



Gene expression analysis by DNA microarray in papillary thyroid cancer

Dr n. med. Elżbieta Gubała¹, dr n. med. Małgorzata Wiench¹, mgr Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹, dr n. med. Dariusz Lange², dr n. med. Jan Włoch³, lek. Agnieszka Czarniecka³, lek. Ewa Chmielik², mgr Barbara Nikiel², dr n. med. Zbigniew Wygoda¹, dr n. med. Aleksandra Kukulska¹, dr n. med. Daria Handkiewicz-Junak¹, lek. Sylwia Szpak-Ulczo¹, lek. Aleksandra Krawczyk¹, dr n. med. Józef Roskosz¹, prof. dr hab. n. med. Barbara Jarząb¹

¹Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, ²Department of Tumor Pathology, ³Clinic of Oncologic Surgery, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Summary

In our study we present chosen elements of microarray analysis of gene expression profile in papillary thyroid cancer. The study group included 16 papillary thyroid cancer tissues and 16 corresponding normal tissues. Samples were analyzed on high density oligonucleotide microarrays (GeneChip HG-U133A) which contain 22,000 genes. 110 genes, which had significant changed expression, were selected by MAS 5.0 program. 3 genes were chosen to the deeper analysis: dipeptidylpeptidase 4 (DPP4), fibronectin 1 (FN1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1). DPP4-RNA were absent

in normal tissue while in cancer tissue it was detected in large amount. FN1 and TIMP1 expression were detected in normal tissue but markedly increased in papillary thyroid cancer. Among these 3 genes DPP4 seems to be the best molecular marker for papillary thyroid cancer.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 5(56): 752-757)

Key words: microarrays, papillary thyroid cancer, gene expression

Analiza ekspresji wybranych genów w raku brodawkowym tarczycy techniką mikromacierzy DNA

Dr n. med. Elżbieta Gubała¹, dr n. med. Małgorzata Wiench¹, mgr Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹, dr n. med. Dariusz Lange², dr n. med. Jan Włoch³, lek. Agnieszka Czarniecka³, lek. Ewa Chmielik², mgr Barbara Nikiel², dr n. med. Zbigniew Wygoda¹, dr n. med. Aleksandra Kukulska¹, dr n. med. Daria Handkiewicz-Junak¹, lek. Sylwia Szpak-Ulczo¹, lek. Aleksandra Krawczyk¹, dr n. med. Józef Roskosz¹, prof. dr hab. n. med. Barbara Jarząb¹

¹Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, ²Zakład Patologii Nowotworów, ³Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

W pracy przedstawiamy wybrane elementy analizy profilu ekspresji raka brodawkowego tarczycy, przeprowadzonej przez nas u 16 chorych na raka brodawkowego tarczycy. U wszystkich z nich przeprowadzono dwa badania profilu ekspresji – jedno w RNA izolowanym z guza, drugie w RNA izolowanym z niezmięnionej makroskopowo tkanki tarczycy. Badanie przeprowadzono na mikromacierzach oligonukleotydowych wysokiej gęstości HG-U133A zawierających 22 tysiące ludzkich genów, selekcyjnie przy użyciu programu MAS 5.0 110 genów, których ekspresja była w znaczący sposób zmieniona we wszystkich 16 parach. Dalszej analizie poddano wybrane 3 geny – gen peptydazy dipeptydylowej IV (DPP4), gen fibronektyny 1 (FN1) oraz gen tkankowego inhibitora metaloproteiny typu 1 (TIMP1). DPP4 - RNA był praktycznie nieobecny w tkankach zdrowych, natomiast w tkankach raka

brodawkowego tarczycy był wykrywany w bardzo dużej ilości. Pozostałe dwa geny wykazały znaczącą ekspresję w tkance zdrowej i jej bardzo wyraźne wzmocnienie w raku tarczycy. Dlatego spośród tych trzech genów największe znaczenie jako marker raka brodawkowego tarczycy na poziomie RNA wydaje się mieć gen DPP4.

(*Endokrynol Pol* 2005; 5(56): 752-757)

Słowa kluczowe: mikromacierze, rak brodawkowy tarczycy, ekspresja genów



prof. dr hab. n. med. Barbara Jarząb
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice

Wstęp

Badanie profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA jest jednym z najnowocześniejszych narzędzi, jakim dysponujemy dzięki zsekwencjonowaniu ludzkiego genomu. Sondy dla wykrycia ekspresji poszczególnych genów są nakładane lub syntetyzowane *in situ* na bardzo niewielkiej powierzchni, tak że na jednym szkiełku mieści się ich tysiące. W ten sposób, poprzez nałożenie ekstraktu z guza nowotworowego możemy analizować, które geny uległy aktywacji a które zostały wyciszone. W takiej analizie potrzebujemy porównania badania guza do wyników uzyskanych w tkance zdrowej. Możemy je wykonać albo nakładając obydwa ekstrakty jednocześnie na tę samą mikromacierz – obecne w nich transkrypty konkurują wtedy o te same sondy genowe – albo wykonując dwa równoległe oznaczenia na dwóch osobnych mikromacierzach.

Stosując tę technikę, już w 2001 roku wykazano, iż profil ekspresji raka brodawkowego tarczycy jest stosunkowo stabilny [1], a ostatnio ukazało się kilka prac typujących zestawy genów o znaczeniu diagnostycznym [2-5]. W naszym Zakładzie rozpoczęliśmy także badania ekspresji genów raka tarczycy [6,7]. Niniejsza praca porusza wybrane aspekty analizy porównawczej uzyskanych wyników, których zrozumienie jest konieczne dla wytypowania zestawów genów użytecznych dla ostatecznego celu badania.

Materiał i metody

Materiał stanowiło 16 guzów i 16 tkanek zdrowych, pobranych śródoperacyjnie u chorych operowanych z powodu raka brodawkowego tarczycy, przy czym wstępne rozpoznanie zostało potwierdzone w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym u wszystkich z nich. Zestaw ten służył jako tak zwany zestaw uczący (dokonywane były na nim różne analizy bioinformatyczne dla wytypowania najlepszego zestawu genów, praca przyjęta do druku w Cancer Research). Na prowadzenie badań uzyskaliśmy zgodę Komisji Etycznej.

Całkowity RNA izolowany był przy pomocy RNeasy Midi i Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany) z 100-150 mg tkanki, uprzednio poddanej homogenizacji. Jakość otrzymanego RNA analizowano za pomocą bioanalizatora typ 2100 (Agilent) oraz poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym.

Materiałem wyjściowym do analizy był całkowity RNA w ilości 5-8 µg zawierający mRNA, na matrycy którego syntetyzowano dwuniciowe cDNA, a później po fragmentacji uzyskany cRNA hybrydował ze specyficznymi sondami oligonukleotydowymi na mikromacierzy Human Genome U133A array (Affymetrix) w obecności buforu hybrydacyjnego oraz odczynników zapewniających specyficzną reakcję (BSA, Herring Sperm)

Wyniki badań opracowano za pomocą programu MAS 5.0 dostarczonego przez firmę Affymetrix oraz programu Genespring. Oceniano stosunek ekspresji genu w tkance guza i tkance prawidłowej tarczycy, a następnie wyliczano medianę dla tego stosunku. Wykonano także porównanie testem t Welch.

Wyniki

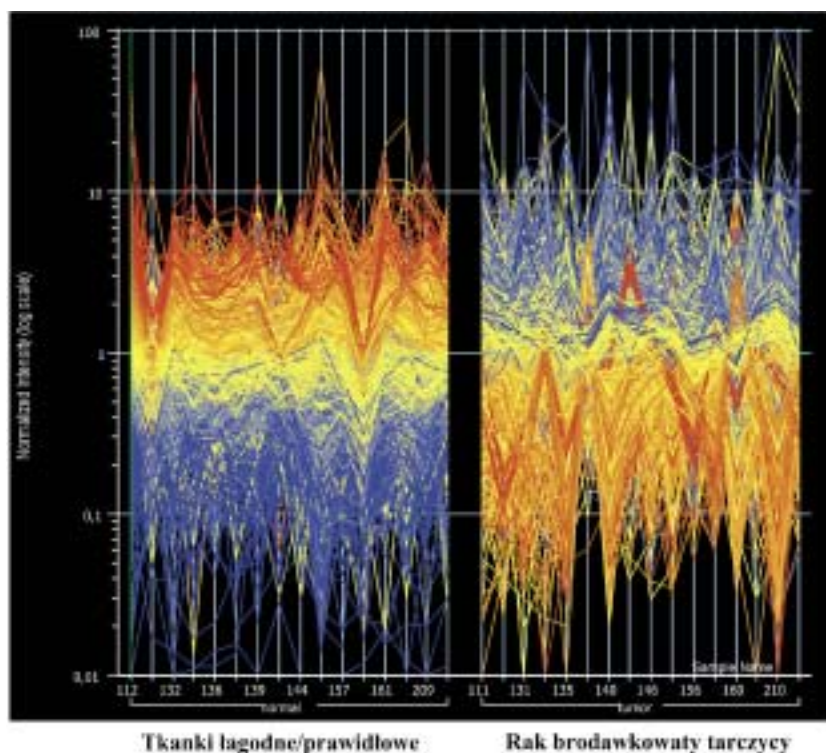
Przeprowadzona analiza wykazała, że profil ekspresji raka brodawkowego tarczycy bardzo wyraźnie różni się od otaczającej tkanki zdrowej. Przy poziomie istotności $p < 0.01$ z poprawką na wielokrotne analizy wyodrębniono testem Welch ponad 1800 genów wykazujących znamienne statystycznie różnicę ekspresji między guzami nowotworowymi a tkanką zdrową. Przebieg ekspresji tych genów pokazano na ryc. 1, która bardzo wyraźnie obrazuje, że istnieją zarówno geny, których nadekspresja w raku jest zwiększona w stosunku do tkanki zdrowej tarczycy, jak i geny, których ekspresja jest zahamowana. Niezależnie od tej podstawowej różnicy obserwuje się jednak bardzo wyraźną zmienność ekspresji wyselekcjonowanych genów, i to zarówno w obrębie tkanek nowotworowych jak i tych tkanek tarczycy, które nie uległy transformacji nowotworowej. Konieczne jest więc podjęcie dalszych analiz dla wytypowania tych genów, których ekspresja stanowi najistotniejszą różnicę dla porównania guz/tkanka zdrowa.

Żeby wstępnie wyselekcjonować zestaw genów do dalszych analiz, przeprowadzono porównanie za pomocą programu MAS 5.0. W tej analizie wytypowano 110 genów, które wykazywały znamienne różnicę w ekspresji między rakami brodawkowatymi a tkankami zdrowymi, przyjmując warunek, że w każdej badanej parze guz/tkanka zdrowa ta różnica w ekspresji musiała być znamienna (w ocenie testem Manna-Whitney'a przy $p < 0.025$) (ryc. 2, ryc.2a)

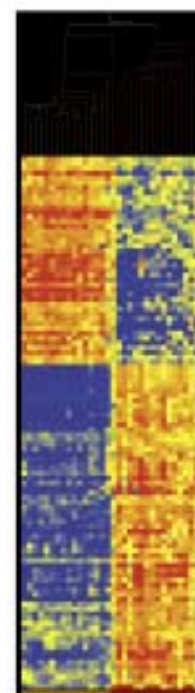
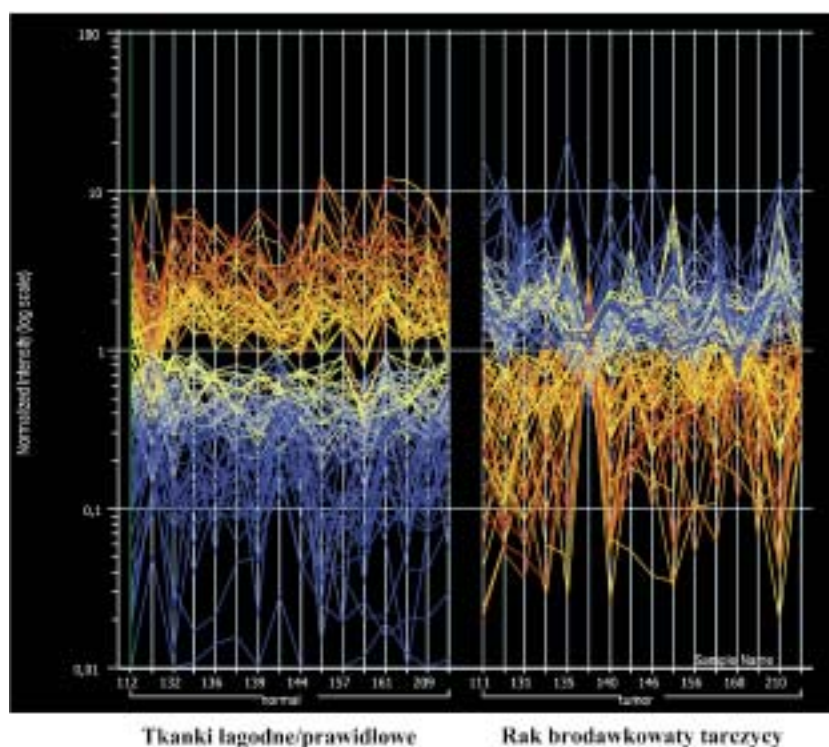
Genem, który wykazywał najwyraźniejsze zmiany w ekspresji, okazał się gen dla DPP4. Ta proteaza serynowa, zwana peptydazą dipeptydylową IV, uczestniczy w inaktywacji wielu cytokin i chemokin. Gen DPP4 praktycznie nie ulegał aktywacji w prawidłowej tkance tarczycy, jego ekspresja w tkance raka była natomiast wyraźnie zwiększona, a jej mediana wynosiła 171 (ryc. 3). W stosunku do tkanki zdrowej obserwowano 137-krotne zwiększenie ekspresji.

Na ryc. 4 przedstawiono analogiczną analizę dla dwóch innych genów wykazujących bardzo silny wzrost ekspresji w raku brodawkowym tarczycy: fibronektyny 1 i tkankowego inhibitora metaloproteinaz typu 1 (TIMP1).

Gen fibronektyny 1 (FN1), kodujący glikoproteinę uczestniczącą w procesach adhezji komórkowej, wykazywał znaczącą ekspresję w tkance



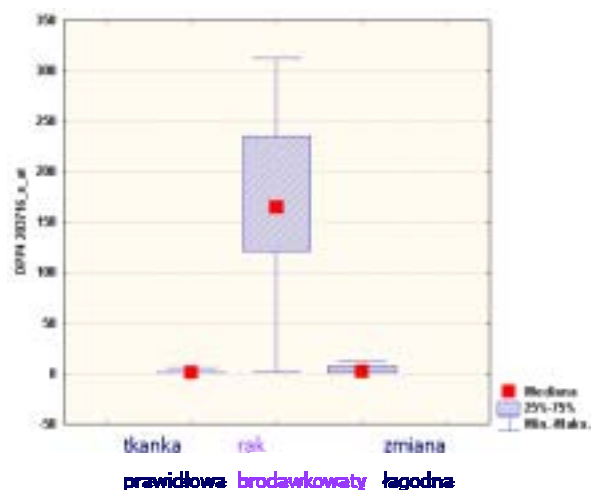
Ryc. 1. 1800 genów wykazujących znamienne statystycznie różnicę ekspresji między tkankami zdrowymi a guzami nowotworowymi.



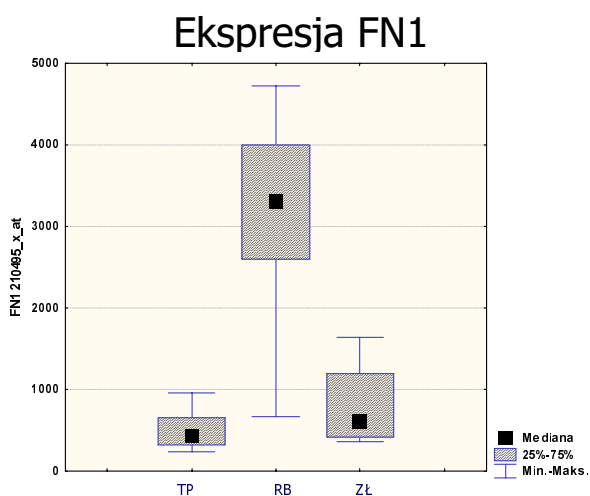
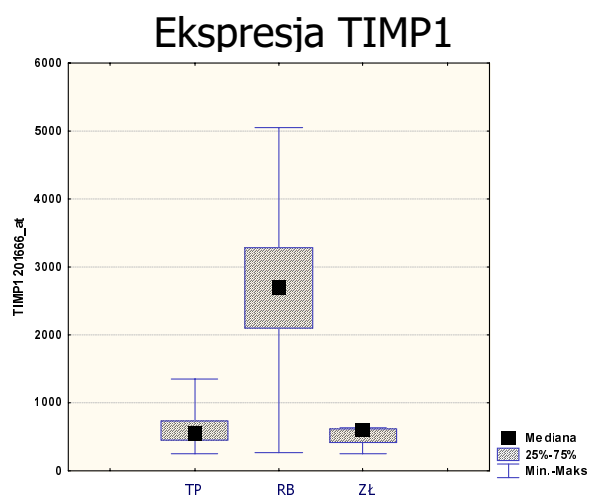
Ryc. 2. Wybranych 110 genów różnicujących tkankę zdrową od nowotworowej.

prawidłowej tarczycy, ale jego ekspresja w tkance nowotworowej była wielokrotnie zwiększona – od 1610,9 do 4620,3). Mediana wzrostu ekspresji wyniosła 3101. Z kolei TIMP1 jest białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, które hamuje aktywność katalityczną metaloproteinaz i wykazuje

wzór ekspresji podobny do FN1, chociaż różnica między tkanką zdrową i tkanką nowotworową jest tutaj mniejsza: mediana wyniosła 2782. Mediana stosunku ekspresji w guzach i tkankach zdrowych wyniosła w tym przypadku 5,2.



Ryc. 3. Poziom ekspresji genu DPP4 w tkance raka brodawkowatego tarczycy, zmianach łagodnych i w tkance prawidłowej



TP – tkanka prawidłowa RB – rak brodawkowaty ZŁ – zmiana łagodna

Ryc. 4. Analiza ekspresji genu: fibrynonektyny 1(FN1) i tkankowego inhibitora metaloproteinazy typu 1(TIMP1)

Dyskusja

Macierze oligonukleotydowe wysokiej gęstości, którymi posługiwaliśmy się w tej pracy, zawierają około 22 tysiące sond genowych, które pozwalają analizować ekspresję większości znanych genów człowieka. Większość tych genów (blisko 1) ulegała ekspresji przynajmniej w jednej z 32 analizowanych tkanek. Ponieważ na obecnym etapie analizy nie jesteśmy w stanie określić, które z nich mają największe znaczenie dla raka brodawkowatego, uważamy, że posługiwanie się takimi macierzami jest lepsze niż dobieranie mniejszych zestawów genów wybranych według określonego klucza (na przykład mikromacierzy zawierających tylko onkogeny i geny supresorowe czy mikromacierzy zawierających geny typowe dla danej tkanki). Już wcześniejsza analiza, wykonana przez Huanga i wsp. [1,8], wykazała że w raku brodawkowatym tarczycy przede wszystkim obserwuje się aktywację genów związanych z adhezją, biorących udział w komunikacji międzykomórkowej, a więc istotnych w procesach inwazji i przerzutowania.

Analiza profilu ekspresji genów techniką mikromacierzy DNA dostarcza ogromnej ilości danych, których znaczenie biologiczne musi być bardzo starannie przeanalizowane. W tej pracy przedstawiamy pewne aspekty analizy wykonanej w raku brodawkowatym tarczycy. Najważniejsze dane dotyczące tej analizy przedstawiliśmy w naszym wcześniejszym opracowaniu [6,7]. Tam też zawariliśmy propozycję wielogenowego klasyfikatora molekularnego, który może wspomagać odróżnienie raka brodawkowatego tarczycy od rozrostów nienowotworowych. W bieżącej analizie koncentrujemy uwagę na pełnym zrozumieniu znaczenia biologicznego wyników tej części naszej analizy, która została przeprowadzona przy pomocy programu MAS 5.0. Program ten stanowi rutynowy element systemu firmy Affymetrix i podstawową metodę analizy danych, używaną w wielu doniesieniach. Taką dokładną analizę przeprowadzamy na przykładzie trzech genów, ulegających bardzo znacznej aktywacji w raku tarczycy.

Mikromacierze oligonukleotydowe wysokiej gęstości mają bardzo poważną zaletę w stosunku do macierzy cDNA – pozwalają nie tylko porównać, czy ekspresja danego genu jest zwiększona, ale także ocenić ją ilościowo. Przykłady genów, które poddaliśmy pogłębionej analizie w tej pracy, wyraźnie wskazują, że taka analiza pozwala przede wszystkim ocenić, czy ekspresja danego genu pojawia się de novo w badanej tkance – tak jest w przypadku DPP4 – czy też mamy do czynienia ze zwiększeniem ekspresji w stosunku do i tak wysokiego poziomu wyjściowego, jak to jest chociażby w przypadku TIMP1.

Geny analizowane w tej pracy mają znaczenie dla inwazyjności raka i są związane z mechanizmem tworzenia przerzutów. Nie są to zresztą geny charakterystyczne wyłącznie dla raka brodawkowego tarczycy. Gen DPP4 (znany również jako CD 26) nie wykazuje ekspresji w zdrowej tkance tarczycy, natomiast w raku brodawkowatym jego mRNA znajduje się w dużych ilościach, dodatnie są także odczyty immunohistochemiczne. Były one zresztą przedmiotem szeregu wcześniejszych analiz [9-11]. Rzadziej ekspresja DPP4 obserwowana jest w łagodnych chorobach tarczycy, niemniej swoistość DPP4 dla rozpoznania raka tarczycy była kwestionowana przez tych autorów.

Funkcja DPP4 zależy od komórki, w której gen ulega ekspresji. Jeżeli analizujemy komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej to gen DPP4 uczestniczy w aktywacji limfocytów T i transdukcji sygnału poprzez degradację takich cytokin jak TNF, IL2 czy chemokin i innych peptydów biologicznie czynnych. Skoro w raku brodawkowatym tarczycy ekspresja DPP4 dotyczy komórki nowotworowej (a tak wynika z prac immunohistochemicznych [9,11]), można się spodziewać że funkcja białka związana jest też z przekazywaniem (czy raczej wygaszaniem) sygnałów cytokinowych i chemokinowych do komórki raka. Należy też zaznaczyć, że ekspresja DPP4 jest zwiększona nie tylko w raku tarczycy, ale także w wielu innych nowotworach złośliwych [12,13].

Jakkolwiek obecność DPP4 w raku tarczycy znana jest już od dawna, na siłę ekspresji tego genu w profilu ekspresji raka tarczycy zwrócili uwagę dopiero Huang i wsp. [1] wykonując po raz pierwszy badanie z użyciem mikromacierzy. Nasza analiza jednoznacznie potwierdza ich wniosek, że jest to gen o najwyraźniejszym wzroście ekspresji w raku brodawkowatym [6,7], jeżeli jest ona oceniana na poziomie mRNA. Niemniej, próby zastosowania przeciwciał przeciw DPP4 w raku tarczycy wykazały, że obecność tego białka nie jest cechą stałą. W związku z tym Kholova i wsp. [9,11] nie uznali tego antygenu za przydatny w immunodiagnostyce raka tarczycy. Aktualne badania mikromacierzowe stawiają ten wniosek w nowym świetle – być może DPP4 okaże się lepszym markerem na poziomie RNA niż na poziomie ekspresji białka. Ciekawe jest natomiast, że badania profilu ekspresji wykonane innymi technikami nie wskazują na taki wniosek. Zrozumiałe jest to w analizie wykonanej przez Waseniusa i wsp. [14] na błonach nylonowych, w których badanie dotyczyło około 1200 genów i gen CD 26 nie znajdował się wśród nich. Mniej oczywisty wydaje się brak takiego wniosku w pracy Mazzantiego [3] czy Finley'a i wsp. [2].

DPP4 wykazuje zdolność wiązania z fibronektyną, produktem białkowym genu FN1, którego ekspresja była także silnie wzmożona w naszych badaniach raka brodawkowego tarczycy. FN1

występuje w dwóch formach – jako białko cytoplazmatyczne o zdolności wiązania się z kolagenem, fibryną, aktyną i DNA oraz jako białko powierzchniowe – w tej postaci występuje na przykład na fibroblastach. FN1 uczestniczy w procesach adhezji komórkowej, wpływa też na morfologię, przede wszystkim ukształtowanie powierzchni komórki. Spośród innych procesów, w których uczestniczy, należy wymienić stymulację endocytozy, transdukcję sygnału, prawdopodobnie działa też antyapoptotycznie [15].

FN1 wykazuje podwyższoną ekspresję w większości raków brodawkowatych tarczycy [3], a także w rakach anaplastycznych. Istotne jest, że jej ekspresja dotyczy nie tylko samych komórek raka brodawkowego, ale także komórek podścieliska guza nowotworowego, stąd szczególnie silne wzmocnienie sygnału tego mRNA, wykrywanego w większości badań wykonanych techniką mikromacierzy DNA [1,2]. Z wcześniejszych badań mikromacierzowych wysuwano wnioski, że w tkance prawidłowej poziom białka jest bardzo niski bądź nie wykrywalny [14,16]. W naszej analizie obserwowaliśmy znaczący poziom FN1-RNA we wszystkich badanych tkankach normalnej tarczycy. Podobne wnioski wypływają z badań immunohistochemicznych, w których obserwowano ekspresję fibronektyny tak w komórkach raka brodawkowego tarczycy jak i w komórkach podścieliska.

Z procesami inwazji nowotworowej wiąże się na ogół wzmożona ekspresja metaloproteinaz i białek pełniących funkcję ich inhibitorów [17]. Jedno z tych ostatnich – TIMP1, wykazywało w naszych badaniach silny wzrost ekspresji w raku brodawkowatym tarczycy. Również w tym przypadku obserwacja ta potwierdza się w większości badań profilu ekspresji raka brodawkowego, opublikowanych dotychczas [1,5,14].

Nadekspresję tego białka zaobserwowano w wielu nowotworach min. w raku piersi [18], czerniaku [19]. Uważa się, że większość transkryptów mRNA dla TIMP-1 pochodzi z podścieliska, a nie z komórek nowotworowych [20]. Zwiększoną ilość białka wiąże się z większą agresywnością nowotworu i szybszym wystąpieniem przerzutów [14,20]. Wydaje nam się jednak, że wniosek ten nie sprawdzi się w raku brodawkowatym tarczycy, skoro większość przypadków tego nowotworu to guzy o niewielkiej agresywności biologicznej a nadekspresja TIMP1 jest w naszych badaniach raczej uniwersalną cechą tego nowotworu.

Przedstawione w tym doniesieniu badania stanowią pewien wycinek prowadzonej przez nas analizy profilu ekspresji raka brodawkowego tarczycy [7], ich szersza interpretacja w kontekście współdziałania innych genów jest więc jeszcze przedwczesna. Nie mamy także jeszcze odniesienia do raka pęcherzykowego i innych nowotworów tarczycy. Niemniej, na podstawie uzyskanych

wyników można jednoznacznie stwierdzić, że spośród trzech analizowanych genów, z których każdy jest kandydatem na markera molekularnego raka brodawkowatego tarczycy, najwyraźniejszymi różnicami w ekspresji charakteryzuje się gen DPP4, dlatego jego przydatność powinna być badana w pierwszej kolejności.

Piśmiennictwo

- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26):15044-15049.
- Finley DJ, Arora N, Zhu B et al. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(7):3214-3223.
- Mazzanti C, Zeiger MA, Costourous N et al. Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res* 2004; 64(8):2898-2903.
- Yano Y, Uematsu N, Yashiro T et al. Gene expression profiling identifies platelet-derived growth factor as a diagnostic molecular marker for papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(6):2035-2043.
- Prasad ML, Pellegata NS, Kloos RT et al. CITED1 protein expression suggests Papillary Thyroid Carcinoma in high throughput tissue microarray-based study. *Thyroid* 2004; 14(3):169-175.
- Jarżab B, Wiench M, Fijałkowski K et al.: Gene expression profile of papillary thyroid cancer: multi gene molecular classifier. *Turk JEM* 2004; 8(1): 98.
- Jarżab B, Wiench M, Fijałkowski K et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Research*. In press.
- Aldred MA, Ginn-Pease ME, Morrison CD et al. Caveolin-1 and caveolin-2, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis. *Cancer Res* 2003;63:2864-71.
- Kholova I, Ryska A, Ludvikova M et al. Dipeptidyl peptidase IV expression in thyroid cytology: retrospective histologically confirmed study. *Cytopathology* 2003; 14(1):27-31.
- Umeki K, Tanaka T, Yamamoto I et al. Differential expression of dipeptidyl peptidase IV (CD26) and thyroid peroxidase in neoplastic thyroid tissues. *Endocr J* 1996; 43(1): 53-60.
- Kholova I, Ludvikova M, Ryska A et al. Diagnostic role of markers dipeptidyl peptidase IV and thyroid peroxidase in thyroid tumors. *Anticancer Res* 2003; 23(2A):871-875.
- Moehrle MC, Schlagenhaupt BE, Klessen C et al. Aminopeptidase M and dipeptidyl peptidase IV activity in epithelial skin tumors: a histochemical study. *J Cutan Pathol* 1995;22:241-7.
- Wilson MJ, Ruhland AR, Quast BJ et al. Dipeptidylpeptidase IV activities are elevated in prostate cancers and adjacent benign hyperplastic glands. *J Androl* 2000; 21:220-6.
- Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E et al. 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(1):68-75.
- Ruoslahti E. Fibronectin and its alpha 5 beta 1 integrin receptor in malignancy. *Invasion Metastasis*. 1994-95;14(1-6): 87-97.
- Takano T, Hasegawa Y, Matsuzuka F, Miyauchi A, Yoshida H, Higashiyama T et al. Gene expression profiles in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83(11):1495-1502.
- Davidson B, Reich R, Risberg B et al. The biological role and regulation of matrix metalloproteinases (MMP) in cancer. *Arch Patol*. 2002 May-Jun;64(3):47-53.
- Lee SJ, Yoo HJ, Bae YS, Kim HJ, Lee ST. TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312(4):1196-1201.
- Hoashi T, Kadono T, Kikuchi K, Etoh T, Tamaki K. Differential growth regulation in human melanoma cell lines by TIMP-1 and TIMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288(2): 371-379.
- Shi Y, Parhar RS, Zou M, Hammami MM, Akhtar M, Lum ZP et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) mRNA is elevated in advanced stages of thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79(7-8):1234-1239.