



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

**DOTTORATO XXXI CICLO IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E  
SPERIMENTALI**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Edoardo Spina

---

**NUOVE PROSPETTIVE NELLE BASI GENETICHE DELLA  
MALATTIA DI CUSHING**

Tesi della

Dott.ssa Adriana Albani

Relatore/Tutor: Ch.mo Prof. Salvatore Cannavò

SSD MED 13

**Anno Accademico 2017/2018**

---

## INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
2. PATOGENESI DEI CORTICOTROPINOMI.....	7
3. BACKGROUND GENETICO.....	11
3.1. Sindromi genetiche associate con la malattia di Cushing	
3.2. Mutazioni somatiche: il ruolo di USP8	
4. SCOPO DELLO STUDIO.....	23
5. MATERIALI E METODI.....	24
5.1. Pazienti e dosaggi ormonali	
5.2. Analisi genetica	
5.3. Analisi statistica	
6. RISULTATI.....	28
6.1. Genotipizzazione di USP8	
6.2. Correlazione tra status mutazionale di USP8 e caratteristiche clinico- biochimiche	
6.3. Correlazione tra status mutazionale di USP8 e outcome post- operatorio	
7. DISCUSSIONE.....	32
8. CONCLUSIONI.....	36
9. TABELLE E FIGURE.....	37
10. BIBLIOGRAFIA.....	43

## 1. Introduzione

La malattia di Cushing (MC) è una rara malattia endocrina caratterizzata dalla cronica e inappropriata esposizione ad elevati livelli di glucocorticoidi (GC), come conseguenza di una eccessiva stimolazione delle ghiandole surrenaliche da parte di un adenoma ipofisario ACTH-secerne o corticotropinoma (1). Rappresenta la causa endogena più frequente di ipercortisolismo, costituendone il 75-80% dei casi. Una autonoma produzione di cortisolo da parte di tumori surrenalici, iperplasia o displasia surrenalica e una secrezione ectopica di ACTH o CRH rappresentano le altre cause endogene di ipercortisolismo, costituendone rispettivamente il 20% e il 10% dei casi (1-3). L'incidenza annuale varia da 1.2 a 2.4 milioni con una prevalenza di quasi 40 casi per milione di abitanti (3,4). I corticotropinomi sono nella maggior parte dei casi di piccole dimensioni e soltanto nel 10-20% dei casi si presentano sotto forma di macroadenomi (5). L'asportazione chirurgica dell'adenoma per via transnasofenoidale (TNS) rappresenta la terapia di prima scelta ed è in grado di determinare una remissione di malattia

nel 60-96% dei casi (6,7). La terapia medica, costituita da agenti che agiscono a livello ipofisario riducendo la secrezione di ACTH, inibitori della steroidogenesi e antagonisti dei recettori dei GC può talora essere necessaria, anche in associazione alla radioterapia (1,8). Morfologicamente i corticotropinomi sono caratterizzati da cellule basofile positive all'immunoistochimica per ACTH e ad altri peptidi derivati della proopiomelanocortina (POMC), precursore dell'ACTH (9). La presentazione clinica può essere molto eterogenea e può includere obesità viscerale con strie pigmentate, pletora facciale, gibbo di bufalo, irsutismo, facilità alle ecchimosi e ritardo nella cicatrizzazione delle ferite. Diverse comorbidità possono essere presenti già alla diagnosi come ipertensione arteriosa, diabete e osteoporosi. Tuttavia non sempre il paziente si presenta con i classici segni e sintomi di ipercortisolismo e talora la diagnosi può essere difficoltosa, soprattutto quando l' ipercortisolismo è modesto e il paziente presenta sintomi molto simili a quelli lamentati dalla popolazione generale (10). I pazienti con MC hanno una alterata qualità della vita e incrementata morbidità e

mortalità, come conseguenza delle complicanze cardiovascolari, metaboliche, immunologiche, trombotiche, neuropsichiatriche e muscoloscheletriche (11–13). La diagnosi precoce di ipercortisolismo è molto importante in quanto l'esposizione prolungata ad elevati livelli di glucocorticoidi può avere effetti irreversibili sul sistema cardiovascolare e cerebrale (14–16). I pazienti con MC persistente o ricorrente dopo la chirurgia hanno una elevata mortalità e la malattia cardiovascolare rappresenta la causa principale di morte (17–19). Nella maggior parte dei casi la MC si presenta in forma sporadica e soltanto raramente nel contesto di sindromi genetiche familiari (20). Le basi genetiche della MC sono rimaste quasi del tutto sconosciute per tanti anni. In passato il sequenziamento di oncogeni e oncosoppressori comunemente mutati in diversi tipi di tumori, quali *KRAS*, *RET*, *PTTG*, *c-MYC*, *RBI* e *P53* non ha identificato la presenza di mutazioni ricorrenti nei corticotropinomi (21). Tuttavia, notevoli progressi sono stati compiuti negli ultimi anni nella decodificazione del background genetico della MC. Nel 2015 per la prima volta,

sequenziando l'intero esoma di un cospicuo numero di corticotropinomi è stata identificata la presenza di mutazioni ricorrenti a carico del gene *ubiquitin-specific protease 8* (*USP8*), che è stata poi confermata da studi successivi (22–26). Questo gene codifica per una deubiquitinasi coinvolta nella regolazione dell'espressione e del *trafficking* di recettori di membrana tra cui il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), noto fattore regolatore della secrezione di ACTH a livello ipofisario (27). L'identificazione di tali mutazioni rappresenta un grande progresso nella decodificazione delle basi genetiche dei corticotropinomi, costituendo USP8 un nuovo potenziale target terapeutico nella MC.

## 2. Patogenesi dei corticotropinomi

Diversi fattori responsabili di una alterazione dell'omeostasi delle cellule corticotrope sono stati ipotizzati contribuire alla patogenesi dei corticotropinomi. Tra questi, l'alterata espressione delle proteine che regolano la progressione del ciclo cellulare. In particolare la ciclina E (CCNE1), che promuove la progressione del ciclo cellulare nella fase G1/s risulta iperespressa, mentre la proteina p27/kip1 che inibisce il complesso ciclina E/CDK2 risulta drasticamente ridotta (28–30). Un altro oncosoppressore fortemente *down*-regolato in circa la metà dei corticotropinomi è *CABLES1* (CDK5 and ABL1 enzima substrato 1), che regola negativamente il ciclo cellulare mediante la inattivazione di diverse chinasi ciclina-dipendenti e la stabilizzazione di inibitori del ciclo cellulare quali p27/kip1 e p21/cip1 (31). Anche la alterata espressione di fattori di sviluppo nel tessuto adulto può contribuire alla progressione tumorale. La proteina morfogenica dell'osso (BMP4) e il *sonic hedgehog pathway* (SHH) che svolgono un ruolo di oncosoppressori risultano *down*-regolati (32–35). I fattori di crescita, quali il fattore di

crescita dell'epidermide (EGF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), contribuiscono alla progressione tumorale e il loro recettori risultano iperespressi (36,37). L' EGF svolge un ruolo di primaria importanza nella patogenesi dei corticotropinomi, regolando a livello ipofisario secrezione ormonale e proliferazione cellulare. La sua espressione correla negativamente con l'immunoreattività per p27/kip1 (38). Questo dato è di notevole interesse in quanto, come già sottolineato, la mancata espressione della proteina p27/kip1 è una caratteristica dei corticotropinomi. Gli inibitori dell' EGFR hanno mostrato attività anti-secretoria e antiproliferativa *in vivo* e *in vitro* e sono in grado di indurre un miglioramento della MC in modelli animali (27,38,39). Anche le citochine e i loro recettori regolano produzione ormonale e proliferazione cellulare. L'interleuchina 6 stimola la secrezione di ACTH e l' espressione di POMC in cellule corticotrope umane in colture cellulari, mentre il fattore inibitorio della leucemia (LIF) aumenta la trascrizione di POMC in sinergia con il CRH (40,41). L' espressione transgenica di LIF risulta in iperplasia delle cellule

corticotrope, ipercortisolismo e aspetto cushingoide (42). Tipicamente i corticotropinomi presentano una parziale resistenza al feedback negativo fisiologicamente esercitato dai GC. Tuttavia estremamente rare sono le mutazioni a carico del gene *NR3C1* che codifica per il recettore dei GC (43,44). Diversi fattori possono contribuire alla GC-resistenza, come la down-regolazione dei due co-regolatori trascrizionali Brg1 e HDAC2 e la iperespressione della proteina HSP90, che compromettono la capacità dei GC di inibire la trascrizione di POMC (45–47). Anche una alterazione del metabolismo del cortisolo può contribuire alla GR-resistenza. Difatti i corticotropinomi presentano elevati livelli di 11 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi tipo 2 (11 $\beta$ HSD2) che metabolizza il cortisolo in cortisone, inattivandolo (48). Il recettore nucleare testicolare orfano 4 (TR4), che lega il promoter di POMC stimolandone la trascrizione, è altamente espresso nei corticotropinomi e la sua iperespressione *in vivo* e *in vitro* stimola la secrezione di ACTH e la crescita tumorale (49). Infine, recentemente è stato sottolineato il ruolo dei microRNA non codificanti (miRNAs) nella regolazione

dell'espressione genica e quindi della proliferazione e differenziazione cellulare. I miRNAS -let7a, -15a, -16, -21, -141, -143, -145 e -150 risultano downregolati nei corticotropinomi (50). Al contrario i miRNAS -26a, and 30s, -122 e -493 risultano significativamente iperespressi (51–53). miR-26a sopprime la protein chinasi C delta (PRKCD) che svolge un ruolo importante nella regolazione di ciclo cellulare, proliferazione, differenziazione e apoptosi. Il suo silenziamento nelle cellule corticotrope risulta in un incremento della secrezione di ACTH e della vitalità cellulare (52).

### **3. Background genetico**

#### **3.1 Sindromi genetiche associate con la malattia di Cushing**

I corticotropinomi sono tipicamente neoplasie di origine monoclonale, originando dall'espansione monoclonale di una cellula contenente una o più mutazioni che le conferiscono un vantaggio adattativo (54). Si presentano solitamente in forma isolata e solo raramente sono stati descritti nel contesto di sindromi genetiche familiari.

#### Neoplasie endocrine multiple

La neoplasia endocrina multipla di tipo 1 (MEN1) si caratterizza per la presenza di iperparatiroidismo (manifestazione più costante), tumori neuroendocrini (in circa il 60% dei casi) e adenomi ipofisari (in circa il 30-40% dei casi). Gli adenomi ipofisari più frequenti sono i prolattinomi, mentre i corticotropinomi si riscontrano solo nel 3-10% dei casi (55). È causata da mutazioni inattivanti a

carico del gene *MEN1* codificante per la menina, cofattore trascrizionale che regola proteine del ciclo cellulare, come p27/kip1 e la chinasi ciclino-dipendente subunità 4 (CDK4). Ha inoltre anche un ruolo nel ciclo cellulare, inibendone la progressione alla fase G1 (56). Ancora più rari sono i casi di MC nei pazienti con sindromi MEN2 e MEN4. La MEN2 è causata da una mutazione attivante a carico del protooncogene *RET* (57). All'interno della MEN2 possiamo distinguere la MEN2a caratterizzata dalla presenza di adenomi delle paratiroidi, feocromocitoma e carcinoide midollare della tiroide e la MEN2b caratterizzata da carcinoma midollare della tiroide, feocromocitoma, neuromi mucosali multipli, ganglioneuromi intestinali e abito marfanoide. Gli adenomi ipofisari non fanno parte classicamente della sindrome e solo due casi di MC sono stati descritti finora in pazienti con mutazioni di *RET* (58,59). La MEN4 è una sindrome rara, simile fenotipicamente alla MEN1, causata da una mutazione inattivante a carico del gene *CDKN1B* che codifica per 27/kip1 (60). Otto pazienti

con adenoma ipofisario e MEN4 sono stati riportati finora, di cui solo uno affetto da corticotropinoma (61–63).

### Carney Complex

Il Carney Complex è una sindrome rara caratterizzata da mixomi, shwannomi, tumori endocrini e lesioni cutanee pigmentate. E' causata nel 70% dei casi da mutazioni inattivanti a carico del gene *PRKARIA* che codifica per la subunità 1 alpha regolatoria della protein chinasi A c-AMP dipendente (PKA) (64) Una condizione di ipercortisolismo è frequentemente riscontrata in questi pazienti ma è tipicamente di origine surrenalica (65). Solo tre casi di ipercortisolismo da adenoma ipofisario ACTH-secernente sono stati riportati in pazienti affetti da CNC, con documentata perdita di eterozigosi nel tessuto tumorale in due casi (66,67).

### Sindrome McCUNE-Albright

La sindrome di McCUNE-Albright (MAS) è causata da una mutazione somatica attivante solitamente post-zigotica e con distribuzione a mosaico a carico dell'oncogene *GNAS1* che codifica per la subunità alpha della proteina G stimolatoria (Gs). È definita dalla presenza di tre segni clinici: displasia fibrosa delle ossa, macchie caffè-latte e pubertà precoce (68). Anche in questo caso l'ipercortisolismo può essere presente ma è nella maggior parte dei casi secondario alla presenza di un adenoma surrenalico o iperplasia. Solo tre casi di corticotropinomi in pazienti affetti da MAC sono stati descritti finora in letteratura (69,70).

### Sclerosi tuberosa

Due casi di MC sono stati descritti in pazienti con sclerosi tuberosa (71,72). Questa sindrome genetica si caratterizza per lo sviluppo di amartomi in diversi organi, associati a manifestazioni neurologiche. E' causata da mutazioni germinali a carico degli oncogeni *TSC1* e *TSC2*, i quali

codificano rispettivamente per le proteine amartina e tuberina che inibiscono mTOR, importante regolatore del metabolismo e della crescita cellulare (73).

### Sindrome DICER1

La sindrome DICER1 è causata da mutazioni germinali a carico del gene *DICER1* che codifica per una endoribonucleasi citoplasmatica di tipo III responsabile del clivaggio dei precursori miRNAs in maturi miRNAs. E' una sindrome pleiotropica a precoce insorgenza che si caratterizza per l'associazione di diversi tumori benigni e maligni, tra cui il blastoma ipofisario, tumore dell'ipofisi con caratteristiche embriologiche tissutali (74–76). Tipicamente il blastoma ipofisario esordisce prima del secondo anno di età, per lo più con una severa MC che può portare al decesso, come descritto nei pochi casi osservati in piccoli pazienti con mutazioni somatiche e germinali del gene *DICER1* (77–80).

### Ipoplasia surrenalica congenita X-linked

La mutazione del gene *DAX1* che codifica per un recettore nucleare orfano determina la presenza di ipoplasia surrenalica congenita con conseguente iposurrenalismo associata a ipogonadismo ipogonadotropo (81). In letteratura è stato descritto un unico caso di corticotropinoma associato ad una mutazione germinale *frame shift* di *DAX1* in un paziente con precedente diagnosi di insufficienza surrenalica, ipogonadismo ipogonadotropo e ipotiroidismo primitivo (82).

### Adenomi ipofisari familiari isolati

Gli adenomi ipofisari familiari isolati (FIPA) si definiscono per la presenza di adenomi ipofisari in due o più membri della stessa famiglia, in assenza di altre caratteristiche sindromiche. In circa il 20% delle famiglie FIPA sono state identificate mutazioni a carico del gene codificante l'*aryl hydrocarbon receptor-interactin protein (AIP)*, che svolge la funzione di oncosoppressore (83). Tuttavia la MC è stata solo

raramente descritta in associazione alle mutazioni di AIP  
(84–86).

### **3.2 Mutazioni somatiche: il ruolo di *USP8***

Notevoli progressi sono stati compiuti negli ultimi anni nella decodificazione delle basi genetiche della MC, grazie alla identificazione di mutazioni somatiche attivanti e ricorrenti a carico del gene *USP8*. Tali mutazioni sono state riscontrate nei corticotropinomi con una frequenza che varia dal 30 al 60% (22–26). Il gene *USP8* codifica per una proteina dotata di attività deubiquitinasi che protegge i recettori tirosin chinasi (RTK) tra cui l' EGFR dalla degradazione lisosomiale (87,88). Tutte le mutazioni di *USP8* identificate finora sono localizzate in una regione *hotspot* in corrispondenza dell'esone 14, tra gli aminoacidi 713 e 720 vicino al dominio catalitico della proteina e determinano un'alterazione del legame di *USP8* con le proteine della famiglia 14-3-3. Il motivo di legame RSYpSSP presente in *USP8* è critico per l'interazione con le proteine della famiglia 14-3-3. La fosforilazione della serina 718 in questo dominio consente il legame e mantiene *USP8* inattivo nel citosol (89). Al contrario, la sua defosforilazione, così come le mutazioni in questa regione riducono o aboliscono il legame. Questa

alterazione di legame rende *USP8* suscettibile al clivaggio e favorisce la formazione di un peptide C-terminale di 40kDa dotato di elevata attività catalitica (22). L' aumentata attività della deubiquitinasi si traduce in una maggiore espressione di EGFR a livello di membrana e in una iperattivazione delle vie di segnale EGFR-dipendenti, quali l'attivazione delle chinasi Erk1/2 e Akt, con conseguente aumento della sintesi e secrezione di ACTH e sviluppo tumorale (22,23). Esperimenti con inibitori delle chinasi hanno documentato che la trascrizione di POMC è innescata tramite l'attivazione Erk1/2-mediata di fattori trascrizionali che legano gli *AP-1 responsive elements* sul promoter del gene POMC (25,27). L'attivazione di EGFR in cellule di corticotropinoma umano in colture cellulari primarie è in grado di attivare la trascrizione di POMC (27). Viceversa la deplezione di *USP8* determina una riduzione dei livelli di ACTH (23). I livelli proteici di EGFR sono elevati nei corticotropinomi *USP8*-mutati e si riducono in colture cellulari primarie, in seguito a deplezione di *USP8* tramite *RNA interference* (23). Mutazioni somatiche a carico di *USP8* sono state identificate solo in

adenomi ipofisari ACTH secernenti, inclusi casi di sindrome di Nelson, e in nessun altro tipo di adenoma ipofisario (90,91). Nessuna mutazione è stata identificata in tumori ectopici ACTH secernenti, suggerendo un ruolo ipofisi-specifico di *USP8* (92). I corticotropinomi *USP8*-mutati sono solitamente di piccole dimensioni (22–25). La overespressione della forma mutata di *USP8* in cellule ATt20 trasfettate con EGFR non accelera in maniera significativa la proliferazione cellulare suggerendo che l'iperattivazione delle vie di segnale EGFR-dipendenti alteri la sintesi di ACTH in maniera più pronunciata rispetto alla proliferazione cellulare (22). Le mutazioni di *USP8* sono significativamente più frequenti nel sesso femminile, verosimilmente per un effetto estrogeno-mediato (22–25). Le cellule corticotrope esprimono recettori per gli estrogeni e *in vitro* l'estradiolo è in grado di stimolare la proliferazione delle cellule corticotrope, via EGFR (93–95). La decodificazione delle basi genetiche dei corticotropinomi potrebbe avere degli importanti risvolti dal punto di vista terapeutico, rappresentando *USP8* un nuovo potenziale target nella terapia

della MC. I primi dati sono promettenti. Difatti il trattamento di cellule AtT20 con un inibitore *USP8*-specifico ha determinato la soppressione dei livelli di POMC mRNA e di ACTH, inibizione della proliferazione cellulare e induzione di apoptosi (96). Inoltre è stata riportata una maggiore espressione dei recettori di tipo 5 della somatostatina (*sstr5*) e di O6-metilguanina DNA metiltransferasi (*MGMT*) nei corticotropinomi *USP8*-mutati, indicando una possibile migliore risposta di questi tumori alla terapia con analoghi della somatostatina *sstr5*-specifici e temozolomide (24). Per quanto riguarda le caratteristiche ormonali, livelli più elevati di CLU/24h e di ACTH dopo la chirurgia sono stati documentati in pazienti con tumori *USP8*-mutati, il che potrebbe suggerire un maggior rischio di ricorrenza di malattia in questi pazienti (25,91). In accordo, uno studio su una popolazione pediatrica ha documentato ricorrenza di malattia solo nei pazienti con mutazioni di *USP8* (26). Verosimilmente altre mutazioni sono responsabili di un'aumentata trascrizione di *POMC* nei corticotropinomi che non presentano mutazioni del gene *USP8*. In accordo,

recentemente sono state identificate mutazioni a carico dei geni *USP48* (p.M415I e p.M415V) e *BRAF* (p.V600E) rispettivamente nel 23% (21/91) e nel 16% (15/91) dei corticotropinomi *USP8*-wild-type analizzati (97). Similarmente a *USP8*, nessuna mutazione di *USP48* e *BRAF* è stata identificata in altri tipi di adenoma ipofisario. Entrambe le mutazioni sembrano determinare una aumentata trascrizione di POMC con conseguente incremento dei livelli di ACTH. *BRAF* p.V600E risulterebbe in una iperattivazione del *pathway* delle MAP chinasi (MAPK) con conseguente fosforilazione e attivazione trascrizionale dei regolatori di trascrizione Nur77, c-Jun e c-Fos. Nei corticotropinomi con mutazioni di *USP48* l'attivazione trascrizionale di POMC sembra invece essere mediata dal *pathway* NF-kB.

#### **4. SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo di questo studio retrospettivo è stato quello di valutare il potenziale impatto delle mutazioni di *USP8* sulla remissione di malattia a lungo termine dopo la chirurgia, in una coorte ben caratterizzata di pazienti con MC.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Pazienti e dosaggi ormonali

È stato condotto uno studio retrospettivo in pazienti affetti da corticotropinomi operati tra il 1991 e il 2012 e trattati al *Medizinische klinik und Poliklinik IV, Ludwig-Maximilian-University* e al *Department of Endocrinology Max Plankc Institute of Psychiatry* di Monaco di Baviera, Germania. I pazienti con MC sottoposti ad intervento chirurgico nell'arco di questi ventuno anni sono stati in totale 117, tuttavia lo studio è stato condotto su 48 pazienti a causa della assenza o esigua disponibilità di tessuto tumorale o bassa/scarsa qualità del DNA nei rimanenti 69 casi. L'analisi della remissione a lungo termine è stata eseguita in 34 pazienti, avendo escluso da questa analisi 9 pazienti con persistenza di malattia dopo la chirurgia e 5 pazienti con un follow-up documentato inferiore a 6 mesi. Questa coorte rappresenta parte della coorte di pazienti analizzata da Dimopoulou et al. nel 2014 (6). La diagnosi biochimica di MC è stata posta sulla base di elevati valori di CLU/24h, mancata soppressione di cortisolo

dopo test con 1 mg di dexametasone *overnight* (test con dexametasone basse dosi) e elevati livelli di cortisolo salivare, in accordo con le correnti linee guida e come precedentemente descritto (6). Valori di ACTH >20 pg/mL e anormale risposta al test di stimolo con CRH (100 ug e.v.) hanno definito l'origine centrale dell'ipercortisolismo. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a risonanza magnetica nucleare (RMN), e nei casi dubbi, a cateterismo dei seni petrosi. L'asportazione dell'adenoma per via TNS è stato il trattamento di prima scelta per tutti i pazienti. La remissione biochimica dopo la chirurgia è stata definita dalla presenza di normali/bassi livelli di CLU/24h o livelli di cortisolo sierico <5 ug/dL dopo test con dexametasone a basse dosi. La persistenza di malattia è stata definita da elevati livelli di CLU/24h o livelli di cortisolo sierico >5ug/dL dopo test con dexametasone a basse dosi e presenza di segni/sintomi clinici di ipercortisolismo. Lo studio è stato approvato dal comitato etico della LMU, Monaco di Baviera (Nr. 643-16).

## 5.2 Analisi genetica

L'estrazione del DNA è stata eseguita in 48 corticotropinomi fissati in formalina e inclusi in paraffina, tramite il "FFPE DNA Mini Kit Qiagen". La sequenza di DNA corrispondente all'esone 14 del gene *USP8* è stata amplificata usando la GoTaq DNA polimerasi (Promega) e sequenziata tramite la *Sanger sequencing*. I cromatogrammi sono stati analizzati tramite il "*mutation Surveyor software*" versione 4.09 (Soft Genetics).

## 5.3 Analisi statistica

Le variabili con distribuzione parametrica sono state confrontate utilizzando il test *t di Student*. Il test non parametrico di *Mann-Withney* è stato utilizzato per comparare i livelli plasmatici di ACTH, cortisolo sierico e CLU/24h. Le variabili categoriche sono state analizzate tramite il *chi-square* test o il *Fisher exact* test, quando necessario. La remissione a lungo termine dopo la chirurgia è stata analizzata tramite la curva di *Kaplan-Meier*,

escludendo da questa analisi i pazienti con persistenza di malattia e con un follow-up documentato <6 mesi. La *cox regression* analisi è stata utilizzata per l'analisi di regressione multipla. I valori di *p* sono stati considerati statisticamente significativi quando inferiori a 0.05. Le analisi sono state eseguite mediante il software *SPSS* versione 24.0 (IBM SPSS Statistic).

## 6. RISULTATI

### 6.1 Genotipizzazione di *USP8*

La genotipizzazione di *USP8* è stata eseguita in materiale estratto da 48 corticotropinomi in pazienti adulti (38 femmine e 10 maschi). Sono state identificate 5 differenti mutazioni somatiche, tutte localizzate nella regione hotspot in corrispondenza dell'esone 14 del gene e già descritte in precedenza. I corticotropinomi in cui sono state identificate mutazioni di *USP8* sono 18/48, risultando in una frequenza del 37%. La mutazione più frequentemente riscontrata è la sostituzione c.2159 C>G (p.720P>R) nel 50% dei casi, seguita dalle mutazioni c.2155\_2157delTCC, c.2152T>C (p.718S>P), c.2154\_2172 del (Ser719\_Gln724del) e c.2159C>A (p.720P>Q).

## 6.2 Correlazione tra status mutazionale di *USP8* e caratteristiche clinico-biochimiche

I pazienti con tumori *USP8*-mutati sono risultati significativamente più giovani alla diagnosi rispetto a quelli affetti da tumori *wild-type* (anni  $46 \pm 10$  SD vs  $53 \pm 11$  SD;  $P=0.028$ ). I livelli pre-operatori di CLU/24h, disponibili in 24 pazienti, sono risultati significativamente più elevati nei casi con mutazione di *USP8* ( $P=0.045$ ). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata relativamente al sesso, alle dimensioni tumorali e ai livelli basali di cortisolo sierico e ACTH plasmatico nei due gruppi ( $P=0.722$ ,  $P=0.463$ ,  $P=0.852$  e  $P=0.116$ , rispettivamente). I valori basali di cortisolo sierico e ACTH plasmatico sono stati disponibili per l'analisi in 31 e 29 pazienti rispettivamente. Le caratteristiche cliniche, biochimiche e radiologiche nei pazienti con corticotropinomi *USP8*-mutati e *wild-type* sono riassunte nella tabella 1. I valori medi basali di CLU/24h, cortisolo sierico e ACTH plasmatico sono rappresentati nelle Figure 1-3.

### 6.3 Correlazione tra status mutazionale di *USP8* e outcome post-operatorio

Dopo l'intervento di asportazione dell'adenoma ipofisario per via TNS, 39/48 pazienti sono risultati in remissione di malattia. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nell'immediata remissione biochimica post-chirurgica tra i pazienti con tumori *USP8*-mutati e *wild-type* ( $P= 0.451$ ). Un follow-up a lungo termine, sino a 10 anni, disponibile in 34 dei 39 pazienti in remissione, ha documentato una incidenza di recidiva significativamente maggiore nei pazienti con tumori *USP8*-mutati (7/12, 58% vs 4/22, 18%  $P= 0.026$ ) (Tabella 2). Inoltre, il tempo libero da malattia è risultato significativamente inferiore nei pazienti con tumori *USP8*-mutati (70 vs 102 months, 95% CI 44-97 vs 86-119) (Figura 4). Questo effetto è risultato indipendente dall'età alla diagnosi e dai livelli di UFC/24h ( $P=0.617$  e  $P=0.208$  rispettivamente). Il rischio di recidiva è risultato 3.95 volte più elevato nei pazienti con tumori *USP8*-mutati (95% CI 1.145-13.668  $P=0.03$ ). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata negli altri

parametri post-operatori quali l'incidenza di ipopituitarismo e il diabete insipido nei due gruppi di pazienti ( $P=1.0$  e  $P=1.0$ , rispettivamente).

## 7. DISCUSSIONE

I risultati di questo studio indicano che le mutazioni attivanti a carico del gene *USP8* nei corticotropinomi impattano significativamente sulla remissione di malattia a lungo termine dopo l'intervento chirurgico. Difatti i corticotropinomi che presentano mutazioni a carico di *USP8* recidivano più frequentemente rispetto ai corticotropinomi *wild-type*. Il loro rischio di recidiva è 3.95 volte maggiore ed è indipendente dall'età dei pazienti e dai valori di CLU/24h. Inoltre, il tempo libero da recidiva nei pazienti con tumori *USP8*-mutati è significativamente più breve, suggerendo che le mutazioni di *USP8* non solo aumentano il rischio di recidiva ma ne favoriscono la precoce comparsa. I risultati del nostro studio sono in linea con studi precedenti che avevano già suggerito il ruolo potenziale di *USP8* come predittore di remissione di malattia. Un periodo libero da recidiva più corto nei pazienti con corticotropinomi *USP8*-mutati rispetto ai *wild-type* (mesi 29 vs 48) è stato riportato dal gruppo di Ma (23). Tuttavia, in questa analisi, risultata statisticamente non significativa, sono stati inclusi anche

pazienti un *follow-up* molto breve, e non è stata eseguita una curva di sopravvivenza. Uno studio condotto su pazienti pediatrici affetti da MC ha documentato la comparsa di recidiva di malattia dopo la iniziale remissione post-chirurgica soltanto nei pazienti affetti da tumori *USP8*-mutati (26). Il meccanismo tramite il quale le mutazioni di *USP8* incidono sulla remissione di malattia a lungo termine non è ancora noto. Una valida ipotesi potrebbe riguardare l'attività secernente del tumore. Difatti i tumori con mutazioni di *USP8* sembrano essere più attivi dal punto di ormonale. Questo potrebbe causare una sindrome clinica più conclamata che a sua volta potrebbe determinare una precoce diagnosi o favorire la recidiva. Studi precedenti hanno documentato maggiori livelli di *CLU/24h* e di *ACTH* dopo la chirurgia nei pazienti con tumori *USP8*-mutati e un più elevato rapporto *ACTH*/dimensioni tumorali (24,25,91). Inoltre, i pazienti con tumori *USP8*-mutati sviluppano meno insufficienza surrenalica dopo l'intervento chirurgico ed essendo l'iposurrenalismo post-operatorio un marker predittivo di remissione a lungo termine, questo dato ulteriormente

conferma il potenziale ruolo predittivo di *USP8* nell'*outcome* post-chirurgico (25). Studi *in vitro* hanno dimostrato che *USP8* è in grado di innescare la trascrizione del gene *POMC* e la secrezione di ACTH più potentemente quando mutato (22). Inoltre, i corticotropinomi con mutazioni di *USP8* hanno livelli più elevati di POMC (23). Coerentemente, nel nostro studio i livelli basali di CLU/24h sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con corticotropinomi *USP8*-mutati, i quali sono risultati anche essere significativamente più giovani alla diagnosi. Questi dati nel loro insieme potrebbero pertanto suggerire che i pazienti affetti da corticotropinomi *USP8*-mutati vengono diagnosticati prima a causa della presenza di una sindrome clinica più evidente. La scoperta della presenza di mutazioni attivanti a carico di *USP8* nei corticotropinomi rappresenta un importante passo in avanti nella comprensione delle basi genetiche della MC e fornisce nuove prospettive nella terapia e nella prognosi dei corticotropinomi. La correlazione significativa tra lo stato mutazionale di *USP8* e la recidiva di malattia fa difatti emergere il ruolo potenziale di *USP8* come

predittore di un peggiore *outcome* post-chirurgico. Questo suggerisce un monitoraggio più stretto dei pazienti con tumori *USP8*-mutati nei primi anni dopo la chirurgia al fine di identificare precocemente la eventuale comparsa di recidiva di malattia.

## 8. CONCLUSIONI

In conclusione, i pazienti affetti da corticotropinomi *USP8*-mutati hanno una maggiore incidenza di recidiva dopo la iniziale remissione post-chirurgica e la recidiva compare significativamente prima rispetto ai pazienti con corticotropinomi *wild-type*. Questo potrebbe essere verosimilmente conseguenza di una maggiore attività secernente da parte del tumore che a sua volta accelera la diagnosi o ne favorisce la recidiva. Questa ipotesi è sostenuta dal riscontro di livelli pre-operatori di CLU/24h significativamente più elevati e dall'età più giovane alla diagnosi dei pazienti con corticotropinomi *USP8*-mutati.

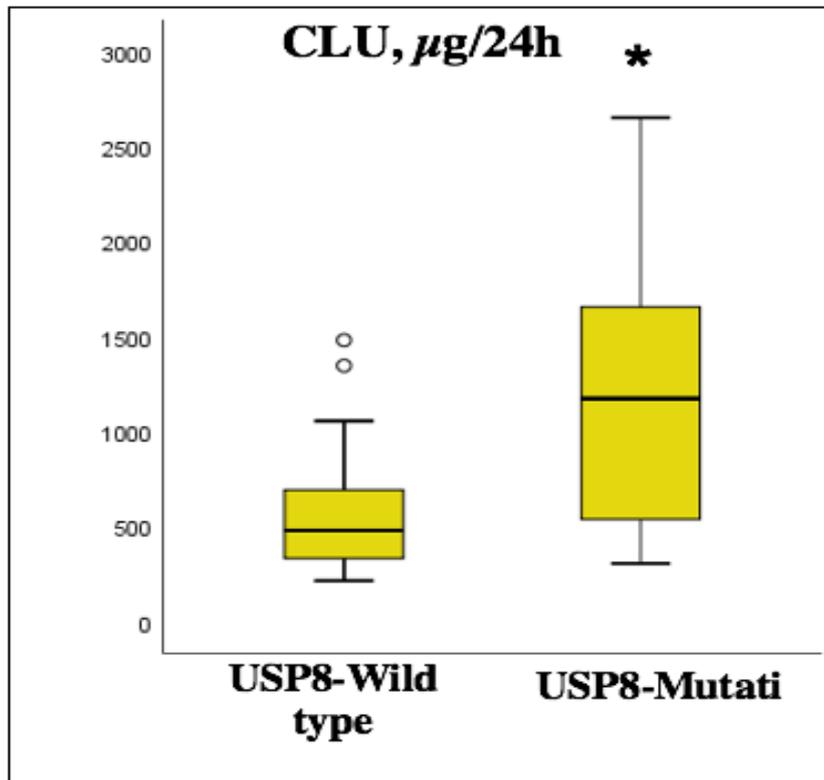
**Tabella 1** Caratteristiche cliniche, biochimiche e radiologiche nei pazienti con corticotropinomi wild-type e USP8-mutati.

	<b>Wild-type</b>	<b>Mutanti</b>	<b>P</b>	<b>Pazienti, n (%)</b>
<b>Età alla diagnosi (media±SD) (anni)</b>	53±11	46±10	<b>0.028</b>	48
<b>Sesso, n (%)</b>				
Femmine	23/38 (60)	15/38 (39)	0.722	
Maschi	7/10 (70)	3/10 (30)		
<b>Dimensioni tumorali, n (%)</b>				
Macroadenomi	8/12 (66)	4/12 (33)	0.463	
Microadenomi	18/27 (66)	9/27 (33)		
Adenoma non visibile	4/9 (44)	5/9 (55)		
<b>Valori ormonali, mediana (IQR)</b>				
UFC/24h	480.0 (405.3)	1174.0 (1184.5)	<b>0.045</b>	24
Basal serum cortisol, ug/24h	25.8 (18.95)	24.9 (7.98)	0.852	31
Basal plasma ACTH, pg/ml	55.3 (34)	80.9 (71.50)	0.116	29

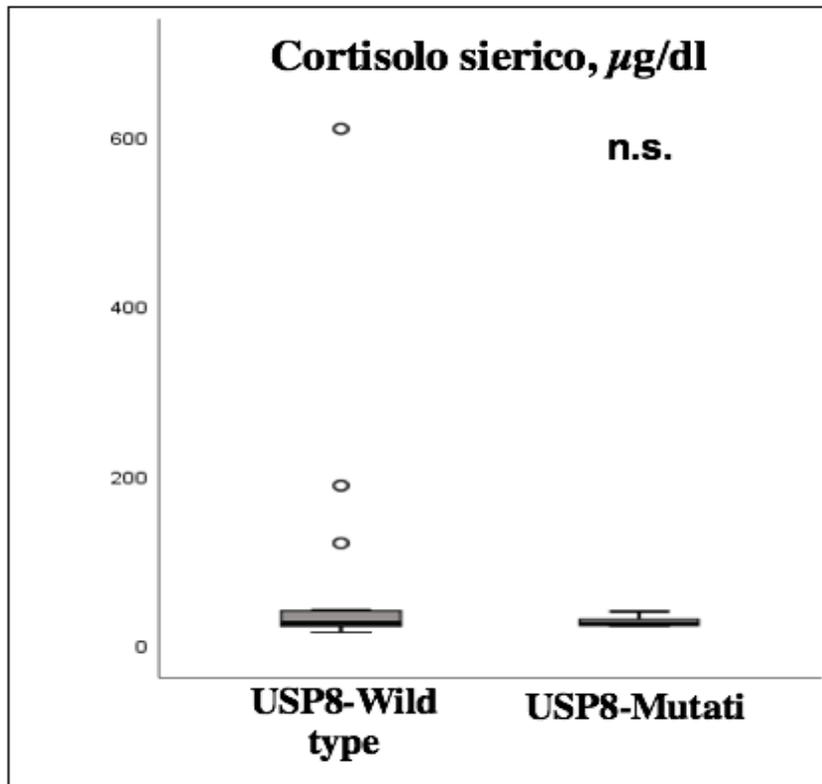
**Tabella 2** *Outcome* post-chirurgico nei pazienti con corticotropinomi wild-type e USP8-mutati.

	<b>Wild-type</b>	<b>Mutanti</b>	<b><i>P</i></b>	<b>Pazienti, n (%)</b>
<b>Remissione biochimica, n (%)</b>	23/30 (76)	16/18 (88)	0.451	39/48 (81)
<b>Recidiva, n (%)</b>	4/22 (18)	7/12 (58)	<b>0.026</b>	11/34 (32)

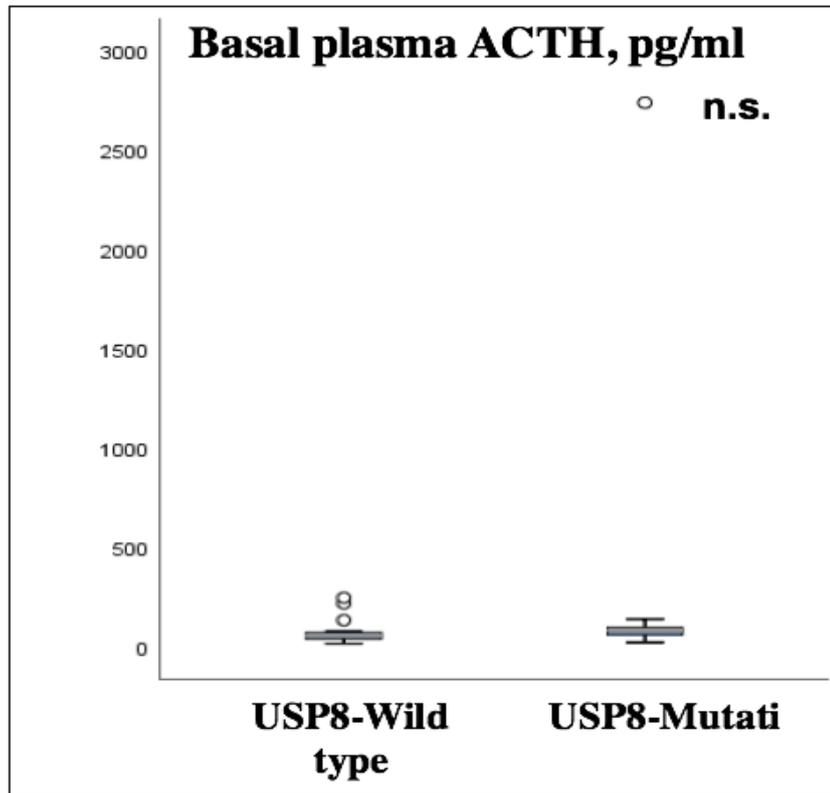
**Figura 1.** Valori medi basali di CLU nei pazienti con tumori wild-type e *USP8*-mutati.



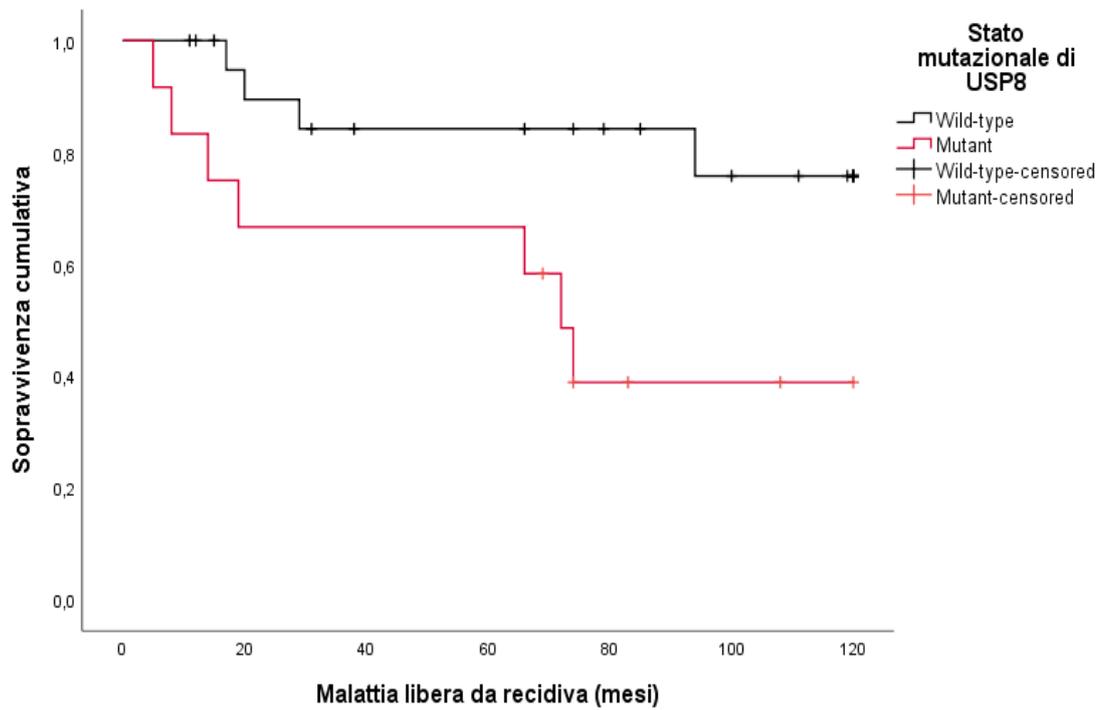
**Figura 2.** Valori medi basali di cortisolo sierico nei pazienti con tumori wild-type e *USP8*-mutati.



**Figura 3.** Valori medi basali di ACTH plasmatico nei pazienti con tumori wild-type e *USP8*-mutati.



**Figura 4.** I pazienti con tumori *USP8*-mutati recidivano significativamente prima rispetto ai pazienti con tumori wild-type ( $P = 0.019$ )



## Bibliografia

1. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006;367(9522):1605-1617.
2. Pivonello R, De Martino MC, De Leo M, Lombardi G, Colao A. Cushing's Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2008;37(1):135-149.
3. Steffensen C, Bak AM, Zøylner Rubeck K, Jørgensen JOL. Epidemiology of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*. Vol 92.; 2010:1-5.
4. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *The Lancet*. 2006;367(9522):1605-1617.
5. Hofmann BM, Hlavac M, Martinez R, Buchfelder M, Müller OA, Fahlbusch R. Long-term results after microsurgery for Cushing disease: experience with 426 primary operations over 35 years. *Journal of Neurosurgery*. 2008;108(1):9-18.
6. Dimopoulou C, Schopohl J, Rachinger W, et al. Long-term remission and recurrence rates after first and second transsphenoidal surgery for Cushing's disease: Care reality in the munich metropolitan region. *European Journal of Endocrinology*. 2014;170(2):283-292.
7. Petersenn S, Beckers A, Ferone D, et al. Therapy of endocrine disease: outcomes in patients with Cushing's disease undergoing transsphenoidal surgery: systematic review assessing criteria used to define remission and recurrence. *European journal of endocrinology*. 2015;172(6):R227-39.
8. Pivonello R, De Leo M, Cozzolino A, Colao A. The treatment of cushing's disease. *Endocrine Reviews*. 2015;36(4):385-486.
9. Saeger W. Surgical Pathology of the Pituitary in Cushing's Disease. *Pathology Research and Practice*. 1991;187(5):613-616.
10. Nieman LK. Cushing's syndrome: Update on signs, symptoms and biochemical screening. In: *European Journal of Endocrinology*. Vol 173. ; 2015:M33-M38.
11. Etxabe J, Vazquez JA. Morbidity and mortality in Cushing's disease: An epidemiological approach. *Clinical Endocrinology*. 1994;40(4):479-484.
12. Pivonello R, Isidori AM, De Martino MC, Newell-Price J, Biller BMK, Colao A. Complications of Cushing's syndrome: State of the art. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2016;4(7):611-629.
13. Feelders RA, Pulgar SJ, Kempel A, Pereira AM. The burden of Cushing's disease: Clinical and health-related quality of life aspects. *European*

*Journal of Endocrinology*. 2012;167(3):311-326.

14. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira a M, et al. Mortality in patients treated for Cushing's disease is increased, compared with patients treated for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92:976-981.
15. van Aken MO, Pereira a M, Biermasz NR, et al. Quality of life in patients after long-term biochemical cure of Cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(6):3279-3286.
16. Andela CD, van Haalen FM, Ragnarsson O, et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. *European Journal of Endocrinology*. 2015;173(1):R1-R14.
17. Clayton RN. Mortality in Cushing's disease. *Acta Endocrinologica*. 2010;6(1):83-90.
18. Dekkers OM, Horvath-Puho E, Jorgensen JO, et al. Multisystem morbidity and mortality in cushing's syndrome: A cohort study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013;98(6):2277-2284.
19. Ntali G, Asimakopoulou a, Siamatras T, et al. Mortality in Cushing's syndrome: systematic analysis of a large series with prolonged follow-up. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2013;169(5):715-723.
20. Albani A, Theodoropoulou M, Reincke M. Genetics of Cushing's disease. *Clinical Endocrinology*. 2018;88(1):3-12.
21. Dworakowska D, Grossman AB. The molecular pathogenesis of corticotroph tumours. *European Journal of Clinical Investigation*. 2012;42(6):665-676.
22. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nature genetics*. 2015;47(1):31-38.
23. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al. Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell Research*. 2015;25(3):306-317.
24. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, et al. The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology*. 2016;174(2):213-226.
25. Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Ferraù F, et al. The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*.

2015;100(7):E997-1004.

26. Faucz FR, Tirosh A, Tatsi C, et al. Somatic USP8 gene mutations are a common cause of pediatric Cushing disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017.
27. Fukuoka H, Cooper O, Ben-Shlomo A, et al. EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(12):4712-4721.
28. Jordan S, Lidhar K, Korbonits M, Lowe DG, Grossman AB. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *European Journal of Endocrinology*. 2000;143(1).
29. Lidhar K, Korbonits M, Jordan S, et al. Low expression of the cell cycle inhibitor p27(kip1) in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(10):3823-3830.
30. Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, et al. Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2010;24:1835-1845.
31. Roussel-Gervais A, Couture C, Langlais D, et al. The cables1 gene in glucocorticoid regulation of pituitary corticotrope growth and cushing disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(2):513-522.
32. Giacomini D, Páez-Pereda M, Theodoropoulou M, et al. Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: Involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology*. 2006;147(1):247-256.
33. Tsukamoto N, Otsuka F, Miyoshi T, et al. Effects of bone morphogenetic protein (BMP) on adrenocorticotropin production by pituitary corticotrope cells: Involvement of up-regulation of bmp receptor signaling by somatostatin analogs. *Endocrinology*. 2010;151(3):1129-1141.
34. Vila G, Theodoropoulou M, Stalla J, et al. Expression and function of sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(12):6687-6694.
35. Vila G, Papazoglou M, Stalla J, et al. Sonic hedgehog regulates CRH signal transduction in the adult pituitary. *FASEB Journal*. 2005;Feb;19(2):281-283.
36. Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *Journal of Endocrinology*. 2004;183:385-

394.

37. Brito LP, Lerário AM, Bronstein MD, Soares IC, Mendonca BB, Fragoso MCBV. Influence of the fibroblast growth factor receptor 4 expression and the G388R functional polymorphism on Cushing's disease outcome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(10):E271-9.
38. Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *The Journal of endocrinology*. 2004;183(2):385-394.
39. Kontogeorgos G, Stefaneanu L, Kovacs K, Cheng Z. Localization of Epidermal Growth Factor (EGF) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFr) in Human Pituitary Adenomas and Nontumorous Pituitaries: An Immunocytochemical Study. *Endocrine pathology*. 1996;7(1):63-70.
40. Páez Pereda M, Lohrer P, Kovalovsky D, et al. Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2000;108(3):202-207.
41. Ray DW, Ren SG, Melmed S. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line: Role of STAT pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(8):1852-1859.
42. Yano H, Readhead C, Nakashima M, Ren S-G, Melmed S. Pituitary-Directed Leukemia Inhibitory Factor Transgene Causes Cushing's Syndrome: Neuro-Immune-Endocrine Modulation of Pituitary Development. *Molecular Endocrinology*. 1998;12:1708-1720.
43. Dahia PL, Honegger J, Reincke M, et al. Expression of glucocorticoid receptor gene isoforms in corticotropin-secreting tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(4):1088-1093.
44. Karl M, Von Wichert G, Kempter E, et al. Nelson's syndrome associated with a somatic frame shift mutation in the glucocorticoid receptor gene. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(1):124-129.
45. Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, et al. Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes and Development*. 2006;20(20):2871-2886.
46. Drouin J, Bilodeau S, Vallette S. Of old and new diseases: Genetics of pituitary ACTH excess (Cushing) and deficiency. *Clinical Genetics*. 2007;72(3):175-182.
47. Riebold M, Kozany C, Freiburger L, et al. A C-terminal HSP90 inhibitor

restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing disease. *Nature Medicine*. 2015.

48. Korbonits M, Bujalska I, Shimojo M, et al. Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: Induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and other pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(6):2728-2733.
49. Du L, Bergsneider M, Mirsadraei L, et al. Evidence for orphan nuclear receptor TR4 in the etiology of Cushing disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(21):8555-8560.
50. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(1):320-323.
51. Bottoni A, Zatelli MC, Ferricin M, et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: A possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;210(2):370-377.
52. Gentilin E, Tagliati F, Filieri C, et al. miR-26a plays an important role in cell cycle regulation in ACTH-secreting pituitary adenomas by modulating protein kinase Cdelta. *Endocrinology*. 2013;154(5):1690-1700.
53. Stilling G, Sun Z, Zhang S, et al. MicroRNA expression in ACTH-producing pituitary tumors: Up-regulation of microRNA-122 and -493 in pituitary carcinomas. *Endocrine*. 2010;38(1):67-75.
54. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1990;71(6):1427-1433.
55. Vergès B, Boureille F, Goudet P, et al. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): Data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(2):457-465.
56. Thakker R V, Newey PJ, Walls G V, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(9):2990-3011.
57. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 1994;367(6461):375-376.
58. Naziat A, Karavitaki N, Thakker R, et al. Confusing genes: a patient with MEN2A and Cushing's disease. *Clinical Endocrinology*. 2013;78(6):966-968.

59. Kasturi K, Fernandes L, Quezado M, et al. Cushing disease in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology: Case Reports*. 2017;4:1-4.
60. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, et al. Brief report: Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(8):3321-3325.
61. Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(5):1826-1834.
62. Lee M, Pellegata NS. Multiple endocrine neoplasia syndromes associated with mutation of p27. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2013;36(9):781-787.
63. Sambugaro S, Di Ruvo M, Ambrosio MR, et al. Early onset acromegaly associated with a novel deletion in CDKN1B 5'UTR region. *Endocrine*. 2015;49(1):58-64.
64. Kirschner LS, Carney J a, Pack SD, et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature genetics*. 2000;26(1):89-92.
65. Correa R, Salpea P, Stratakis CA. Carney complex: An update. In: *European Journal of Endocrinology*. Vol 173.;2015:M85-M97.
66. Kiefer F, Winhofer Y, Iacovazzo D, et al. PRKAR1A mutation causing pituitary-dependent Cushing disease in a patient with Carney complex. *European Journal of Endocrinology*. 2017;May 18(18):17-0227.
67. Hernández-Ramírez LC, Tatsi C, Lodish MB, et al. Corticotropinoma as a Component of Carney Complex. *Journal of Endocrine Society*. 2017;1(7):918-925.
68. Albright F, Scoville B, Sulkowitch HW. Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation, and a gonadal dysfunction. *Endocrinology*. 1938;22(4):411-421.
69. Williamson E, Ince P, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris P. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *European Journal of Clinical Investigation*. 1995;25(2):128-131.
70. Riminucci M, Collins MT, Lala R, et al. An R201H activating mutation of the GNAS1 (Galpha) gene in a corticotroph pituitary adenoma. *Molecular pathology : MP*. 2002;55(1):58-60.

71. Tigas S, Carroll P, Jones R, et al. Simultaneous Cushing's disease and tuberous sclerosis; a potential role for TSC in pituitary ontogeny. *Clinical Endocrinology*. 2005;63(6):694-695.
72. Nandagopal R, Vortmeyer A, Oldfield E, Keil M, Stratakis C. Cushing's syndrome due to a pituitary corticotropinoma in a child with tuberous sclerosis. *Clinical Endocrinology*. 2007;67(4):639-4.
73. Lam HC, Nijmeh J, Henske EP. New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex. *Journal of Pathology*. 2017;241(2):219-225.
74. Slade I, Bacchelli C, Davies H, et al. DICER1 syndrome: Clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2011;48(4):273-278.
75. Doros L, Schultz; KA, Stewart; DR, et al. DICER1-Related Disorders. GeneReviews ®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK196157/>. Published 2014.
76. Scheithauer BW, Kovacs K, Horvath E, et al. Pituitary blastoma. *Acta Neuropathologica*. 2008;116(6):657-666.
77. De Kock L, Sabbaghian N, Plourde F, et al. Pituitary blastoma: A pathognomonic feature of germ-line DICER1 mutations. *Acta Neuropathologica*. 2014;128(1):111-122.
78. Sahakitrungruang T, Srichomthong C, Pornkunwilai S, et al. Germline and somatic DICER1 mutations in a pituitary blastoma causing infantile-onset Cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(8).
79. Scheithauer BW, Horvath E, Abel TW, et al. Pituitary blastoma: A unique embryonal tumor. *Pituitary*. 2012;15(3):365-373.
80. Wildi-Runge S, Bahubeshi A, Carret A-S, et al. New Phenotype in the Familial DICER1 Tumor Syndrome: Pituitary Blastoma Presenting at Age 9 Months. 2011:The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo.
81. McCabe ERB. DAX1: Increasing complexity in the roles of this novel nuclear receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;265-266(SUPPL.):179-182.
82. De Menis E, Roncaroli F, Calvari V, et al. Corticotroph adenoma of the pituitary in a patient with X-linked adrenal hypoplasia congenita due to a novel mutation of the DAX-1 gene. *European Journal of Endocrinology*. 2005;153(2):211-215.

83. Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, et al. High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *European Journal of Endocrinology*. 2011;165(4):509-515.
84. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, et al. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):4101-4105.
85. Cazabat L, Gaillard S, Parker F, et al. Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: Prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97:663-670.
86. Dinesen PT, Dal J, Gabrovská P, et al. An unusual case of an ACTH-secreting macroadenoma with a germline variant in the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) gene. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports*. 2015.
87. Mizuno E, Iura T, Mukai A, Yoshimori T, Kitamura N, Komada M. Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(November):5163-5174.
88. Niendorf S, Oksche A, Kisser A, et al. Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(13):5029-5039.
89. Mizuno E, Kitamura N, Komada M. 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase. *Experimental Cell Research*. 2007;313(16):3624-3634.
90. Song Z-JJ, Reitman ZJ, Ma Z-YY, et al. The genome-wide mutational landscape of pituitary adenomas. *Cell Research*. 2016;26(11):1255-1259.
91. Pérez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Puar TH, et al. Somatic USP8 mutations are frequent events in corticotroph tumor progression causing Nelson's tumor. *European journal of endocrinology*. 2018;178(1):59-65.
92. Pérez-Rivas LG, Oßwald A, Knösel T, et al. Expression and mutational status of USP8 in tumors causing ectopic ACTH secretion syndrome. *Endocrine-related cancer*. 2017.
93. Manoranjan B, Salehi F, Scheithauer BW, Rotondo F, Kovacs K, Cusimano MD. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  immunohistochemical expression: Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Anticancer Research*. 2010;30(7):2897-2904.

94. Chaidarun SS, Swearingen B, Alexander JM. Differential expression of estrogen receptor-beta (ER beta) in human pituitary tumors: functional interactions with ER alpha and a tumor-specific splice variant. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(9):3308-3315.
95. Oomizu S, Honda J, Takeuchi S, Kakeya T, Masui T, Takahashi S. Transforming growth factor- $\alpha$  stimulates proliferation of mammotrophs and corticotrophs in the mouse pituitary. *Journal of Endocrinology*. 2000;165(2):493-501.
96. Jian F, Li Y, Chen Y, et al. Inhibition of Ubiquitin-specific Peptidase 8 Suppresses Adrenocorticotrophic Hormone Production and Tumorous Corticotroph Cell Growth in AtT20 Cells. *Chinese Medical Journal*. 2016;Sep 5;129(17):2102-2108.
97. Chen J, Jian X, Deng S, et al. Identification of recurrent USP48 and BRAF mutations in Cushing's disease. *Nature communications*. 2018;9(1):3171.