



Gene expression profile of medullary thyroid carcinoma — preliminary results

Małgorzata Oczko-Wojciechowska^{1*}, Jan Włoch^{2*}, Małgorzata Wiench¹, Krzysztof Fajarewicz³,
Krzysztof Simek³, Grzegorz Gala¹, Elżbieta Gubała¹, Sylwia Ulczok-Szpak¹, Barbara Jarzab¹

¹Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

²Department of Oncological Surgery,

Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

³Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Gliwice

Abstract

Introduction: Medullary thyroid carcinoma occurs both as a sporadic and a familial disease. Inherited MTC (iMTC) patients usually exhibit better prognosis than patients with sporadic form of MTC (sMTC), however, in both subtypes the outcome is unpredictable. No molecular markers contributing to the prognosis or predicting the type of therapy have been introduced to clinical practice until now.

The aim of this study was to analyze gene expression pattern of MTC by high density oligonucleotide microarray.

Material and methods: 24 samples were studied: 12 MTC and 12 corresponding normal tissues, (Affymetrix HG-U 133A). Among MTC patients there were half inherited cases and half sporadic ones.

Results: First, the differences between MTC and thyroid tissue were analyzed by Singular Value Decomposition (SVD) which indicated three main modes determining the variability of gene expression profile: the first two were related to the tumor/normal tissue difference and the third one was related to the immune response. The characteristic expression pattern, beside of numerous changes within cancer-related genes, included many up-regulated genes specific for thyroid C cells. Further analysis of the second component revealed two subgroups of MTC, but the subdivision was not related to the iMTC/sMTC difference. Recursive Feature Replacement (RFR) confirmed the very similar

expression profile in both forms of MTC. With subsequent ANOVA analysis some genes with differential expression could be specified, among them monoamine oxidase B (MAOB) and gamma-aminobutyric acid receptor (GABRR1) which were consistently up-regulated in sMTC. In contrary, some genes involved in regulation of cell proliferation: opioid growth factor receptor (OGFR) and synaptotagmin V (SYT 5) were up-regulated in iMTC.

Conclusions: The obtained data indicate a very similar gene expression pattern in inherited and sporadic MTC. Minor differences in their molecular profile require further analysis.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 420–426)

Key words: medullary thyroid carcinoma (MTC), inherited MTC, sporadic MTC, gene expression profile, high density oligonucleotide microarrays



Barbara Jarzab, M.D., Ph.D.

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,
M. Skłodowska-Curie Cancer Center and Institute of
Oncology, Gliwice Branch

Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

phone: 0 32 278 93 01, fax: 0 32 278 93 25

e-mail: bjarzab@io.gliwice.pl



Profil ekspresji genów w raku rdzeniastym tarczycy — doniesienie wstępne

Małgorzata Oczko-Wojciechowska^{1*}, Jan Włoch^{2*}, Małgorzata Wiench¹, Krzysztof Fajarewicz³,
Krzysztof Simek³, Grzegorz Gala¹, Elżbieta Gubała¹, Sylwia Szpak-Ulczoł¹, Barbara Jarząb¹

¹Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

²Klinika Chirurgii Onkologicznej,

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

³Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice

*udział obu autorów jest równorzędny

Streszczenie

Wstęp: Rak rdzeniasty tarczycy (MTC, *medullary thyroid carcinoma*) jest nowotworem wywodzącym się z okołopęcherzykowych komórek C tarczycy. W około 20–30% przypadków rak ma charakter dziedziczny, a jego wystąpienie związane jest z mutacją germinálną w genie *RET*.

Celem pracy była analiza profilu ekspresji genów charakterystycznego dla raka rdzeniastego tarczycy przy zastosowaniu mikromacierzy oligonukleotydowych wysokiej gęstości (HG U133A, Affymetrix) oraz porównanie profilu ekspresji pomiędzy postacią dziedziczną i sporadyczną tego nowotworu.

Materiał i metody: Analizie poddano 24 próbki tkankowe, w tym 12 próbek MTC oraz 12 odpowiadających im tkanek zdrowych. Połowę grupy stanowiły przypadki dziedziczne (iMTC), a połowę sporadyczne (sMTC).

Wyniki: Różnica w ekspresji genów pomiędzy tkanką zdrową a tkanką raka rdzeniastego była bardzo wyraźna i wynikała nie tylko z istnienia procesu nowotworowego, lecz również z odmiennego pochodzenia komórkowego. W analizie rozkładu na wartości osobliwe (SVD, *singular value decomposition*) dwie pierwsze składowe główne obrazowały różnicę guz/tkanka zdrowa, trzecia była związana przynajmniej częściowo z odpowiedzią immunologiczną. Głębsza analiza drugiej składowej głównej za pomocą testu ANOVA pozwoliła wyodrębnić dwie podgrupy w obrębie guzów nowotworowych, podział ten nie był jednak związany z różnicą iMTC/sMTC. Dopiero zastosowanie analizy wariancji w grupie genów wyodrębnionych za pomocą techniki maszyn podpierających (SVM, *support vector machine*)

pozwoiliło wskazać grupę genów różnicujących. Do genów o podwyższonej ekspresji w raku sporadycznym należą oksydaza monoaminowa B (MAOB, *monoamine oxidase B*) oraz receptor kwasu gamma-aminomasłowego (GABRR1, *gamma-aminobutyric-acid receptor rho-1*). W raku dziedzicznym podwyższoną ekspresję wykazywały: receptor opioidowego czynnika wzrostowego (OGFR, *opioid growth factor receptor*) i synaptotagmina V (SYT5, *synaptotagmin V*), zaangażowane w regulację cyklu komórkowego.

Wnioski: Uzyskane dane nie pozwalają na wyodrębnienie istotnych różnic w profilu ekspresji genów pomiędzy sporadycznym i dziedzicznym rakiem rdzeniastym tarczycy, co przemawia za wspólnym torem transformacji nowotworowej.

(*Endokrynol Pol* 2006; 4 (57): 420–426)

Słowa kluczowe: rak rdzeniasty tarczycy (MTC), postać dziedziczna MTC, postać sporadyczna MTC, profil ekspresji genów, mikromacierze oligonukleotydowe wysokiej gęstości



Prof. dr hab. med. Barbara Jarząb

Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie,
Oddział w Gliwicach

ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–100 Gliwice

tel.: 032 278 93 01, faks: 032 278 93 25

e-mail: bjarzab@io.gliwice.pl

Projekt finansowany w ramach grantu MNiSz nr 2 P05A 159 28

Wstęp

Rak rdzeniasty tarczycy (MTC, *medullary thyroid carcinoma*) wywodzi się z okołopęcherzykowych komórek C tarczycy i jest w około 20–30% przypadków uwarunkowany dziedzicznie, co wiąże się z obecnością mutacji germinálnych w genie *RET* i prowadzi do rozwoju dziedzicznych zespołów chorobowych. Zespół gruczo-

lakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2 (MEN 2, *multiple endocrine neoplasia type 2*) rozwija się jako MEN 2A i MEN 2B, rodzinny rak rdzeniasty (FMTC, *familial medullary thyroid carcinoma*) traktowany jest jako podtyp zespołu MEN 2A [1–3]. Choroby te dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący na poziomie klinicznym, mutacja wywiera także efekt dominujący na poziomie komórkowym. Zidentyfikowanie mutacji

protoonkogenu *RET* pozwoliło na wprowadzenie diagnostyki DNA do rozpoznawania tych chorób, co znacznie zwiększyło wykrywalność dziedzicznej postaci raka rdzeniastego tarczycy [1, 4]. Histopatologicznie dziedziczny i sporadyczny rak rdzeniasty tarczycy nie odróżniają się od siebie. Ocena przebiegu klinicznego i rokowania — zarówno w dziedzicznej, jak i sporadycznej postaci choroby — także często nie pozwalają na wyodrębnienie różnic w ich przebiegu, oczywiście poza współwystępowaniem innych endokrynopatii w postaci dziedzicznej [4–6]. Jakkolwiek część przypadków, szczególnie dziedzicznych, ma przebieg wieloletni, dotychczas nie znaleziono wskaźników molekularnych, które pozwoliłyby na wiarygodne prognozowanie raka rdzeniastego tarczycy. Ponad 95% pacjentów z objawami pełnego zespołu MEN 2A wykazuje obecność mutacji w jednym z kodonów cysteinowych — do 85% przypadków w kodonie 634 eksonu 11, rzadziej w eksonie 10 (kodony: 609, 611, 618, 620). W FMTC na ogół stwierdza się mutacje w kodonie 618 i 620 eksonu 10 i w kodonie 634 eksonu 11, stanowią one 60% wszystkich przypadków dziedzicznych (stąd traktowanie FMTC jako podtypu MEN 2A). Znacznie rzadziej spotyka się mutacje w eksonach 13 (kodon 790, 791, najrzadziej 768) i 14 (kodon 804).

Wszystkie mutacje wykrywane u chorych z zespołem MEN 2/FMTC powodują aktywację genu *RET* w dominujący gen transformujący. Rak rdzeniasty w zespole MEN 2A, szczególnie w postaciach rodzinnych, którym nie towarzyszy ryzyko guzów chromochłonnych, może przebiegać jako choroba wieloletnia z wolną progresją, podczas gdy w zespole MEN 2B choroba ma przebieg agresywny i rozwija się znacznie wcześniej [3]. Mutacja somatyczna, charakterystyczna dla tego zespołu i występująca w kodonie 918, jest także najczęstszym wydarzeniem molekularnym inicjującym sporadycznego raka rdzeniastego tarczycy (ok. 40% wszystkich przypadków) i wiąże się ją z poważniejszym przebiegiem klinicznym choroby [1]. Rokowanie w raku rdzeniastym tarczycy zależy przede wszystkim od tego, na ile wcześniej zostało postawione rozpoznanie i czy możliwe było radykalne leczenie chirurgiczne. Niestety, często mimo agresywnego leczenia operacyjnego remisję choroby udaje się uzyskać tylko u około połowy operowanych chorych, u pozostałych stężenie kalcytoniny nie normalizuje się po zabiegu i ryzyko progresji jest znaczące. Dotychczasowe badania nie przyniosły w raku rdzeniastym tarczycy żadnych wskaźników molekularnych, które miałyby istotne znaczenie dla rokowania czy wyboru terapii, dlatego też tym większe jest zainteresowanie badaniami mikromacierzowymi.

Celem podjętej pracy była wstępna charakterystyka profilu ekspresji genów raka rdzeniastego tarczycy

cy oraz porównanie raka sporadycznego i dziedzicznego pod tym kątem.

Materiał i metody

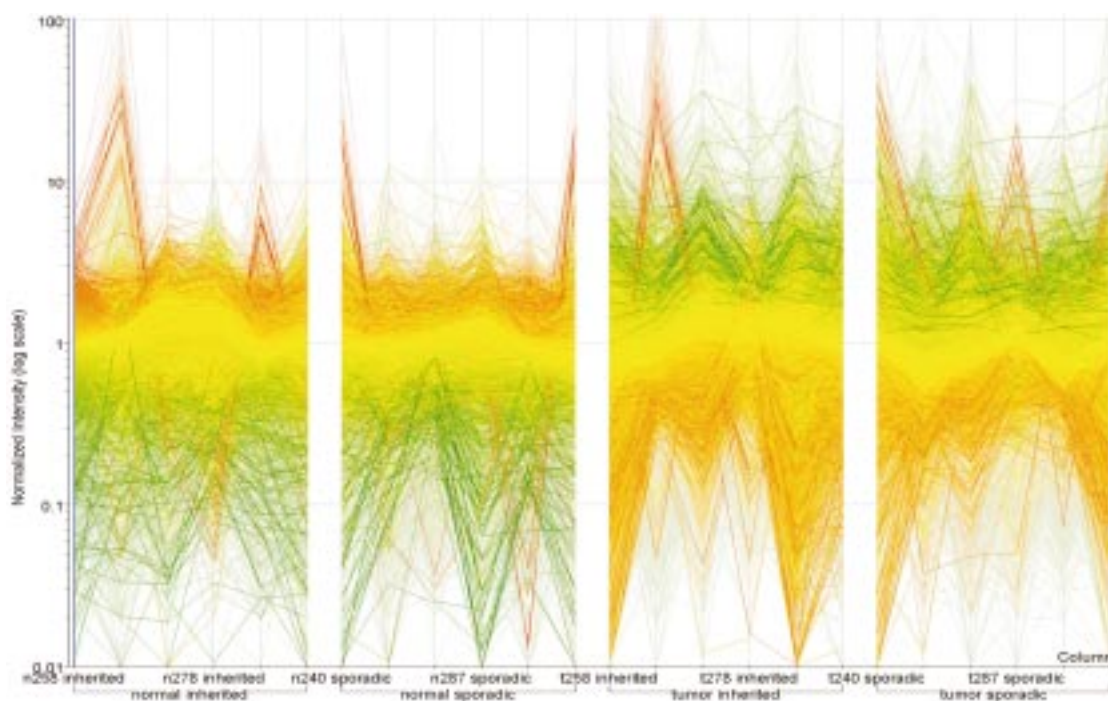
Materiał do badań stanowiło 6 próbek raka dziedzicznego rdzeniastego i 6 próbek sporadycznego raka rdzeniastego oraz odpowiadających guzom 12 tkanek niezmięnionej makroskopowo tarczycy. Komisja Bioetyczna Instytutu Onkologii w Gliwicach wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań. Analiza protoonkogenu *RET* wykazała u 4 chorych obecność mutacji germinalnych w kodonie 634 oraz u dwóch w kodonie 620. Wszystkie tkanki pobrano śródoperacyjnie i natychmiast umieszczono w temperaturze -80°C . Całkowite RNA izolowano z około 40–100 mg zamrożonej tkanki za pomocą *RNeasy Total Midi* i *Mini Kit* (Qiagen). Do syntezy cDNA użyto 8 μg RNA (*SuperScript II*, Invitrogen). Następnie wykonano transkrypcję *in vitro* w celu uzyskania biotynylowanego cRNA (*BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit*, Enzo). Namnożony cRNA poddawano fragmentacji pod wpływem wysokiej temperatury i jonów magnezu, a następnie 16-godzinnej hybrydyzacji z mikromacierzami wysokiej gęstości *Human Genome U133A* (*Affymetrix*) w temperaturze 45°C . Ilość i jakość uzyskanego RNA oraz cDNA i cRNA oceniano spektrofotometrycznie oraz elektroforetycznie w 1-procentowym żelu agarozowym oraz za pomocą bioanalityzatora Agilent 2100. W dalszym etapie mikromacierze barwiono kompleksem fikoerytryna–streptawidyna.

Skanowanie przeprowadzono w *Gene Array Scanner* (Agilent).

Analizę bioinformatyczną wyników przeprowadzono techniką rozkładu na wartości osobliwe (SVD, *singular value decomposition*). Jest to analiza poszukująca głównych trendów (charakterystycznych wzorców) w profilu ekspresji, prezentujących największą zmienność w analizowanym materiale. Do wyodrębnienia optymalnego zbioru genów (klasyfikatorów molekularnych) różnicujących badane grupy zastosowano analizę *Recursive Feature Replacement* (RFR) wykorzystującą technikę maszyn wektorów podpierających (SVM, *Support Vector Machine*). Do oceny istotności różnic stosowano analizę wariancji (ANOVA) z odpowiednimi poprawkami na wielokrotne powtórzenia. Do sporządzenia rycin zastosowano program *GeneSpring 7.2*.

Wyniki

W pierwszym etapie analizy autorzy niniejszej pracy skupili się na charakterystyce profilu ekspresji genów raka rdzeniastego tarczycy. Analiza wariancji ANOVA, z zastosowaniem poprawki Westfalla-Younga uwzględ-

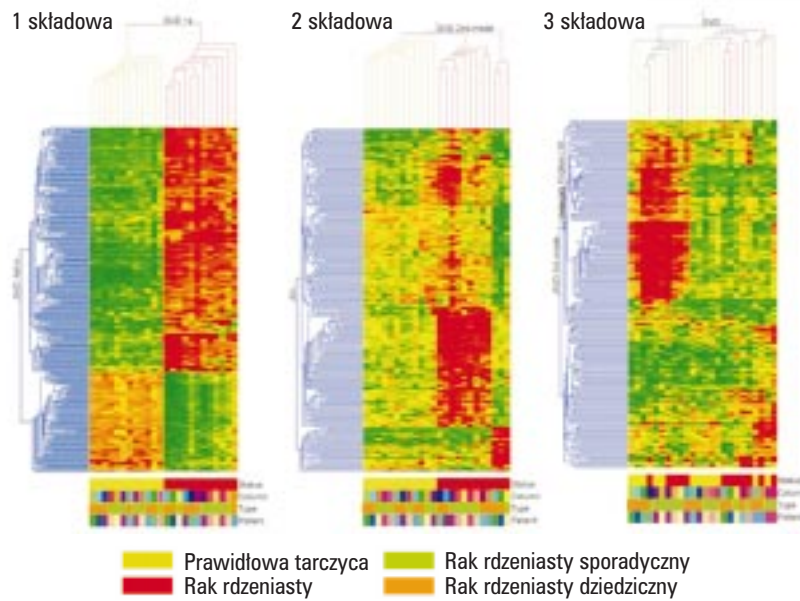


Rycina 1. Profil ekspresji genów różnicuje raka rdzeniastego tarczycy od tkanki tarczycy niezmięnionej makroskopowo, nie obserwuje się różnic w profilu raka sporadycznego i dziedzicznego

Figure 1. The gene expression profile differentiated medullary thyroid carcinoma from macroscopically unchanged thyroid tissue. The distinct differences in gene expression profile between sporadic and hereditary is not observed

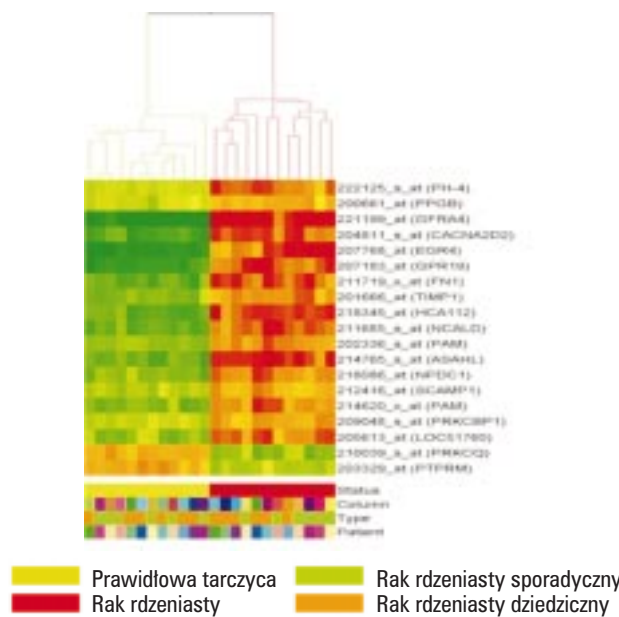
niającej wielokrotność porównań, wykazała, że różnica w profilu ekspresji między próbkami raka a niezmięzioną makroskopowo tarczycą dotyczy ponad 7000 genów (ryc. 1). Do analizy głównych źródeł zmienności w badanym materiale zastosowano nienadzorowaną technikę rozkładu na wartości osobliwe (SVD) [7], w której wykazano, że 3 pierwsze trendy (składowe główne) opisują ponad połowę zmienności (stanowią 55% całego zróżnicowania). Pierwsza i druga składowa odnoszą się do różnicy guz/zdrowa tarczycy, a trzecia — głównie do odpowiedzi immunologicznej (ryc. 2). W celu wybrania optymalnego zbioru genów różnicujących próbki guza od tarczycy prawidłowej autorzy zastosowali metodę RFR [8] opracowaną przez nich z wykorzystaniem maszyn wektorów podpierających. Uwzględnia ona interakcje między genami, dzięki czemu wybiera się najlepszy zbiór genów, a nie pojedyncze najlepiej różnicujące geny. Wyselekcjonowany klasyfikator wielogenowy składa się z 19 genów, wśród których jest między innymi gen kodujący fibronektynę (*FN 1*, *fibronectin 1*), glikoproteinę uczestniczącą w procesach adhezji komórkowej i tkankowej inhibitor metaloproteinaz typu 1 (*TIMP1*, *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) kodujący białko macierzy zewnątrzkomórkowej (ryc. 3). Wzór ekspresji charakterystyczny dla raka rdzeniastego obejmował nie tylko zmiany w obrębie genów związanych

z samym procesem nowotworowym, lecz również podwyższoną ekspresję genów ulegających ekspresji w komórkach C, takich jak gen *GFRA 4*, kodujący koreceptor dla białka *RET*. Ekspresja tego genu była wyraźnie zwiększona głównie w próbkach raka przy braku lub bardzo niskiej aktywacji w próbkach tarczycy prawidłowej. Równocześnie, w obrębie drugiej składowej ujawniły się dwie wyraźne podklasy w obrębie próbek nowotworowych, jednak podział ten nie wiązał się z różnicą rak sporadyczny/rak dziedziczny. Analiza wariacji ANOVA nie ujawniła żadnych genów różnicujących te dwie postaci raka rdzeniastego tarczycy. Zastosowanie metody nadzorowanej — RFR — także nie okazało się skuteczne dla znalezienia wyraźnej różnicy w profilu ekspresji pomiędzy tymi dwoma grupami raków. Dopiero zastosowanie analizy wariacji na grupie genów wyodrębnionej wcześniej metodą RFR pozwoliło wskazać na niewielką liczbę genów różnicujących. W grupie tej znalazły się geny o podwyższonej ekspresji w raku sporadycznym, w tym oksydaza monoaminowa B (MAOB, *monoamine oxidase B*) czy receptor kwasu gamma-aminomasłowego (GABRR1, *gamma-aminobutyric-acid receptor rho-1*). W raku dziedzicznym podwyższoną ekspresję wykazywały: receptor opioidowego czynnika wzrostowego (OGFR, *opioid growth factor receptor*) i synaptotagmina V (SYT5, *synaptotagmin V*), zaangażowane w regulację cyklu komórkowego (ryc. 4).



Rycina 2. Analiza zmienności profilu ekspresji w próbkach raka rdzeniastego tarczycy sporadycznego i dziedzicznego, wykonana nienadzorowaną techniką rozkładu na wartości osobliwe (SVD, singular value decomposition)

Figure 2. Gene expression variability in MTC and normal thyroid, analyzed by Singular Value Decomposition (SVD)



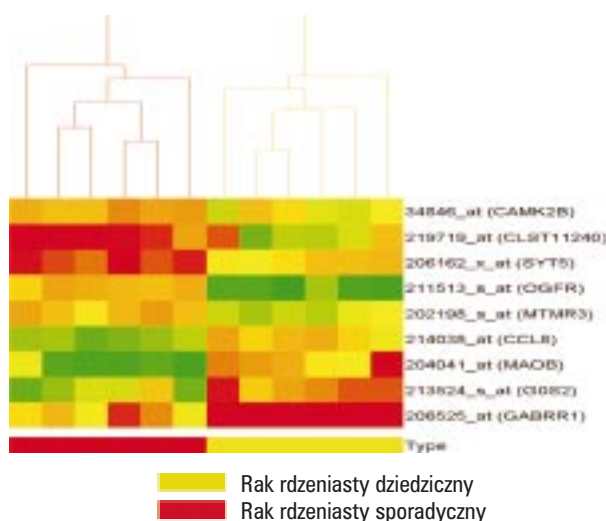
Rycina 3. Klasyfikator molekularny różnicujący raka rdzeniastego tarczycy od niezmięnionej makroskopowo tarczycy, wykonany techniką RFR (recurrent feature replacement)

Figure 3. The molecular classifier which differentiates MTC from normal thyroid tissue, selected by RFR method

Dyskusja

Głównym źródłem zmienności w badanym materiale raka rdzeniastego tarczycy okazała się różnica w profilu ekspresji genów pomiędzy próbkami raka rdzeniastego a próbkami niezmięnionej makroskopowo tarczycy. Należy podkreślić, że różnica ta wynika nie tylko z istnienia procesu nowotworowego, lecz również z od-

miennego pochodzenia komórkowego, gdyż rak rdzeniasty rozwija się z komórek C, które w otaczającej tkance zdrowej są rzadkie i stanowią zaledwie kilka procent wszystkich komórek. Jednakże, wśród różnicujących genów znalazły się także fibronektyna *FN1* i inhibitor metaloproteinaz typu 1 *TIMP1*, opisywane jako istotne dla procesu nowotworzenia w raku brodawkowym tarczycy [9] i wyodrębnione także przez innych auto-



Rycina 4. Geny różnicujące raka rdzeniastego dziedzicznego od sporadycznego

Figure 4. Set of genes differentiating between hereditary and sporadic medullary thyroid carcinoma

rów analizujących profil molekularny raka brodawkowego tarczycy [10, 11]. Oba geny charakteryzują się podobnym wzorem ekspresji zarówno w raku brodawkowym, jak i rdzeniastym tarczycy, gdzie obserwowana jest znacznie podwyższona ekspresja w stosunku do próbek prawidłowej tarczycy. Może to oznaczać, że w profilu ekspresji genów istotną rolę odgrywa także zmieniona ekspresja genów w komórkach guza. Uzyskanie RNA z prawidłowych komórek C jako punktu odniesienia dla raka rdzeniastego jest niezwykle trudne i na obecnym etapie zaawansowania mikrodissekcji laserowej praktycznie niemożliwe do zrealizowania. Na dalszym etapie badań autorzy niniejszej pracy planują porównanie profilu ekspresji genów raka rdzeniastego tarczycy do komórek linii TT, obecnie najlepiej scharakteryzowanej i stabilnej linii komórkowej wywodzącej się z ludzkiego raka rdzeniastego tarczycy. Nie rozwiąże to problemu porównania między zdrową a transformowaną nowotworowo komórką C, ale przynajmniej pozwoli wyodrębnić „czysty” profil raka rdzeniastego. Wstępna analiza porównawcza sporadycznego i dziedzicznego raka tarczycy wskazuje na podobieństwo wzoru ekspresji genów tych dwóch typów raka. Praca Jain i wsp. [12], jedyna tego typu wcześniejsza analiza w piśmiennictwie, także nie wykazuje wyraźnych różnic między postacią sporadyczną i dziedziczną MTC, podkreślając jednocześnie heterogenność profilu molekularnego raków sporadycznych. Autorzy prezentowanego badania postanowili więc zastosować metodę nadzorowaną, wykrywającą nawet niewielkie różnice. Do tego celu posłużyli się techniką maszyn

wektorów podpierających, co wraz z późniejszą analizą wariacji pozwoliło na wybranie 9 genów wykazujących różnicę w ekspresji przy porównaniu raka sporadycznego i dziedzicznego. Powyższe wyniki mogą jednak stanowić dopiero wstępną wskazówkę i wymagają potwierdzenia na większej liczbie guzów. Niemniej, godne zainteresowania jest wytypowanie niektórych genów związanych z neuroendokrynnym charakterem guza. W raku sporadycznym wzrost ekspresji dotyczył oksydazy monoaminowej B i receptora GABA, a w raku dziedzicznym genu opioidowego czynnika wzrostowego i synaptotagminy V.

Wnioski

1. Profil ekspresji genów raka rdzeniastego tarczycy bardzo znacznie różni się od profilu niezmięnionej makroskopowo tarczycy, niemniej część genów wykazuje podobne zmiany jak w raku brodawkowym tarczycy.
2. Wśród genów wykazujących wzrost ekspresji w raku rdzeniastym tarczycy jest gen kodujący koreceptor *GFRA4* dla białka *RET*, który należy do białek charakterystycznych dla komórek C, oraz fibronektyna I i gen inhibitora metaloproteinaz typu I, których ekspresja jest zwiększona w wielu nowotworach.
3. Uzyskane dane nie pozwalają na wyodrębnienie istotnych różnic w profilu ekspresji genów pomiędzy sporadycznym i dziedzicznym rakiem rdzeniastym tarczycy, co przemawia za wspólnym torem transformacji nowotworowej w obu postaciach choroby.

Piśmiennictwo

1. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17 (1): 380–393.
2. Mulligan LM, Eng C, Healey CS i wsp. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994; 6 (1): 70–74.
3. Wiench M, Wygoda Z, Gubała E i wsp. The genetic background of medullary thyroid carcinoma in young patients. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39 (supl. 2): 163–164.
4. Włoch J, Oczko-Wojciechowska M, Szpak-Ulczo S i wsp. Medullary thyroid carcinoma: from molecular studies to clinical decision. *Endokrynol Pol* 2005; 56 (3): 362–369.
5. Wygoda Z, Włoch J, Gubała E i wsp. Results of treating medullary thyroid carcinoma: the differences between sporadic and inherited forms. *Wiad Lek* 2001; 54 (supl. 1): 422–431.
6. Wiench M, Wygoda Z, Gubała E i wsp. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* 2001; 19 (5): 1374–1380.
7. Simek K, Kimmel M. A note on estimation of dynamics of multiple gene expression based on singular value decomposition. *Math Biosci* 2003; 182: 183–199.
8. Fajarewicz K, Kimmel M, Rzeszowska-Wolny J i wsp. A note on classification of gene expression data using support vector machines. *J Biol Systems* 2003; 11: 43–56.
9. Jarząb B, Wiench M, Fajarewicz K i wsp. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005; 65: 1587–1597.
10. Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E i wsp. Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are upregulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 68–75.
11. 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.
12. Jain S, Watson M, DeBenedetti MK i wsp. Expression profiles provide insights into early malignant potential and skeletal abnormalities in multiple endocrine neoplasia type 2B syndrome tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 3907–3913.