



Gene expression of metalloproteinase 11, claudin 1 and selected adhesion related genes in papillary thyroid cancer

Joanna Hucz¹, Małgorzata Kowalska², Michał Jarzab³, Małgorzata Wiench²

¹Molecular Biology,

²Departments of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

³Tumor Biology,

Center of Oncology, Gliwice Branch

Abstract

Introduction: Metastasis and invasiveness of thyroid carcinoma might be correlated with over-expression of genes which encode proteins responsible for cellular adhesion. The aim of our study was to compare by means of real-time Q-PCR expression levels of chosen genes in papillary thyroid carcinoma (PTC) with respect to normal thyroid tissues.

Material and methods: Total RNA was isolated from 38 paired normal and PTC samples. 0.5 µg of RNA was used in the reverse transcription reaction. cDNA was further used in Q-PCR reaction. As endogenous control we used *GUS* gene, as its expression was stable in all analysed samples.

Results: The analyzed genes were found by microarray studies as characteristic in differentiated papillary carcinoma and normal tissue. The levels of gene expression, estimated by quantitative analysis of particular transcripts were increased in papillary thyroid carcinoma with the following average values: 0.76 for *MMP11*; 1.08 for *CLDN1*; 3.98 for *LRP4*; 4.57 for *FLRT3*; 26.6 for *MRC2*; 2.76 for *NRCAM*; and 1.35 for *EVA1* (arbitrary units), whereas in normal thyroid tissues treated as control the respective values were: 0.09; 0.145; 0.7; 0.74; 7.9; 0.85 and 0.396 units. To confirm the over-expression of mentioned genes the conservative Kolmogorov-Smirnov test was used. Differences in expression be-

tween normal thyroid tissue and PTC were statistically significant.

Conclusions: Among the analyzed genes two show the largest difference in expression between papillary thyroid cancer and normal tissue: *MMP11* (metalloproteinase 11) and *CLDN1* (claudin 1). The *MMP11* gene can be characteristic for various malignant thyroid carcinomas, because its increased levels are present also in medullary thyroid carcinomas. It appears that claudin 1 may be used as a marker of PTC, however a verification on independent collection of tumors of this result is required.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 57 (supl. A): A18–A25)

Key words: papillary thyroid cancer, gene expression profile, cell adhesion, Q-PCR



Joanna Hucz, MSc

Department of Molecular Biology, Center of Oncology,
Gliwice Branch

Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice

e-mail: jhucz@io.gliwice.pl



Ekspresja genów metaloproteinazy 11, klaudyny 1 i wybranych genów związanych z adhezją komórek w raku brodawkowatym tarczycy

Joanna Hucz¹, Małgorzata Kowalska², Michał Jarzab³, Małgorzata Wiench²

¹Zakład Biologii Molekularnej,

²Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

³Zakład Biologii Nowotworów,
Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Wstęp: Nadekspresja genów kodujących białka uczestniczące w adhezji komórkowej może być związana z cechami inwazyjności i możliwością przerzutów. Celem pracy było porównanie poziomu ekspresji wybranych genów w rakach brodawkowatych tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) w odniesieniu do odpowiadających im tkanek prawidłowych przy użyciu reakcji Q-PCR w czasie rzeczywistym.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowił całkowity RNA wyizolowany z 38 tkanek raka tarczycy i odpowiadających im tkanek zdrowych. Całkowity RNA w ilości 0,5 µg wykorzystywano w reakcji odwrotnej transkrypcji, z kolei cDNA stanowił matrycę w reakcji Q-PCR. Jako kontrolę wewnętrzną zastosowano gen *GUS*, którego ekspresja była stabilna we wszystkich analizowanych tkankach.

Wyniki: Analizowane geny zostały wytypowane metodą mikromacierzy DNA jako charakterystyczne dla różnicowania PTC od tkanki zdrowej. Poziom ekspresji analizowanych genów, badany poprzez ilościową ocenę odpowiednich transkryptów, był podwyższony w PTC, a jej średnia wartość wynosiła: 1,08 dla *CLDN1*; 3,98 dla *LRP4*; 4,57 dla *FLRT3*; 26,6 dla *MRC2*; 2,76 dla *NRCAM*; 0,76 dla *MMP11* i 1,35 dla *EVA1* w jednostkach arbitralnych, podczas gdy w kontrolnych tkankach zdrowej tarczycy wynosiła odpowiednio: 0,145; 0,7; 0,74; 7,9; 0,85; 0,09; 0,396 jednostek. Dla

potwierdzenia ich nadekspresji metodą Q-PCR zastosowano test Kolmogorowa-Smirnowa. Dla wszystkich genów różnice między tkanką prawidłową a PTC były znamienne statystycznie.

Wnioski: Spośród badanych genów największe różnice w ekspresji między tkanką PTC a zdrową tkanką tarczycy wykazały geny *CLDN1* (klaudyna 1) i *MMP11* (metaloproteinaza 11). Gen *MMP11* można zaliczyć do grupy charakterystycznej dla nowotworów złośliwych tarczycy, lecz bez wskazania na jego rodzaj, ponieważ istotny wzrost jego ekspresji występuje również w raku rdzeniastym tarczycy. Wydaje się, że gen *CLDN1* mógłby być markerem raka brodawkowatego, jednak potrzebna jest weryfikacja przeprowadzonej analizy na dodatkowym materiale.

(*Endokrynol Pol* 2006; 57 (supl. A): A18–A25)

Słowa kluczowe: rak brodawkowaty tarczycy, profil ekspresji genów, adhezja komórkowa, Q-PCR



Mgr Joanna Hucz
Zakład Biologii Molekularnej
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
e-mail: jhucz@io.gliwice.pl

Wstęp

Raki, jakkolwiek molekularnie wysoko heterogenne, mogą wykazywać stabilny, stały wzór ekspresji genów. Do tej grupy należy rak brodawkowaty tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*). Dzięki silnie rozwijającej się w ostatnich latach genomice i wprowadzeniu nowoczesnych metod biologii molekularnej, takich jak mikromacierze DNA, możliwe stało się wskazanie zbioru genów charakterystycznych dla tego typu nowotworu, znacznie różniących się ekspresją w zdrowej tarczycy i w guzie [1, 2]. Liczną grupę w tym zbiorze stanowiły geny kodujące białka związane z adhezją komórkową,

które stały się dla autorów niniejszej pracy przedmiotem badań metodą ilościowej reakcji PCR (Q-PCR). Adhezja komórek odgrywa kluczową rolę w regulacji takich procesów, jak ruch komórki, komunikacja międzykomórkowa czy przekazywanie sygnału [3]. Obecnie wiadomo, że nieprawidłowa adhezja komórkowa jest jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za progresję nowotworową. Adhezja jest regulowana przez wiele grup białek, których rola w dużym stopniu wymaga jeszcze poznania. W raku brodawkowatym często obserwuje się powstawanie przerzutów, co świadczy o zaburzeniach procesu adhezji komórkowej. Oczekuje się, że prowadzone badania oceny ekspresji

Tabela I
Charakterystyka białek kodowanych przez badane geny

Table I
Characteristic of examined genes

Symbol genu	Nazwa białka	Funkcja białka	Źródło
MMP11	Metaloproteinaza 11	— udział w procesach związanych z remodelingiem macierzy międzykomórkowej (proteolizą białek) — hamowanie apoptozy	[11]
CLDN1	Klaudyna 1	— bierze udział w tworzeniu szczelnego zamknięcia (<i>tight junction</i>) pomiędzy komórkami — utrzymanie i regulacja polarności komórkowej i bariery przenikalności	[4, 5]
EVA1	<i>Epithelial V-like antigen 1</i>	— członek nadrodziny immunoglobulin Ig, bierze udział w adhezji komórek	[6]
FLRT3	Bogate w leucynę białko błony komórkowej	— białko o dużej zawartości leucyny — ogólna budowa sugeruje udział w adhezji komórkowej i/lub jako receptor sygnałowy	[7, 8]
LRP4	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 4</i>	— białko z 2 domenami analogicznymi jak w czynniku wzrostu EGF i z 3 domenami jak w receptorach LDL	[9, 10]
MRC2	<i>Mannose receptor C, type 2</i>	— receptor pośredniczący w endo- i fagocytozie (rozpoznanie komórek nowotworowych, aktywacja monocytów i makrofagów)	[12]
NRCAM	Cząsteczka przylegania komórek nerwowych	— białko z rodziny CAM (należą do podzbioru immunoglobulin Ig uwalnianych w systemie nerwowym) — udział w adhezji i przekazywaniu sygnału w neurogenezie	[13, 14]

genów umożliwią w przyszłości pełniejsze określenie funkcji i mechanizmów działania białek uczestniczących w adhezji komórkowej. Może to przyczynić się do opracowania nowych metod rozpoznania i leczenia PTC.

W pracy analizowano ekspresję siedmiu genów związanych z procesem adhezji komórkowej i oddziaływaniem z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, *extracellular matrix*). Są to: *CLDN1*, *EVA1*, *FLRT3*, *LRP4*, *MRC2*, *MMP11* i *NRCAM* (tab. I).

Celem pracy było porównanie poziomu ekspresji badanych genów w prawidłowej tkance tarczycy oraz w PTC, a także raku rdzeniastym (MTC, *medullary thyroid carcinoma*) i guzach łagodnych tarczycy przy pomocy ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Q-PCR).

Materiał i metody

Materiał do badań stanowił całkowity RNA wyizolowany z fragmentów zdrowej i nowotworowo zmienionej tarczycy pobranych podczas zabiegu chirurgicznego od 56 chorych operowanych w Klinice Chirurgii Onkologicznej Instytutu Onkologii w Gliwicach. Wśród pobranych próbek było 38 fragmentów PTC, 14 — MTC i 4 — guza łagodnego tarczycy oraz w większości odpowiadające im fragmenty zdrowej tarczycy (42 tkan-

ki). Analizie poddano materiał pobrany od 43 kobiet i 13 mężczyzn. Średnia wieku chorych wynosiła 36 lat (zakres 5–78 lat). Badanie zostało zaaprobowane przez Komisję Etyczną Instytutu Onkologii w Gliwicach, a wszystkie osoby badane wyraziły pisemną zgodę.

Całkowite RNA wyizolowano przy użyciu zestawu RNeasy Midi Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie oczyszczono i trawiono DNazą I za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Syntezę cDNA przeprowadzono na matrycy wyizolowanego całkowitego RNA, wykorzystując do tego celu zestaw cDNA Omniscript (Qiagen).

Ilościową reakcję PCR (Q-PCR) przeprowadzono na 96 dołkowych płytkach w aparacie ABI PRISM 7700 Sequence Detection System przy użyciu zestawu Master Mix Kit (Applied Biosystems). Syntetyczne oligonukleotydy zastosowane w reakcji zostały zakupione w postaci gotowych mieszanin *Assays-on-Demand* (Applied Biosystems), które zawierają przygotowane i sprawdzone zestawy starterów oraz sond dla poszczególnych genów: *EVA1* (Hs00170684), *CLDN1* (Hs00221623), *LRP4* (Hs00323496), *FLRT3* (Hs00183798), *MRC2* (Hs00195862), *NRCAM* (Hs00171554), *MMP11* (Hs00171829). Do każdej sondy przyłączony był barwnik reporterowy (FAM) i wygaszacz (*non fluorescent quencher*). Otrzymane wyniki ekspresji analizowanych genów poddano norma-

lizacji względem kontroli endogennej, którą stanowił gen *GUS* kodujący β -glukuronidazę. Sonda dla *GUS* zawierała barwnik reporterowy VIC i wygaszacz TAMRA.

Ekspresję w dwóch grupach (tkanki zdrowe–tkanki nowotworowe) w układzie nieparametrycznym porównywano za pomocą konserwatywnego testu Kolmogorowa-Smirnowa. Ekspresję między wieloma genami niepowiązanymi w podgrupach: tkanka zdrowa, PTC, tkanka zdrowa, MTC oraz guzy łagodne porównywano za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Za istotne statystycznie przyjęto różnice o poziomie istotności $p < 0,002$.

Wyniki

Wszystkie badane geny wykazały wzrost ekspresji w PTC w porównaniu z tkanką prawidłową tarczycy (tab. II). Najwyższy wzrost ekspresji w PTC, prawie ośmiokrotny, zaobserwowano w przypadku genów *CLDN1* i *MMP11*, nieco niższe w genach *FLRT3*, *LRP4*, *EVA1*, *MRC2* i *NRCAM*.

W toku dalszych analiz porównano ekspresję każdego z genów w pięciu podgrupach: 1. tkanki zdrowe dla PTC, 2. PTC, 3. tkanki zdrowe dla MTC, 4. MTC, 5. gruczolaki. Badane geny można było zaklasyfikować do jednej z dwóch grup:

1. geny charakterystyczne tylko dla PTC: *CLDN1*, *EVA1*, *LRP4* i w mniejszym stopniu *MRC2*. W tkankach MTC nie zaobserwowano różnic w ekspresji tych genów w porównaniu z tkankami prawidłowymi (ryc. 1);
2. geny charakterystyczne dla nowotworów złośliwych: *MMP11* i *NRCAM* wykazywały wzrost ekspresji zarówno w PTC, jak i w MTC. Do tej grupy

zaliczono także gen *FLRT3*, dla którego zaobserwowano różny kierunek zmian ekspresji: wzrost w PTC i spadek w MTC (ryc. 2).

Odnotowano przy tym, że ekspresja badanych genów (z wyjątkiem genu *NRCAM*) w gruczolakach pęcherzykowych, czyli guzach łagodnych, nie różni się istotnie od ekspresji obserwowanej w tkankach prawidłowych (ryc. 1 i 2).

Dyskusja

W zmienionym nowotworowo tyreocycie ekspresja niektórych genów jest hamowana, podczas gdy innych znacznie podwyższona [15–17]. Wyniki badań mikromacierzowych [1, 2, 18] wskazały, że dla wielu z genów, które wykazują zmienioną ekspresję w PTC, ich produkty białkowe związane są z procesami inwazji nowotworu, w tym z adhezją komórkową. Adhezja jest regulowana przez wiele grup białek, których funkcja wymaga jeszcze dokładniejszego poznania. Nieprawidłowa adhezja komórkowa i zmiany w interakcji komórek z macierzą międzykomórkową (ECM) są jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie przerzutów. Można więc zakładać, że ocena ekspresji genów związanych z adhezją komórkową i ECM może stanowić przesłankę dla dalszego poszukiwania markerów ryzyka rozwoju bardziej inwazyjnej i agresywnej formy PTC.

Bezpośrednim celem przeprowadzonych badań nie było jednak ustalenie roli tych genów w patogenezie PTC, ani poszukiwanie markerów inwazyjności, lecz identyfikacja takich, które bez względu na funkcję, jaką pełnią, pozwoliłyby na różnicowanie PTC od prawidłowej tarczycy. Sprawdzone także, jak te same geny zachowują się w MTC i łagodnych gruczolakach tarczycy.

Tabela II

Wartości względne odzwierciedlające ekspresję poszczególnych genów w tkankach zdrowej tarczycy i w PTC, uzyskane po znormalizowaniu wyników względem kontroli wewnętrznej *GUS*

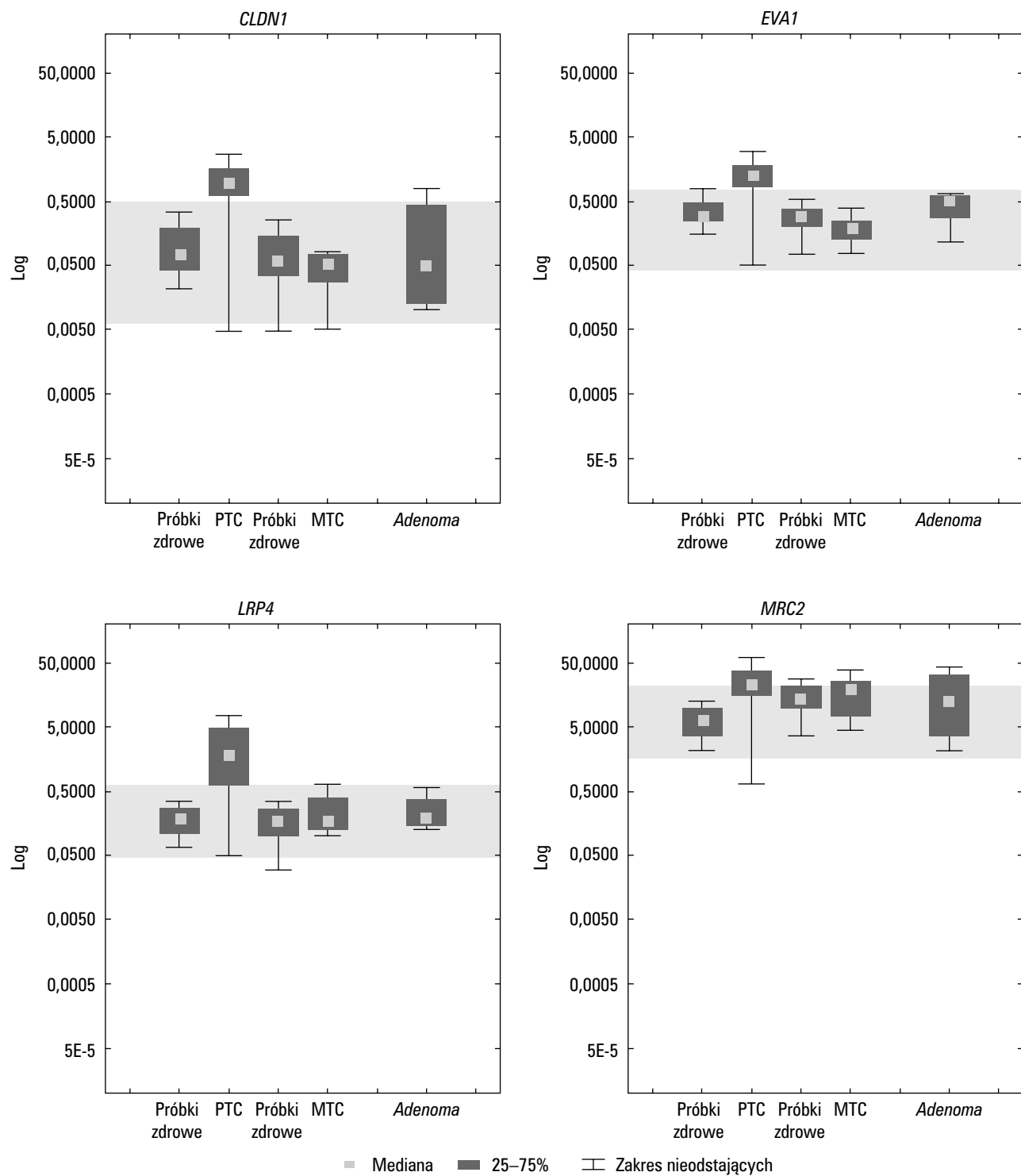
Table II

Relative expression of investigated genes in normal thyroid and in PTC (normalized by *GUS* expression)

	Średnia wartość (tarczycza zdrowa)	Odchylenie standardowe (tarczycza zdrowa)	Średnia wartość (PTC)	Odchylenie standardowe (PTC)
<i>CLDN1</i>	0,145	0,222	1,084	0,704
<i>EVA1</i>	0,396	0,262	1,350	0,787
<i>FLRT3</i>	0,742	0,904	4,571	15,227
<i>LRP4</i>	0,708	2,660	3,985	4,984
<i>MMP11</i>	0,097	0,100	0,760	0,803
<i>MRC2</i>	7,903	5,572	26,643	15,509
<i>NRCAM</i>	0,858	0,442	2,767	1,855

test Kolmogorowa-Smirnowa, $p < 0,002$

PTC (*papillary thyroid carcinoma*) — rak brodawkowy tarczycy

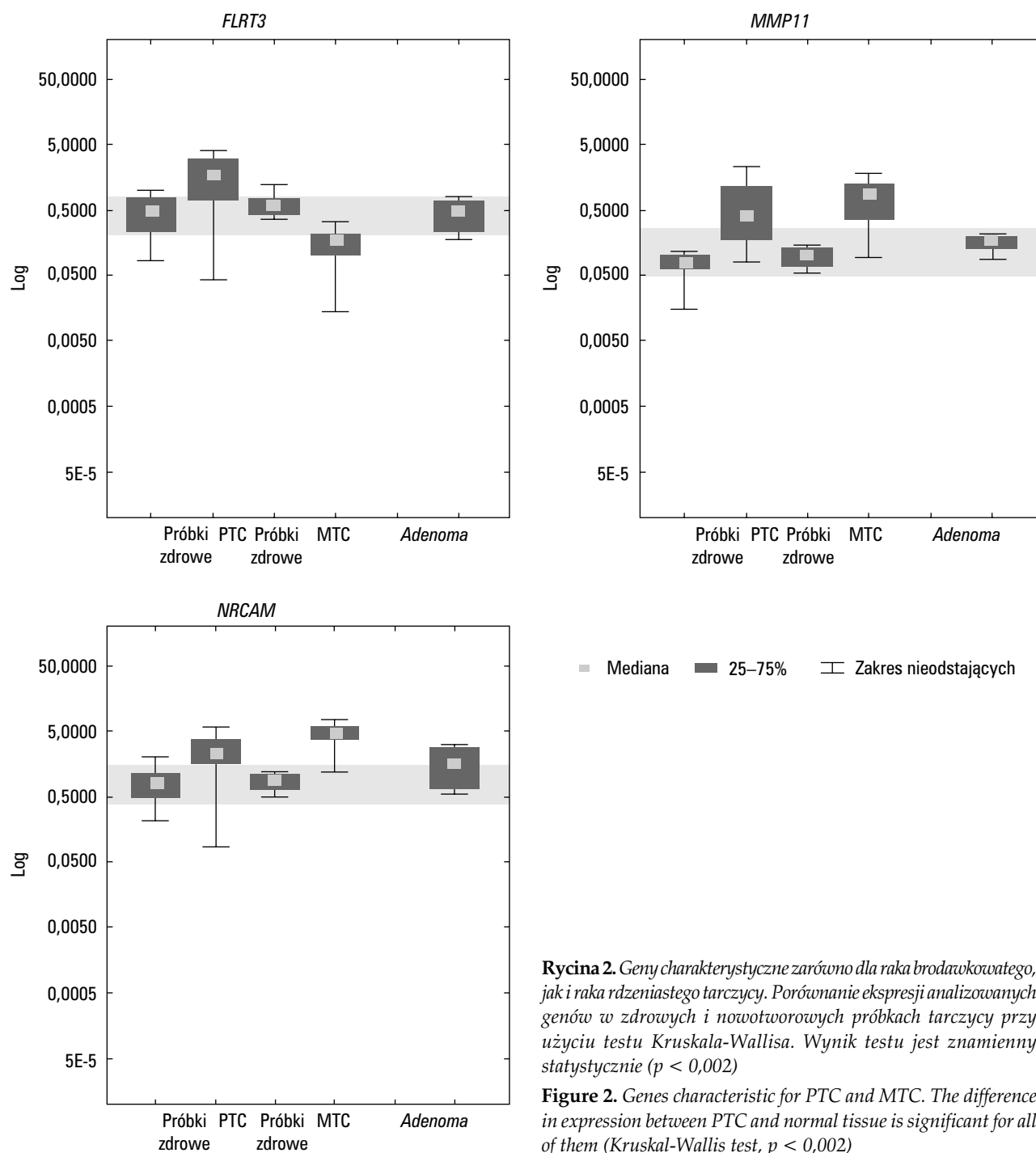


Rycina 1. Geny charakterystyczne dla raka brodawkowatego tarczycy. Ekspresja analizowanych genów w zdrowych i nowotworowych próbkach tarczycy różni się znacząco (test Kruskala-Wallis, $p < 0,002$); PTC (papillary thyroid carcinoma) — rak brodawkowaty tarczycy; MTC (medullary thyroid carcinoma) — rak rdzeniasty tarczycy

Figure 1. Genes characteristic for PTC (papillary thyroid carcinoma). The difference in expression between PTC and normal tissue is significant for all of them (Kruskal-Wallis test, $p < 0,002$)

Wszystkie badane przez autorów niniejszej pracy geny wykazały nadekspresję w PTC w porównaniu ze zdrową tarczycą, z czego cztery (CLDN1, EVA1, LRP4, MRC2) okazały się charakterystyczne wyłącznie dla PTC. Pozostałe trzy, tj. FLRT3, MMP11 i NRCAM, wykazały

zaburzenia w ekspresji w obu typach nowotworów złośliwych tarczycy, zarówno w PTC, jak i w MTC. Gen MMP11, który koduje metaloproteinazę 11, wykazał około 8-krotny wzrost ekspresji zarówno w PTC, jak i w MTC. Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskane przez Wa-



Rycina 2. Geny charakterystyczne zarówno dla raka brodawkowatego, jak i raka rdzeniastego tarczycy. Porównanie ekspresji analizowanych genów w zdrowych i nowotworowych próbkach tarczycy przy użyciu testu Kruskala-Wallisa. Wynik testu jest znamieny statystycznie ($p < 0,002$)

Figure 2. Genes characteristic for PTC and MTC. The difference in expression between PTC and normal tissue is significant for all of them (Kruskal-Wallis test, $p < 0,002$)

seniusa i wsp. [17], którzy zasugerowali powiązanie nadekspresji *MMP11* w PTC z cechami inwazyjności i możliwością przerzutowania. Należy przy tym zwrócić uwagę, że ocenę ekspresji tego genu przeprowadzili oni za pomocą metody makromacierzy, a potwierdzili badaniem immunohistochemicznym (nie metodą Q-PCR). Nadekspresję *MMP11* zaobserwowano w wielu innych nowotworach, m.in. w raku piersi, płuca i jelita grubego [19–21]. Sugerowano jednocześnie, że wzrost ekspresji tego genu jest jednym z wczesnych zaburzeń obserwowanych

w złośliwych nowotworach człowieka i może odgrywać istotną rolę w progresji nowotworowej [22, 23].

Gen *NRCAM* (*N-CAM*), kodujący białko z rodziny *NCAM* (*neural cell adhesion molecule*), również wykazał wzrost ekspresji w obu typach raków tarczycy. Badania różnych typów nowotworów, m.in. raków głowy i szyi [24, 25], trzustki [26], pęcherzyka żółciowego [27], wskazują na korelację pomiędzy nadekspresją *NRCAM* a przerzutowaniem. Podwyższoną ekspresję *NRCAM* kojarzono również z bardziej agresywną formą raka

nerki [28] i ze złym rokowaniem co do przeżycia w nowotworach trzustki [29].

Bardzo interesująca okazała się ekspresja genu *FLRT3*. W PTC wykazał on wzrost ekspresji (około 6-krotny), natomiast w MTC odwrotnie — 3,5-krotny spadek ekspresji. Gen ten koduje białko, którego ogólna budowa sugeruje udział w adhezji komórkowej i/lub jako receptor sygnałowy, jednakże do chwili obecnej nie poznano pełnej funkcji tego białka, ani też nie wykazano powiązań pomiędzy zmianą ekspresji w zdrowych i nowotworowo zmienionych tkankach.

Z kolei w analizie genów charakterystycznych tylko i wyłącznie dla PTC (brak zmienionej ekspresji w MTC w porównaniu z odpowiadającą mu tkanką prawidłową) na szczególną uwagę zasługuje gen *CLDN1* kodujący kładynę 1. Gen ten należy do rodziny kładyn, liczącej obecnie 24 członków, typowych białek adhezyjnych, które biorą udział w budowie szczelnego zamknięcia typu *tight junction*, ważnego w utrzymaniu i regulacji polarności komórkowej oraz bariery przepuszczalności [5]. Różnice w ekspresji poszczególnych członków rodziny *CLDN* zależą od typu komórek i tkanek [5]. Wśród przeanalizowanych przez autorów pracy genów, *CLDN1* wykazał najwyższy wzrost ekspresji w PTC. Ekspresja tego genu wzrasta także w innych nowotworach, wykazano na przykład, że śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy charakteryzuje się bardzo wysoką ekspresją tego genu w porównaniu z komórkami tkanki prawidłowej, podczas gdy w zaawansowanych, agresywnych formach nowotworu szyjki macicy obserwowano spadek ekspresji tego genu [5]. Sobel i wsp. [5] sugerują, że *CLDN1* może pomóc w diagnozowaniu wczesnego raka szyjki macicy. Znacznie podwyższony poziom ekspresji kładyny 1 odnotowano także w raku okrężnicy, gdzie zaobserwowano korelację pomiędzy wzrostem ekspresji kładyny 1 a progresją i przerzutowaniem tego typu nowotworu, co sugeruje, iż kładyna 1 odgrywa kluczową rolę w procesie transformacji i inwazji [30]. Dhawan i wsp. [30] proponują, by kładyna 1 stała się markerem tego typu nowotworu. Najnowsze badania ekspresji genów w PTC: klinicznie agresywnych (nisko zróżnicowane) i klasycznych (dobrze zróżnicowane) wykazały, iż podwyższony poziom ekspresji *CLDN1* jest charakterystyczny tylko dla klasycznej postaci PTC, co może być związane ze zmianą polarności komórkowej w nisko zróżnicowanych PTC i może pomóc w różnicowaniu bardziej agresywnych postaci PTC [18]. Wydaje się, że należałoby również przeprowadzić ocenę poziomu ekspresji genu *CLDN1*, stosując podział zaproponowany przez Fluge'a i wsp. [18]. Może się okazać, że gen *CLDN1* będzie dobrym markerem prognostycznym PTC.

Pozostałe geny, dla których zaobserwowano różnice w ekspresji pomiędzy tkanką prawidłową a PTC,

wykazały kilkukrotny wzrost ekspresji w badaniu Q-PCR. Są to geny: *LRP4*, *EVA1* i *MRC2*. Ich funkcja nie jest dobrze poznana.

Zrozumienie mechanizmów działania białek związanych z adhezją komórkową i ECM w PTC oraz w innych nowotworach tarczycy może pozwolić w przyszłości na stworzenie wielogenowego klasyfikatora molekularnego dostarczającego informacji o znaczeniu diagnostycznym i predykcyjnym. Ocena ekspresji takich markerów molekularnych pozwoliłaby odpowiednio prognozować, jakie jest ryzyko rozwinięcia się bardziej inwazyjnej i agresywnej formy PTC, a przez to zaplanować rozległość zabiegu operacyjnego oraz wybrać odpowiednią metodę dalszego leczenia.

Wnioski

Spośród badanych genów związanych z adhezją komórkową i macierzą międzykomórkową, największe różnice w ekspresji między rakiem brodawkowym a tkanką zdrową tarczycy wykazały geny *CLDN1* (kodujący kładynę 1) i *MMP11* (kodujący metaloproteinazę 11).

Kładyna 1 może pełnić rolę markera molekularnego PTC. Metaloproteinaza 11 może być stosowana jako marker złośliwości guza tarczycy, lecz bez wskazania na jego histotyp, ponieważ istotny wzrost jej ekspresji występuje również w MTC.

Piśmiennictwo

- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ i wsp. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15044–15049.
- Jarząb B, Wiench M, Fajarszewicz K i wsp. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005; 65: 1587–1597.
- Alberts B, Bray D, Johnson A i wsp. Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- Kramer F, White K, Kubbies M i wsp. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet* 2000; 107: 249–256.
- Sobel G, Paska C, Szabo I i wsp. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol* 2005; 36: 162–169.
- Guttinger M, Sutti F, Panigada M i wsp. Epithelial V-like antigen (EVA), a novel member of the immunoglobulin superfamily, expressed in embryonic epithelia with a potential role as homotypic adhesion molecule in thymus histogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141: 1061–1071.
- Lacy SE, Bonnemant CG, Buzney EA i wsp. Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: a novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins. *Genomics* 1999; 62: 417–426.
- Chen Y, Aulia S, Li L i wsp. AMIGO and friends: An emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Rev* 2006; 51: 265–274.
- Nakayama M, Nakajima D, Nagase T i wsp. Identification of high-molecular-weight proteins with multiple EGF-like motifs by motif-trap screening. *Genomics* 1998; 51: 27–34.
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ i wsp. Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 979–984.
- Kraiem Z, Korem S. Matrix metalloproteinases and the thyroid. *Thyroid* 10: 1061–1069.
- Musiani S, Battelli MG. Mannose receptor determination by an ELISA-like method. *J Biochem Biophys Methods* 2003; 55: 121–125.
- Lane RP, Chen XN, Yamakawa K i wsp. Characterization of a highly conserved human homolog to the chicken neural cell surface protein

- Bravo/Nr-CAM that maps to chromosome band 7q31. *Genomics* 1996; 35: 456–465.
14. Li R, Wheeler T, Dai H i wsp. Neural cell adhesion molecule is upregulated in nerves with prostate cancer invasion. *Hum Pathol* 2003; 34: 457–461.
 15. Belfiore A, Gangemi P, Costantino A. Negative/low expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor identifies papillary thyroid carcinomas with high risk of distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2322–2328.
 16. Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 1994; 15: 202–222.
 17. Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E i wsp. Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: A CDNA and Tissue Microarray Study. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 68–75.
 18. Fluge O, Bruland O, Akslen LA i wsp. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006; 16: 161–175.
 19. Basset P, Bellocq JP, Wolf C i wsp. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699–704.
 20. Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A i wsp. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 1992; 66: 1188–1194.
 21. Johnson LD, Hunt DM, Kim K i wsp. Amplification of stromelysin-3 transcripts from carcinomas of the colon. *Hum Pathol* 1996; 27: 964–968.
 22. Bolon I, Brambilla E, Vandebunder B i wsp. Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions. *Lab Invest* 1996; 75: 1–13.
 23. Soni S, Mathur M, Shukla NK i wsp. Stromelysin-3 expression is an early event in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer* 2003; 309–316.
 24. McLaughlin RB, Montone KT, Wall SJ i wsp. Nerve cell adhesion molecule expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: A predictor of propensity toward perineural spread. *Laryngoscope* 1999; 109: 821–826.
 25. Vural E, Hutcheson J, Korourian S i wsp. Correlation of neural cell adhesion molecule with perineural spread of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122: 717–720.
 26. Kenmotsu M, Gochi A, Ischii H i wsp. Relationship between perineural invasion and expression of neuro-endocrine markers and neural cell adhesion molecule in human pancreatic carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1990; 91: 1759.
 27. Seki H, Koyama K, Tanaka J i wsp. Neural cell adhesion molecule and perineural invasion in gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 1995; 58: 97–100.
 28. Zocchi MR, Ferrero E, Toninelli E i wsp. Expression of N-CAM by human renal cell carcinomas correlates with growth rate and adhesive properties. *Exp Cell Res* 1994; 217: 499–509.
 29. Tezel E, Kawase Y, Takeda S i wsp. Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer. *Pancreas* 2001; 22: 122–125.
 30. Dhawan PD, Singh AB, Deane NG i wsp. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 1765–1776.