania wskazują również związek z kaskadami TGF β i Wnt/ β -katenina. Jednakże dokładne mechanizmy tych współzależności nie zostały jeszcze zidentyfikowane [62, 72]. Proponowane wyjaśnienie wskazuje udział białka docelowego szlaku Wnt/ β -katenina, SGK1 (kinazy 1 regulowanej przez osocze i glikokortykoidy, *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*), która wykazuje obniżoną ekspresję w raku kory nadnercza. Kinazą serynowo-treoninową jest SGK1, która jest regulowana przez takie czynniki, jak kortykosteroidy, czynniki wzrostu, białko p53 i mTORC2 [73].

Inne czynniki wzrostu i ich receptory

Poza IGF2 kilka innych czynników wzrostu odgrywa rolę w rozwoju nowotworów kory nadnercza, wskazując na istnienie sieci współzależności szlaków sygnalizacji komórkowej. Czynniki regulujące mTOR, które zaangażowane są w rozwój ACC to: czynnik wzrostu śródblonka naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), epidermalny czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*) oraz IGF2. Ponadto, mTOR może wpływać na ekspresję IGF2 i VEGF, odgrywając rolę ich stymulatora [74]. Wśród różnych typów nowotworów nadnercza najwyższy poziom VEGF zaobserwowano w ACC. Jednym z głównych czynników angiogenezy w guzach litych jest VEGF [75–77]. Zwiększyony poziom VEGF wykazuje silną zależność z nadekspresją IGF2, zgodnie z obserwowanym

wpływem na auto- i parakrynną regulację wzrostu komórek nowotworowych [77].

Również receptor epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) wykazuje zwiększy poziom w raku kory nadnercza [78–81]. Potencjalnym markerem złośliwości jest EGFR, ponieważ jego ekspresja jest znacznie wyższa w ACC niż w ACA. Receptor EGF, należący do rodziny ErbB, bierze udział w proliferacji i przeżyciu komórek. Docelowymi szlakami sygnałowymi są Ras/Raf/MEK i STAT [81]. Kotoula i wsp. przeprowadzili badania mutacji w genie *EGFR* i wykryli je w domenie kinazy tyrozynowej tego receptora w stosunkowo niewielkiej ilości (11%) raków [82].

Receptory czynników wzrostu fibroblastów (FGFR1 i FGFR4) mogą również służyć jako znaczniki złośliwości, ponieważ ich stężenie jest znacznie wyższe w ACC niż w ACA i tkance zdrowej [33, 37, 46, 52, 83–85]. Współdziałają one z IGF2 (hamowanie poprzez podstawowy FGF2) i NRAS, bezpośrednie białko docelowe sygnalizacji FGFR. FGFR1 i FGFR4 należą do genów klastra IGF2, a ich nadmierna ekspresja koreluje bezpośrednio z IGF2 [33].

Transformujące czynniki wzrostu α (TGF α) i β (TGF β 1 i TGF β 2) są wytwarzane w zdrowych komórkach kory nadnerczy, aby kontrolować steroidogenezę poprzez hamowanie ekspresji STAR (kodującego białko ostrej regulacji steroidowej), CYP17A1 i innych genów [79, 86]. Te dwa czynniki wzrostu dzielą te same receptory, typu 1 i 2. Nadmierna ekspresja genów TGF β 2 i TGF β R1 została zaobserwowana w ACC, ale nie w ACA, co sugeruje, że mogą one stanowić obiecujące markery złośliwości. Z drugiej strony, ekspresja TGF β R3 (kodującego betaglikan, receptor typu 3 transformującego czynnika wzrostu β) jest znacznie wyższa w ACA w porównaniu z ACC. Do klastra IGF2 należą TGF β 2 i TGF β R1, a TGF β R3 jest elementem klastra genów steroidogenezy [37].

Należące do nadrodziny TGF β , aktywiny i inhibyny to ściśle związane ze sobą kompleksy białkowe o strukturze opartej na wspólnych elementach, ale wywierające praktycznie przeciwny skutek. Inhibina składa się z podjednostki α i β , która ma dwa warianty β A i β B, i jest eksprymowana w jajniku, jądrach, łożysku, korze nadnerczy, czyli w tkankach steroidogennych. Aktywina zawiera dwie podjednostki β (β A, β B, β C, β E) i wykazuje bardziej powszechnie występowanie w tkankach, wywierając działanie hamujące na wzrost komórek kory nadnerczy i wytwarzanie steroidów, ale stymulując apoptozę w nadnerczach płodowych. Rolą inhibyny jest pośrednia regulacja produkcji steroidów poprzez blokowanie wiązania aktywin z ich receptorami [87]. Profile ekspresji INHA (podjednostka β inhibyny), INH-B (podjednostka β A inhibyny), ACVR2A (receptor aktywiny typu IIA), ACVR2B (receptor aktywiny typu IIB)

oraz FST (folistatyna, białko wiążące aktywiny) wydają się podobne do TGF β R3, z ekspresją obniżoną w ACC i podwyższoną w ACA [37, 88]. Jednakże większość ACT wykazuje ekspresję INHA, co można wykorzystać jako marker odróżniający je od guzów niepochodzących z kory nadnercza. Wśród nowotworów wieku dziecięcego dominują ACT charakteryzujące się sporadycznymi stratami chromosomalnymi w genie INHA [89].

Cykł komórkowy

Białka zaangażowane w przejście komórki z fazy G1 do S, które wykazują nadeskpresję w raku kory nadnercza to: cyklin D1 (gen CCND1), E1 (CCNE1) i E2 (CCNE2), kinazy zależne od cyklin 1 (CDK1, wcześniej CDC2), 2 (CDK2) i 4 (CDK4) oraz inhibitor kinaz zależnych od cyklin 3 (fosfataza o podwójnej specyficzności związana z CDK2) (CDKN3) [21, 46, 52, 90–93]. Wśród białek przejścia G2/M, nadmierną ekspresję wykazują cyklin A2 (CCNA2), B1 (CCNB1) i B2 (CCNB2), kinazy zależne od cyklin 1 (CDK1) i 7 (CDK7), fosfataza CDC25C i topoizomerazy DNA I (TOP1) i II α (TOP2A) [21, 52, 90–92, 94]. W porównaniu z ACA i zdrową tkanką, ACC wykazują również obniżoną ekspresję inhibitorów kinaz zależnych od cyklin 1C (p57, Kip2) (CDKN1C) [33, 52, 93] i 2A (p16) (CDKN2A) [37, 46], a także protoonkogenu jun (JUN) [91] oraz reproto, kandydata na mediatora zatrzymania w fazie G2 zależnego od TP53 (RPRM) [90]. Białka p57, p16 i jun są zaangażowane w przejście G1/S, natomiast reproto w G2/M.

MikroRNA

MikroRNA to małe cząsteczki niekodującego RNA o długości 20–22 nukleotydów, które działają na poziomie transkrypcji, regulując ekspresję genów w sposób specyficzny dla sekwencji. Są one zaburzone w wielu rodzajach raka, co sugeruje, że biorą udział w powstawaniu nowotworów [95]. Jednym z najintensywniej badanych miRNA jest hsa-miR-483-5p. Jest ono nadregulowane w ACC, w przeciwieństwie do ACA i tkanki zdrowej, i wiąże się z gorszym rokowaniem [96–98]. MiR-483-5p znajduje się w locus 11p15.5 w IGF2, który jest najczęściej nadeksprymowanym genem w ACC [97]. W związku z tym poziom miR-483-5p może być wykorzystany jako wskaźnik poziomu IGF2 w ACT, co może być przydatne przy podejmowaniu decyzji o rodzaju leczenia u pacjenta i w badaniach klinicznych środków terapeutycznych celowanych w szlaki sygnałowe związane z IGF2. Kolejny mikroRNA eksprymowany z tego samego intronu 2 genu IGF2, ale wywodzący się z ramienia 3' prekursora miR-483, nazwany został hsa-miR-483-3p i również wykazuje podobny profil w ACC [97, 98]. W dziecięcych nowotworach kory nadnercza zaobserwowano nadekspresję miR-483-3p, ale nie miR-483-5p [99].

Inne mikroRNA o zwiększonej ekspresji w ACC to hsa-miR-139-5p (11q13.4), hsa-miR-181b (1q32.1), hsa-miR-184 (15q25.1), hsa-miR-210 (11p15.5) oraz hsa-miR-503 (Xq26.3) [90, 96, 98, 99]. Z drugiej strony, do miRNA o obniżonej ekspresji w ACC należą hsa-miR-7 (9q21.32), has-miR-99a (21q21.1)/hsa-miR-100 (11q24.1), hsa-miR-195 (17p13.1), hsa-miR-214 (1q24.3), hsa-miR-222 (Xp11.3), hsa-miR-335 (7q32.2) i hsa-miR-375 (2q35) [90, 96–100]. Aktywność mikroRNA może wywierać wpływ na szereg kaskad przekazywania sygnałów w komórce. Na przykład, miR-184, miR-7, miR-99a i miR-100 regulują na wielu poziomach szlak PI3K/Akt/mTOR, podczas gdy miR-335 i miR-375 mają wpływ na sygnalizację Wnt. Ponadto, miR-503 i miR-195 są zaangażowane w regulację cyklu komórkowego na poziomie przejścia G1/S [95, 99]. Niedawne badania przeprowadzone przez Caramutę i wsp. były pierwszymi mającymi na celu zbadanie elementów szlaku biogenezy mikroRNA. Wyniki wskazały zestaw genów wykazujących wyższą ekspresję w ACC w porównaniu z ACA i zdrowej tkanki: *TARBP2* (białko 2 wiążące TAR RNA), *DICER1* (dicer 1, rybonukleaza typu III) oraz *DROSHA* (drosha, rybonukleaza typu III), które stanowią kluczowe czynniki przetwarzania miRNA [101].

Receptory hormonów steroidowych

Steroidy płciowe (estrogeny i androgeny) odgrywają kluczową rolę w etiologii i rozwoju nowotworów piersi, jajnika i prostaty, związanych z układem hormonalnym [102]. Objawowo, ACC wydzielające androgeny powodują wirylizację u kobiet, podczas gdy ACC wydzielające estrogeny skutkują feminizacją u mężczyzn [3]. Estrogeny mogą stymulować proliferację komórek kory nadnercza poprzez mechanizmy auto- i parakrynowe. W ACC zaobserwowano zwiększyony poziom receptora estrogenowego typu 1 (*ESR1*, *Era*), a obniżony receptora estrogenowego typu 2 (*ESR2*, *Erb*). W rezultacie, rak kory nadnercza wykazuje podwyższony stosunek ER1/ER2 (ER α /ER β) [102]. Inne badania udowodniły związek między tym wskaźnikiem a zwiększoną ekspresją receptora innego hormonu płciowego, progesteronu (*PGR*) [103]. Ponadto, jądrowy receptor hormonów, receptor α związany z estrogenami (*ESRRA* lub *ERR α*) wykazuje podwyższony poziom w ACC w porównaniu z normalną tkanką i innymi nowotworami kory nadnercza [104]. Wzrost ekspresji aromatazy (*CYP19A1*), enzymu syntezy estrogenów ujawniający też ACC [102].

Szlak kwasu retinowego

Retinoidy biorą przede wszystkim udział w proliferacji, różnicowaniu i apoptozie. Wiele badań wskazuje, że ACC charakteryzuje się zmniejszoną ekspresją receptora kwasu retinoidowego (*RXRA*, *retinoid X receptor- α*),

RARRES2 (*retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2*) i rodziny dehydrogenaz aldehydowych 1, A1 i A3 (*ALDH1A1* i *ALDH1A3*) [21, 31, 32, 52, 83, 85, 90, 92, 94].

Genetyczne/rodzinne zespoły nowotworowe

W większości przypadków rodzinne zespoły nowotworowe wywodzą się z określonego profilu molekularnego z mutacjami linii zarodkowej, które mogą być mutacjami punktowymi, ale częściej są to złożone zmiany, dotykające wielu genów i szlaków molekularnych [38]. Guzy kory nadnercza występują w przypadkach wielu zaburzeń rodzinnych, takich jak: zespół Li-Fraumeni (LFS, *Li-Fraumeni syndrome*), zespół Beckwitha-Wiedemann (BWS, *Beckwith-Wiedemann syndrome*), zespół Carneya (CNC, *Carney complex*), mno- ga gruczołakowatość wewnętrzwydzielnicza (MEN1, *multiple endocrine neoplasia*), zespół McCune'a-Albrighta (MAS, *McCune-Albright syndrome*) i rodzinna polipowatość gruczołakowata (FAP, *familial adenomatous polyposis coli*) z jej wariantem zespołem Gardnera (rodzinna polipowatością jelita grubego), co podsumowano w tabeli I [105, 106]. Punktem centralnym tego artykułu poglądowego jest rak kory nadnercza i w związku z tym szczegółowo opisano zespoły charakteryzujące się zwiększoną częstością występowania tego rodzaju nowotworu.

Zespół Li-Fraumeni

Dziedziczony w sposób autosomalny dominujący, zespół Li-Fraumeni (OMIM 151623) charakteryzuje się występowaniem wielu rodzajów nowotworów u pacjentów poniżej 45. roku życia. Do najczęstszych guzów należą: przedmenopausalny rak piersi, mięsaki tkanek miękkich, guzy mózgu, kostniakomięsaki, rak kory nadnercza, rak płuc oraz białaczka (występująca najrzadziej spośród wymienionych typów) (dane uzyskane z bazy danych IARC TP53) [42, 107, 108]. W porównaniu z innymi wymienionymi nowotworami ACC rozwija się u mniej niż 10% pacjentów z LFS, ale występuje w najmłodszym wieku we wczesnym dzieciństwie [41, 42, 109].

Większość pacjentów z zespołem Li-Fraumeni (LFS) lub Li-Fraumeni-podobnym (LFL, *Li-Fraumeni-like*) posiada heterozygotyczne mutacje w genie *TP53* (17p13.1), kodującym białko p53, zwane również „strażnikiem genomu”. Czynnik transkrypcyjny p53 działa poprzez aktywację ekspresji genów zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego, zatrzymanie w fazie G1 w przypadku uszkodzenia DNA (utrzymanie stabilności genomowej) oraz apoptozę [110]. Częstość mutacji w genie *TP53* u pacjentów z LFS/LFL jest dość zróżnicowana, wynosząc, odpowiednio, około 80% i 40% [111]

Tabela I. Geny leżące u podstaw dziedzicznych zespołów nowotworowych charakteryzujących się zwiększoną predyspozycją do nowotworów kory nadnercza

Nazwa rodzinnego zespołu nowotworowego	ACA/ACC	Locus	Gen	Białko
Zespół Li-Fraumeni 1 (LFS1)	ACC	17p13.1	TP53	p53
Zespół Li-Fraumeni 2 (LFS2)	–	22q12.1	CHEK2	Kinaza CHEK2
Zespół Li-Fraumeni 3 (LFS3)	–	1q23	(jeszcze nie poznane)	
Zespół Beckwitha–Wiedemanna (BWS)	ACA, ACC	5q35.2-q35.3	NSD1	Białko 1 receptora jądrowego zawierające domenę SET
		11p15.5	H19	H19, transkrypt z imprintingiem matczynym (nie kodujący białka)
		11p15.5	IGF2	Insulinopodobny czynnik wzrostu 2
		11p15.5	KCNQ10T1	Przeciwna nić/antysensowny transkrypt 1 KCNQ1 (nie kodujący białka)
		11p15.4	CDKN1C	Inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1C (p57, Kip2)
Mnoga gruczolakowatość wewnętrzwydzielnicza, typu 1 (MEN1)	ACA/(rzadko ACC)	11q13.1	MEN1	Menin
Rodzinna polipowatość gruczolakowata 1 (FAP1) z wariantem zespołem Gardnera	ACA/(rzadko ACC)	5q22.2	APC	APC
Zespół Carneya, typu 1 (CNC1)	ACA	17q24.2	PRKAR1A	Regulatorowa podjednostka R1A kinazy białek zależnej od cAMP
Zespół Carneya, typu 2 (CNC2)	ACA	2p16	(jeszcze nie poznane)	
Zespół McCune'a-Albrighta (MAS)	ACA	20q13.32	GNAS	G _s -alpha (podjednostka α białka G)

ACA — gruczolak kory nadnercza, ACC — rak kory nadnercza. Na podstawie: [16, 106, 121, 183]

i prawie 30% dla obu zespołów równocześnie [112]. Dla wszystkich rodzajów rodzinnych zespołów nowotworowych łącznie prawie 17% jest skutkiem zmian w genie TP53 [109]. Warto zauważyć, że zgodnie z kryteriami Chompret dla LFS, każdy pacjent z ACC, niezależnie od wieku w momencie rozpoznania czy historii rodzinnej, wykazuje wysokie prawdopodobieństwo (zwykle między 50–80%) posiadania mutacji linii zarodkowej w TP53 [109, 113]. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC, International Agency for Research on Cancer) mutacje związane z LFS koncentrują się w TP53 w eksonach 5–8 (ok. 80–90%), a następnie w eksonach 4 i 10 (< 10% łącznie), większość z nich to mutacje zmiany sensu (prawie 70%), a następnie „splicingowe” (10%), nonsensowne (9%) i przesuwające ramkę odczytu (7%) [42].

Dwie główne funkcje p53 zostają zaburzone w wyniku zmian w tych dwóch regionach: domenie kontaktu z DNA i wiążącej DNA (DBD, DNA binding domain) oraz podporze struktury powierzchni kontaktu białko-DNA, uzyskanej dzięki dwóm dużym pętlom (L2 i L3), co jest stabilizowane wiązaniem cynku i motywem pętla-kartka-helisa (pętla L1). W związku z tym, zmutowane białka podzielono na dwie grupy: „kontaktowe” (powstałe w wyniku mutacji, takich jak S241F, R248W

i C277F) i „strukturalne” (R175H, C176F, H179R, i C242F). Inne proponowane mechanizmy zaburzonego funkcjonowania p53 obejmują: mutacje nabycia funkcji (GOF, gain-of-function) oraz dominujące negatywne (DNE, dominant-negative effects) w porównaniu z białkami typu dzikiego (*wild-type*), gdy brak jest presji selekcyjnej po utracie allele'u typu dzikiego [113, 114].

Badania mieszkańców południowej Brazylii z historią rodzinną zgodną z kliniczną definicją LFS lub LFL wykazały, że około 13% z nich jest nosicielami mutacji c.1010G > A (p.R337H) w eksonie 10 genu TP53 [112]. Pomimo wcześniejszych alternatywnych teorii, ostatnie badania potwierdzają, że wysoki współczynnik występowania tej mutacji u około 0,3% populacji tego regionu wynika z wystąpienia efektu założyciela w populacji Brazylii. W południowej Brazylii częstość występowania ACC u dzieci jest 10–15-krotnie wyższa niż w innych częściach świata i jest silnie związana z mutacją p.R337H [115–117].

Niewielka liczba rodzin dotkniętych LFS posiada mutację w innym genie — CHEK2 (22q12.1), przez co wyodrębniono zespół Li-Fraumeni 2 (LFS2) (OMIM 609265) [41, 118]. Opisano również LFS3 (OMIM 609266), związany ze zmianami w regionie 1q23, który wymaga dalszych badań [118, 119].

Zespół Beckwitha-Wiedemanna

Zespół Beckwitha-Wiedemanna (OMIM 130650) jest rzadkim schorzeniem związanym z zaburzeniami imprintingu genomowego, zazwyczaj występującym sporadycznie — rodzinne przypadki stanowią mniej niż 15% przypadków. Ten dziecięcy zespół głównie charakteryzuje się wadami przedniej ściany jamy brzusznej, makroglosią i przerostem tkanek. Około 10% przypadków BWS wiąże się ze zwiększoną ryzykiem rozwoju nowotworów, najczęściej guzów Wilmsa, hepatoblastomu, mięsaka prążkowanokomórkowego oraz guzów nadnercza [120, 121]. Z genetycznego punktu widzenia, BWS jest spowodowany przez zmiany ekspresji genów w regionie 11p15.4-p15.5 z nałożonym imprintingiem rodzicielskim. Domena telomerowa (tzw. centrum imprintingu 1, IC1 lub DMR1, *differentially methylated region 1*) zawiera geny *IGF2* i *H19*. Domena centromerowa 2 (IC2, DMR2) obejmuje około 10 genów z nałożonym imprintingiem, kodujących inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1C p57KIP2 (*CDKN1C* lub *p57kip2*), podjednostkę kanału potasowego bramkowany potentiałem (*KCNQ1*) i odpowiadający mu transkrypt (*KCNQ1OT1* lub *LIT1*) [120, 122].

Większość defektów genetycznych związanych z BWS jest skutkiem utraty imprintingu, spowodowanej nieprawidłową metylacją w regionie IC2, a większość rodzinnych przypadków wynika ze zmian w genie *CDKN1C* lub mikrodelekcji w IC1, dziedziczących się w sposób autosomalny dominujący [121, 123]. Innym genem powiązanym z BWS jest *NSD1* (5q35.2-q35.3). Baujat i wsp. opisali mutacje tego genu w niewielkiej liczbie pacjentów z BWS, sugerując, że imprinting w regionie 11p15 jest regulowany przez produkt tego genu, białko 1 receptora jądrowego zawierające domenę SET (*nuclear receptor binding SET domain protein 1*). Działa ono również jako współregulator receptora androgenowego [124].

Mnoga gruczolakowatość wewnętrzwydzielnicza

Mnoga gruczolakowatość wewnętrzwydzielnicza (OMIM 131100) to wysoce penetrująca, autosomalna dominująca przypadłość, charakteryzująca się występowaniem nowotworów przytarczyc, trzustki, przedniego płata przysadki, grasicy (rakowiaka), tarczycy (gruczolaka), a u prawie 40% pacjentów — nowotworów i rozrostu kory nadnercza. Rak kory nadnercza występuje, ale jest niezwykle rzadki. Większość rodzin dotkniętych MEN1 (75–95%) posiada heterozygotyczną inaktywującą mutację linii zarodkowej w genie *MEN1* (11q13.1) [125, 126], występują również duże delekcje. Białko menin, tkankowo-specyficzny supresor nowotworowy, oddziałuje z takimi białkami jak czynniki transkrypcyjne (np. Jun D, NF κ B i Smad3) czy metylotransferazy histonu H3 (np. MLL, MLL2) [127]. W związku z tym,

pole jego działania to regulacja cyklu komórkowego, proliferacji i apoptozy [128]. Wpływ białka menin na wzrost komórek wydaje się podlegać skomplikowanemu mechanizmowi, ponieważ działa jako supresor w komórkach endokrynnych, ale jako aktywator w niektórych typach komórek białaczkowych [127].

Rodzinna polipowatość gruczolakowata

Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP) 1 oraz jej wariant zespół Gardnera (OMIM 175100) to zaburzenia dziedziczone autosomalnie dominująco. Zazwyczaj FAP charakteryzuje się występowaniem setek do tysięcy polipów gruczolakowatych jelita grubego i jego rakiem [129], zaś zespół Gardnera wiąże się z polipowatością przewodu pokarmowego i takimi zmianami, jak: kostniaki, torbiele epidermoidalne, hepatoblastoma, rak brodawkowy i pęcherzykowy tarczycy oraz gruczolaki nadnercza [130]. Molekularnej przyczyny leżącej u podstaw tych zespołów doszukano się w locus 5q22.2, które zawiera gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*), będący supresorem nowotworów poprzez obniżanie aktywności β -kateniny. Gdy zabraknie regulacji poprzez APC następuje akumulacja β -kateniny w jądrze komórkowym, co prowadzi do aktywacji genów zaangażowanych w rozpoczęcie i postępowanie cyklu komórkowego. Zmiany patogenne w genie APC to głównie mutacje przesuwające ramkę odczytu lub non-sensowne, a następnie duże delekcje genowe i zmiany splicingu [129]. U pacjentów z FAP zaobserwowano zwiększone ryzyko ACC w porównaniu z ogólną populacją. Wyjaśnieniem może być fakt, że podwyższone stężenie β -kateniny może odgrywać rolę w powstaniu ACC, jako że to białko silnie aktywuje wachlarz genów niezbędnych do rozwoju i homeostazy tkanki kory nadnerczej [131, 132].

Obiecujące terapie celowane w raku kory nadnercza

Jak wspomniano wyżej, kaskady PI3K/Akt/mTOR i Ras/Raf/MEK/ERK współdziałają i regulowane są przez wiele elementów sygnalizacji komórkowej; obydwie inicjowane są poprzez aktywację TKR. Najnowsze doniesienia wskazują, że szereg elementów tych kaskad może stanowić obiecujące cele terapii ACC, a inhibitory PI3K/mTOR wywierają działanie antyproliferacyjne w komórkach raka kory nadnercza [99, 133–141].

Fassnacht i wsp. opisali zwiększenie całkowitej ekspresji białka Akt w ACC, ale nie w ACA lub normalnej tkance. Ta grupa badawcza zbadała także poziom ufosforylowanego Akt (pAkt) i wykazała, że w rzeczywistości wskaźnik pAkt/Akt nie jest zmieniony w ACC [142]. Jednakże inne badania wykazały, że ekspresja pAkt jest zwiększena w ACC [34]. Ponadto, stężenie mTOR,

fosfo-mTOR i białka raptor jest znacznie zwiększone w guzach kory nadnercza. Zatem aktywność mTOR jest wyższa w ACT niż w grupie kontrolnej. Z drugiej strony, stężenie białka rictor był poniżej poziomu wykrywalności w nowotworowej i normalnej tkance kory nadnercza [99].

W kilku doniesieniach dotyczących białek Ras opisano nadekspresję mRNA KRAS i mutacje w genie KRAS w łagodnych nowotworach nadnercza [143], rakach [82], jak również mutacje w genie NRAS zarówno w ACC, jak i ACA [82, 144]. Z drugiej strony, inne badania wykazały brak mutacji tych genów i genu HRAS (HRas) w nowotworach nadnercza [144–146]. Ponadto Kotoula i wsp. opisali aktywujące mutacje w genie BRAF (B-Raf) w niemal 6% badanych przypadków ACC [82]. Obserwacje te sugerują, że zmiany w genach kodujących elementy rodziny Ras i Raf mogą pojawić się w nowotworach nadnercza, jednak nie występują one często.

Molekularne metody badawcze

Szereg genów podatności, opisanych w przypadkach zespołów rodzinnych był początkiem molekularnego określania złośliwości guza i jego odróżnienia od nowotworów łagodnych. Badania genomu, takie jak analiza transkryptomu, pozwalają kwalifikować nowotwory do klastrów o podobnym profilu molekularnym i rokowniczym. Jest to być może punkt zwrotny w diagnostyce i leczeniu nowotworów kory nadnercza.

Metody, które umożliwiły takie analizy, to: analiza mikrosatelitarnych sekwencji, porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH, *comparative genomic hybridisation*) (zarówno konwencjonalna, jak i oparta na macierzach), mikromacierze cDNA, oligonukleotydowe, SNP, miRNA oraz macierze PCR. Wiele grup badawczych przeprowadziło badania ekspresji dużej liczby genów w nowotworach kory nadnercza. Badania z zastosowaniem markerów mikrosatelitarnych pozwalają zidentyfikować regiony genomu, gdzie często występuje LOH [35, 125], natomiast porównawcza hybrydyzacja genomowa umożliwia ocenę zmian liczby kopii w całym genomie [25, 147–152]. Główną wadą konwencjonalnej CGH jest ograniczona rozdzielcość (2 Mbp dla amplifikacji i 10–20 Mbp dla delecji pojedynczej kopii), co sprawia, że nie jest przydatna w wykrywaniu zmian na poziomie locus. Ten problem został rozwiązany w macierzach CGH, które umożliwiają wykrywanie zmian liczby kopii DNA na poziomie genów, analizując pojedyncze locus za locus [153]. W ostatnim czasie wiele projektów badawczych było poświęcone ocenie nowotworów kory nadnercza za pomocą macierzy CGH [20, 46, 147, 154].

Do innych typów mikromacierzy DNA wykorzystywanych w badaniach ACT należą: mikromacierze cDNA, oligonukleotydowe i SNP. Pierwsze dwa typy stanowią podstawę badań mających na celu ocenę

profilu ekspresji. Te metody nieznacznie się od siebie różnią, jeśli chodzi o precyzję i niezawodność. Liczba badań opartych na mikromacierzach cDNA [31, 37, 83, 85, 91, 155, 156] jest porównywalna z liczbą badań z użyciem *Affymetrix GeneChips* (są to wysokiej gęstości mikromacierze oligonukleotydowe) [19, 21, 32, 33, 52, 92, 94, 157–160]. Badania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) w guzach kory nadnercza z użyciem macierzy SNP są nieliczne [73, 161, 162]. Mikromacierze SNP umożliwiają wykrycie zmian liczby kopii i LOH. Innym rodzajem dedykowanego chipa jest mikromacierz mikroRNA, która umożliwia badanie całej populacji miRNA na poziomie genomu [90, 96–98, 100]. Technologia mikromacierzy umożliwia także badania profilu metylacji, co może być kolejnym sposobem na odróżnienie nowotworów złośliwych od łagodnych [163–165]. Macierze PCR są najbardziej przydatne w badaniach określonej grupy genów, przykładowo genów związanych z określoną ścieżką sygnalizacyjną [155, 166, 167].

Techniki wykorzystywane do weryfikacji wyników badań na poziomie genomu obejmują immunohistochemię, Western blotting, qPCR oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridisation*). Poza analizami transkryptomu, jedną z najczęściej stosowanych metod w badaniach przesiewowych dużej liczby próbek są mikromacierze tkankowe, szczególnie często wykorzystywane w badaniach immunohistochemicznych guzów kory nadnercza [21, 34, 51, 52, 67, 69, 80, 168].

Wybrane terapie celowane w raku kory nadnercza

Niedawne badania, które przyczyniły się do zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw ACC, umożliwiły badania kliniczne terapii celowanych. Jednakże ich wyniki są nadal niezadowalające. Doniesienia o terapiach ratunkowych z wykorzystaniem środków ukierunkowanych na konkretne cząsteczki są jeszcze mniej pomyślne. Należy jednak zauważyć, że te środki badano u pacjentów z ACC z bardzo złym rokowaniem przez zaawansowane stadium choroby, u których nie uzyskano odpowiedzi na wcześniejszą chemioterapię.

Jak wspomniano powyżej, w większości przypadków ACC zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu IGF1R [21, 24, 26, 31–36]. Nadekspresja IGF1R również odgrywa rolę w patogenezie ACC [34, 36], ale wydaje się być specyficzna dla ACC wieku dziecięcego [39, 40]. Obiecujące dane przedkliniczne opisujące zmniejszenie proliferacji w ACC w wyniku hamowania IGF1R [34] były podstawą I fazy badań klinicznych inhibitorów IGF1R. W przypadku monoklonalnego przeciwciała anty-IGF1R, figitumumabu, opisano aktywność biologiczną w ACC opornym na leczenie [169]. W innym badaniu klinicznym (I faza) oceniono skuteczność kombinacji inhibitora IGF1R, cixutumumabu, z inhibitorem mTOR,

temsirolimusem, u pacjentów z przerzutującym ACC. U jedenastu spośród 26 pacjentów włączonych do badania (42%) choroba ustabilizowała się na 6 miesięcy, wskazując na aktywność biologiczną tego rodzaju leczenia przerzutującego ACC [170]. Niestety, w wielośrodkowym badaniu II fazy z losowym przydziałem leczenia u chorych z nawrotowym/przerzutującym nieoperacyjnym ACC nie udało się potwierdzić skuteczności kombinacji cixutumumabu z mitotanem jako terapii pierwszego rzutu. To połączenie okazało się skuteczne w niektórych podgrupach pacjentów, ale ogólnie wykazało stosunkowo niską skuteczność terapeutyczną, która uniemożliwiła dalsze badania [171]. Inny inhibitor IGF1R, Linsitinib (OSI-906), wykazał obiecujące właściwości przeciwnowotworowe w badaniach wstępnych, dzięki czemu rozpoczęto badania kliniczne. Jednakże, w III fazie badań klinicznych z podwójną ślepą próbą i z losowym przydziałem leczenia u chorych z miejscowo zaawansowanym lub przerzutującym ACC, Linsitinib nie okazał się skuteczny w poprawie przeżycia całkowitego, sugerując, że ten rodzaj leczenia nie jest skuteczny w leczeniu tego rodzaju nowotworów [172].

Jako że mTOR jest białkiem docelowym szlaku sygnalizacyjnego IGF2, inhibitor mTOR, ewerolimus (pochodna rapamycyny), jest obiecującym rodzajem leczenia ACC. W badaniach *in vitro* wykazano, że ewerolimus hamuje proliferację komórek ACC [99, 134, 173, 174]. Jednakże w badaniach klinicznych nie wykazano odpowiedzi na leczenie ewerolimusem u czterech pacjentek z zaawansowanym ACC. Ta kohorta obejmowała pacjentki, u których po operacji rozwinęło się IV stadium choroby i których stan się pogorszył pomimo leczenia mitotanem i innymi środkami, w tym chemioterapią, talidomidem i antagonistą IGF1R. Ewerolimus wprowadzono do leczenia (u 2 z 4 pacjentek kontynuowano leczenie mitotanem), ale nie udało się zapobiec progresji choroby u żadnej z nich [175].

Jednym z markerów złośliwości guza nadnercza jest EGFR [80], jednakże jego mutacje w eksonach 18–21 występują jedynie w co najwyżej 11% przypadków ACC [82, 176]. Erlotynib to inhibitor kinazy tyrozynowej, specyficzny względem EGFR, zatwierdzony przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) jako środek leczniczy w raku płuca. Wyniki badań przedklinicznych erlotynibu w liniach komórkowych ACC i kulturach pierwotnych są obiecujące [177–179]. Skuteczność leczenia skojarzonego (erlotynib z gemcytabiną) jako terapii ratunkowej zbadano w grupie pacjentów z postępującym ACC, którzy otrzymali wcześniej dwa do czterech rodzajów leczenia. Tylko u jednego na 10 pacjentów zaobserwowano niewielką odpowiedź na leczenie, natomiast u 8 pacjentów choroba znacznie postąpiła, co wskazuje na to, że ta chemioterapia ratunkowa nie jest skuteczna u pacjentów z bardzo zaawansowanym ACC [180].

Podsumowanie, wnioski końcowe oraz dalsze kierunki badań

Badania molekularne elementów ścieżek sygnalizacyjnych w guzach kory nadnercza uwidocznili spektrum zmian zarówno na poziomie sekwencji DNA, jak i w ekspresji. Wiele z nich wykazuje odmienny profil w raku kory nadnercza i w gruczołaku, definiując w ten sposób wskaźniki złośliwości i dostarczając obiecującego narzędzia diagnostycznego. Ocena proliferacji za pomocą indeksu Ki-67 należy do obecnie rozwijanych markerów diagnostycznych [181]. Podobnie w przypadku steroidogennego czynnika 1, który wykazuje dużą przydatność jako marker diagnostyczny i rokowniczy. Jego zwiększoną ekspresję koreluje z bardziej zaawansowanym stadium guza i gorszym rokowaniem [68]. Inne zmiany molekularne o obiecujących właściwościach obejmują: podwyższony poziom insulinopodobnego czynnika wzrostu II, czynników wzrostu fibroblastów 1 i 4 oraz cyklin (D1, E1 i E2). Ich wykorzystanie w praktyce klinicznej musi najpierw zostać starannie opracowane i zweryfikowane. Ponadto zmienione geny, miRNA i/lub białka stanowią obiecujące cele bardziej zindywidualizowanego leczenia ACC.

Dalsze badania mogą przyczynić się do rozwoju nowych sposobów leczenia nowotworów z pooperacyjnym nawrotem choroby i/lub przerzutami, obecnie leczonych mitotanem w monoterapii lub w skojarzeniu z lekami cytostykcznymi, co wiąże się z wieloma działaniami niepożądanymi. Wiele środków wykazuje obiecujące właściwości lecznicze w przypadkach ACC, są to między innymi: antagoniści receptorów IGFIR (NVPAEW541, IMC-A12, figitumumab (CP-751,871), OSI-906), antagoniści β-kateniny (PKF115-584), odwrotni agoniści SF-1 (pochodne izochinolinony), oraz antagoniści mTOR (rapamycyna, sirolimus i jego pochodne, ewerolimus (RAD001) i temsirolimus) [13, 182]. Jednakże leczenie pojedynczym lekiem, przykładowo ewerolimusem, może nie być skuteczne w leczeniu złośliwych nowotworów kory nadnercza, a negatywne oddziaływanie z innymi środkami leczniczymi, takimi jak mitotan, powinny zostać wzięte pod uwagę [175].

Podsumowując, rozwój wiedzy na temat zmian molekularnych, zwłaszcza elementów szlaków sygnalizacyjnych, w nowotworach kory nadnercza może przyczynić się do postępu w zakresie dostępnych metod diagnostycznych, rokowniczych i leczniczych.

Podziękowania

Dr hab. med. Dorota Dworakowska jest laureatką grantu 'Pomost' (POMOST/2012-5/3) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Regionalnego Programu Rozwoju. Paulina Szyszka była doktorantką doc. Dworakowskiej w ramach tego grantu.