

上皮細胞成長因子 (EGF) 受容体下流におけるシグナル伝達分子の
プロテオミクス解析により同定した新規タンパク質と
そのバイオマーカーへの応用の可能性

田代京子,^{*,a} 小西博昭,^b 鍋師裕美,^c 山内英美子,^d 谷口寿章^d

**New Functional Proteins Identified by Proteomic Analysis in the
Epidermal Growth Factor Receptor-mediated Signaling Pathway
and Application for Practical Use**

Kyoko TASHIRO,^{*,a} Hiroaki KONISHI,^b Hiromi NABESHI,^c
Emiko YAMAUCHI,^d and Hisaaki TANIGUCHI^d

^aCenter for Drug Discovery, Graduated School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan, ^bFaculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima, 562 Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023, Japan, ^cGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and ^dDivision of Disease Proteomics, Institute for Enzyme Research, the University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

(Received August 31, 2009)

To clarify the whole picture of epidermal growth factor (EGF) signaling pathway, we identified proteins from the EGF-stimulated A431 cells by anti-phospho-tyrosine antibody column chromatography. Over 150 proteins were detected including previously unidentified proteins as well as well-studied proteins. Among these proteins, we picked up four proteins that had not been known in EGF signaling pathway and analyzed their functions. We report the functions of these proteins in this article. 1) CFBP interacts with CD2AP family proteins and functions as a key component in downregulation of EGF receptor protein level following EGF stimulation. 2) Ymer is found to be phosphorylated and ubiquitinated upon EGF stimulation, and functions as a regulator for the downregulation and endocytosis of EGF receptor. 3) CLPABP binds to mitochondria-specific phospholipids, cardiolipin, through its PH domain, and its complex includes various proteins related to mRNA metabolism. 4) GAREM is associated with Grb2 and Shp2. Each association affects the ERK activity. Finally, we discuss the possibilities that these proteins can be used as a novel biomarker protein for cancer and other diseases.

Key words—phosphoproteomics; CD2AP family-binding protein (CFBP); Ymer; Cardiolipin and phosphatidic acid-binding protein (CLPABP); Grb2 associated regulator of ERK/MAPK (GAREM)

1. はじめに

上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor; EGF) 受容体下流のシグナル伝達機構は、細胞増殖だけでなく、細胞遊走、アポトーシスの抑制、細胞周期

の進行など、様々な細胞機能に関与している。また、EGF 受容体を介したシグナル伝達機構に関与するタンパク質群は、受容体自身を含め、がんの発生や進行と密接に関係するものが多い。¹⁾ EGF 受容体下流におけるシグナル伝達経路の全貌を明らかにする試みは、細胞機能の解明だけでなく、そこで得られた知見が EGF 受容体経路の異常による発がん並びにがん悪性化機構の解明や、抗がん剤開発への応用につながることを期待されるため、大変意義深く、早急に行われるべきものである。

EGF 受容体シグナル伝達は、EGF 受容体にリガンドが結合し、二量体化、自己リン酸化が起こり、

^a静岡県立大学大学院薬学研究科創薬探索センター (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1), ^b県立広島大学生命環境学部 (〒727-0023 広島県庄原市七塚町 562 番地), ^c大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6), ^d徳島大学疾患酵素学研究センター (〒770-8503 徳島市蔵本町 3 丁目 18-15)

*e-mail: d7212@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム GS6 で発表したものを中心に記述したものである。

キナーゼ活性が上昇することから始まる。活性化 EGF 受容体周辺のシグナル伝達に係わるタンパク質がチロシンリン酸化され、下流でリン酸化カスケードが起こり、核内へと情報が伝わっていく。シグナル伝達分子のチロシンリン酸化は、ある場面では、タンパク質の構造変化、酵素の活性化のスイッチとして働き、別の場面では、SH2 ドメイン (Src homology 2 domain)、PTK ドメイン (protein tyrosine kinase domain) といった、リン酸化チロシンに特異的に結合するドメインと相互作用して、細胞中のタンパク質分子の位置をコントロールする役割をする。このため、EGF 受容体下流において、タンパク質のチロシンリン酸化は重要な意味を持っている。そこで、EGF 受容体の全貌を解明し、EGF 受容体シグナル伝達の機能異常に起因する疾患の原因タンパク質の同定を試みるために、EGF 受容体下流で EGF 刺激依存的にチロシンリン酸化される分子を網羅的に解析するリン酸化プロテオミクス研究が盛んに行われている。

本稿では、最初に、われわれがリン酸化プロテオミクス研究に用いた手法について述べる。続いて、それによって同定されたタンパク質の機能解析の結果を、そして最後に、そして同定されたタンパク質分子のバイオマーカーへの応用の可能性について概説する。

2. リン酸化プロテオミクス研究の手法

EGF 受容体下流でチロシンリン酸化されるタンパク質群を網羅的に同定することによって、EGF 受容体シグナル伝達の全貌を明らかにすることを目指し、われわれは研究を行った。EGF 刺激をしたヒト扁平上皮細胞である A431 細胞の抽出液に対して抗リン酸化チロシン抗体を用いたアフィニティークラムで精製を行い、精製物を SDS 電気泳動で展開し、タンパク質群の分離を行った。Figure 1 に、その銀染色像を示す。タンパク質バンドを含むゲルを、それぞれ個別に切り出し、トリプシンを用いてペプチドに消化した。このペプチド混合物に対して質量分析計による解析を行い、得られたデータを基にして、アミノ酸配列を決定し、ゲル片に含まれているタンパク質の同定を行った。その結果、EGF 刺激によってアフィニティークラムへの結合が増加するタンパク質を、およそ 150 種類同定することができた。大規模プロテオミクス研究では、得られた



Fig. 1. Isolation of Proteins from EGF-stimulated Cells by Affinity Column Using Anti-phosphorylated-tyrosine Antibody

We prepared whole cell lysates derived from A431 cell line with and without EGF stimulation. The whole cell lysates were applied in phosphotyrosine affinity column to isolate proteins. The purified samples were separated by SDS-PAGE and visualized by silver staining. The figure shows that EGF stimulation increased proteins which were retained in the affinity column. Consequently, we could identify over 150 kinds of proteins.

タンパク質情報が確かなものであることを検証し、さらに、機能が未知である新規タンパク質において、個別に解析を行うことが重要である。新規タンパク質の機能解析は、EGF 受容体シグナル伝達経路(若しくはそれに関連するがんの発生メカニズム)の全貌の解明につながるからである。このため、われわれは新規タンパク質に注目し、優先的に機能解析を行った。

以下に、この研究により同定された4つの新規タンパク質分子について、機能解析をした結果を紹介する。

3. CFBP (CD2AP family-binding protein)²⁾

この分子は、9つのエクソンからなる Long form, エクソン 8 (235 から 254 アミノ酸残基) を欠いた Short form, そしてエクソン 5 (139 から 179 アミノ酸残基) を欠いた L Δ ex5 の3種類のアイソフォームが存在する [Fig. 2(A)]. これまで、

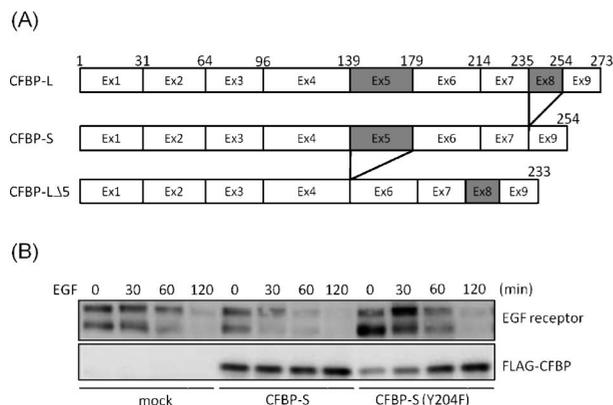


Fig. 2. CFBP

(A) Schematic representation of the primary structure of CFBP isoforms. CFBP long form (CFBP-L) is composed of nine exons, and the truncated forms lack the region from Ala235 to Glu253 (CFBP-S), or that from Asp139 to Ser178 (CFBP-L Δ ex5). Numbers of amino acid residues indicate the boundaries of exons. (B) Effect of expression of CFBP on the amount of EGF receptor in response to EGF stimulation. COS-7 cells were transfected with mock vector, the expression plasmid for FLAG-CFBP-S or that for FLAG-CFBP-S whose tyrosine 204 is replaced with phenylalanine (CFBP-S Y204F). Cells were stimulated with EGF for time indicated above. Whole cell lysates were prepared from these cells. Protein levels of EGF receptor, CFBP and its mutant were monitored by immunoblot with antibodies specific for them.

機能に関する報告はなく、既知のタンパク質との相同性が見つからなかったため、機能の推測もできなかった。われわれは、はじめに、欠失変異体を用いた研究により、EGF 刺激によって、CFBP の Long form 及び Short form の 204 番目のチロシン (Y204) がリン酸化されることを明らかにした。さらに、このタンパク質と結合する分子の探索を行い、CD2AP (CD2 associated protein) を見い出した。CFBP は、CD2AP や CD2AP と相同性のある CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) の SH3 ドメイン (Src homology 3 domain) とエクソン 5 に存在するポリリンリッチ領域を介して結合することがわかった。CD2AP は T 細胞の膜タンパク質 CD2 の結合因子として同定された分子である。³⁾ CD2AP は、のちに EGF 受容体をユビキチン化する E3 ユビキチン連結酵素である Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) と複合体を形成し、⁴⁾ 細胞膜から細胞質に移行した受容体の輸送を促進することが明らかとなっている。⁵⁾

CD2AP は様々な成長因子受容体の分解制御に影響があることが知られているため、われわれは EGF 依存的な EGF 受容体の分解における CFBP の影響を調べた。その結果、CFBP を過剰発現させた細胞では、EGF 受容体の細胞内移行並びに分解

が促進されることを発見した。さらに、その機能は Y204 のリン酸化が必要であることを明らかにした [Fig. 2 (B)].

CFBP には、アミノ酸配列で約 34% 相同性を持つタンパク質 CFBPH が存在する。これらのタンパク質は、EGF 受容体を始めとした細胞膜上タンパク質の細胞内膜輸送において重要な役割を果たす複合体の 1 つである ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) I の酵母における構成因子、MVB12 のヒトホモログ (MVB12A 及び B) として、Morita らの研究により報告された。⁶⁾ MVB12 の他の複合体形成因子との結合領域は 192 から 273 アミノ酸残基に相当する ESCRT-I-binding boxes と呼ばれる領域に集中している。CD2AP/CIN85 は細胞膜上タンパク質の細胞内移行の初期で、ESCRT 複合体は後期で機能するため、CFBP/MVB12 と CD2AP/CIN85 の相互作用は細胞膜上タンパク質の細胞内輸送において重要な役割を果たすと考えられる。

4. Ymer⁷⁾

このタンパク質は、解析を始めた当初、C3orf6 (Chromosome 3 open reading frame 6) として cDNA の報告がなされていた。⁸⁾ つづいて、Blagoev らは、成長因子刺激でチロシンリン酸化されるタンパク質として同定し、それを Ymer と命名した。⁹⁾ しかし、その機能は不明であった。これまでの研究によって、Ymer には 2 種類のスプライスバリエントがあること、⁸⁾ 145 番目のチロシンが EGF 刺激依存的にリン酸化されることは既に報告されていたが [Fig. 3 (A)],^{10,11)} われわれは種々の Ymer 変異体を用いた実験を行い、新たに 146 番目のチロシンも EGF 刺激依存的にリン酸化されることを見い出した。そして、EGF 刺激依存的な EGF 受容体の分解を遅らせる働きを持つということを見い出した [Fig. 3 (B)]. また、Ymer がモノユビキチン化されること、129 番目のリジンがユビキチン化サイトの 1 つであることを明らかにした。タンパク質のモノユビキチン化は、タンパク質のプロテアソーム分解のシグナルであるポリユビキチン化と異なり、特定の標的部位への移行シグナルとして働く。Penengo らは、新規ユビキチン結合ドメイン MIU (motif interacting with ubiquitin) domain が Ymer に存在することを報告した。¹²⁾ モノユビキチン化されること

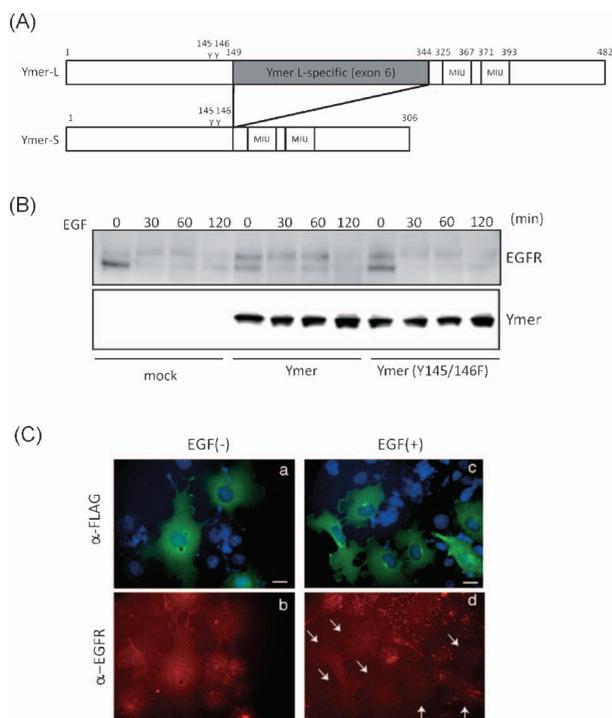


Fig. 3. Ymer

(A) Schematic representation of Ymer isoforms. The positions of tyrosine-phosphorylation sites and MIU domains are shown. Numbers of amino acid residues indicate the boundaries of MIU domains and Ymer long form specific region. (B) Effect of Ymer overexpression on amount of EGF receptor. COS-7 cells were transfected with mock vector, the expression plasmid for FLAG-Ymer Short form (Ymer-S) or that for the FLAG-Ymer Short form whose tyrosine 145 and 146 are replaced with phenylalanines (Ymer (Y145F/Y146F)), followed by stimulation with EGF for the indicated times. Whole cell lysates were prepared from these cells. (C) Effect of overexpression of Ymer on internalization of EGF receptor followed by stimulation with EGF. Immunofluorescence staining in COS7 cells with expressing FLAG-Ymer-S (a-d). Cells were treated with (c, d) or without (a, b) EGF for 15 min. Cells were processed for co-immunofluorescence staining using anti-FLAG (green) and anti-EGF receptor (red) antibodies. The nuclei were visualized with Hoechst 33342 dye (blue). Cells expressing FLAG-Ymer-S (upper) were indicated by arrows. The scale bars represent 10 μ m.

や、ユビキチン結合ドメインを持つことは、EGF 受容体エンドサイトーシス関連タンパク質に共通してみられる特徴である。また、われわれは、Ymer の EGF 受容体エンドサイトーシス抑制機能にチロシンリン酸化が必要なこと [Fig. 3(C)], EGF 受容体との相互作用に MIU ドメインが必要であることを明らかにしている。Ymer のチロシンリン酸化や MIU ドメインの役割に関しては、まだ知られていない部分もあり、更なる研究が必要とされる。

5. CLPABP (cardiolipin and phosphatidic acid-binding protein)¹³⁾

このタンパク質の cDNA は、ドイツの cDNA シークエンスプロジェクトでクローニングされたものである。611 アミノ酸からなるタンパク質で、配

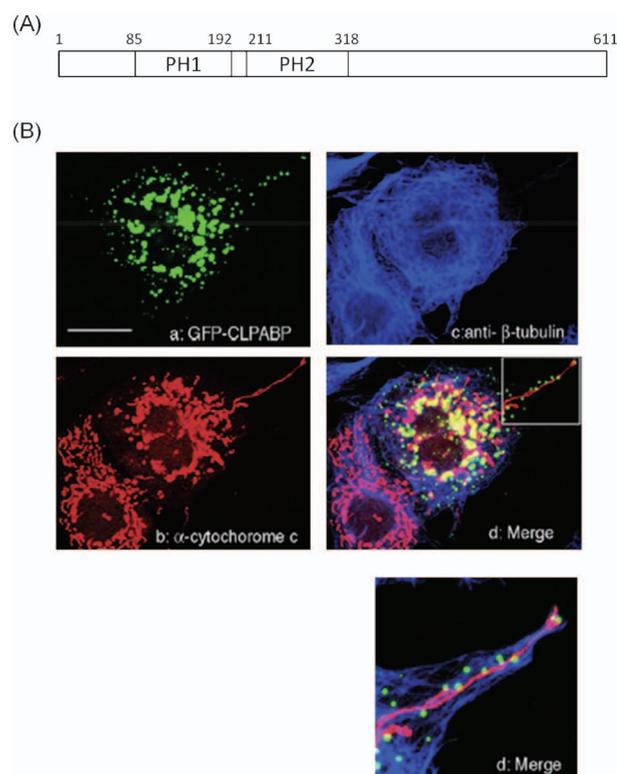


Fig. 4. CLPABP

(A) Schematic representation of the primary structure of CLPABP. The number of amino acid residues indicate the boundaries of PH domains. The locations of the two PH domains are described as PH1 and PH2. (B) Subcellular localization of GFP-CLPABP. COS-7 cells were transfected with the expression vector encoding GFP-CLPABP (a). The cells were processed for coimmunofluorescence staining 36 h after transfection using anti-cytochrome c (b) and anti- β -tubulin antibodies (c). Merged images of the panels are shown (d). The magnified images of the white box in panel d are also shown below.

列的な特徴としては、N 末端側に 2 つの PH ドメイン (pleckstrin homology domain) を持つということが挙げられる [Fig. 4(A)]. われわれは、この PH ドメインがミトコンドリアに特異的に存在する脂質、カルジオリピンや、その代謝産物であるホスファチジン酸と特異的に結合することを明らかにした。また、CLPABP はミトコンドリアタンパク質であるシトクロム c やチューブリンネットワークと共局在する [Fig. 4(B)].

CLPABP と結合する分子の探索を行ったところ、細胞内の mRNA 代謝に関与する数多くのタンパク質を同定した。それらのタンパク質と RNA と RNA 顆粒¹⁴⁾と呼ばれる RNA の局在、安定性、細胞内移行を制御する複合体を形成する可能性が示唆された。

さらに、CLPABP を含む複合体には、シトクロム c をコードする mRNA が含まれていることも明

らかにした。これは、CLPABPが、シトクロムcのmRNAと複合体を作り、カルジオリピン/ホスファチジン酸を介して、ミトコンドリアに局在することによって、シトクロムcの発現制御に係わっていることを示唆している。CLPABPの機能はEGF受容体下流シグナル伝達との係わりが明らかではないが、EGF受容体経路の活性化に伴う細胞増殖などの反応に必要なエネルギーの調達に係わっている可能性が考えられる。

6. GAREM (Grb2 associated regulator of ERK/MAPK)¹⁵⁾

このタンパク質は、875アミノ酸からなり、C末側にプロリンリッチ領域を持つ [Fig. 5(A)]. 453番目のチロシン (Y453) がEGF刺激依存的にリン酸化されることが報告されていたが,^{9,11,16)} その機

能は未知であった。われわれは、プロリンリッチ領域がGrb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)のSH3ドメインと相互作用し、リン酸化したY453がShp2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2)のSH2ドメインと相互作用することを明らかにした。GAREMはGrb2を介してEGF受容体と相互作用することもわかった。また、われわれは、105番目のチロシン (Y105) もリン酸化されることを明らかにした。Y105のリン酸化はGrb2との相互作用に影響を及ぼすがそれ以外にどのような意味があるかはまだ明らかではない。

更なる研究の結果、GAREM過剰発現細胞ではEGF刺激依存的なERK活性化が上昇し、プロリンリッチ領域を欠損した変異体の過剰発現ではその効果がみられないことから [Fig. 5(B)], GAREMがERK活性制御に関与しており、その機能にはプロリンリッチ領域が重要であることがわかった。また、われわれは、GAREMが細胞の形質転換に与える影響を調べるために、ソフトアガーアッセイを行った。GAREMを発現させたNIH3T3細胞はソフトアガー培地でコロニーを形成したが、コントロールやプロリンリッチ領域を欠損した変異体を発現させた細胞ではコロニーの形成はみられなかった [Fig. 5(C)]. このことからGAREMは細胞のがん化にも関与し、それにはプロリンリッチ領域が重要であることが示唆された。

7. 創薬への応用、今後の展望

これまで、発見した新規シグナル伝達分子4つのうち、3つは活性化EGF受容体の制御、若しくは下流シグナル伝達の制御に係わるものであった。冒頭で述べたように、EGF受容体は様々ながん種と係わりが深い。また、がん研究におけるプロテオミクス解析では、がんの分子メカニズム、治療法の解明と並んで、バイオマーカーの開発も重要なテーマである。バイオマーカーは現在の疾病の診断だけではなく、将来の罹患・病態予測に利用することができる。しかし、がん臨床において使用されているバイオマーカーはわずかであるため、¹⁷⁾ 早急な研究開発が求められるところである。

われわれは、これまでに機能解析を行ってきた新規シグナル伝達分子の、バイオマーカーとしての可能性をさらに追及することを目的として、さまざまながん由来細胞株におけるYmerのmRNA発現を

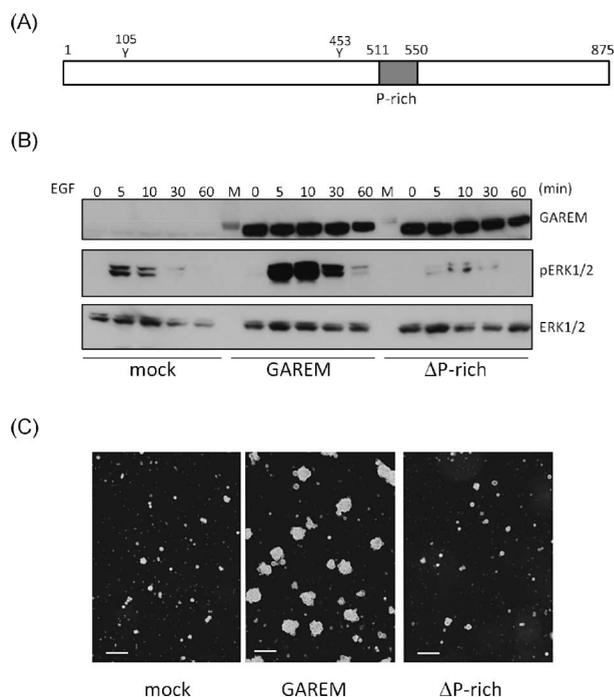


Fig. 5. GAREM

(A) Schematic representation of the primary structure of GAREM. The location of the proline-rich region (P-rich) and tyrosine-phosphorylation sites are shown. The number of amino acid residues indicated the boundaries of P-rich. (B) Effect of GAREM expression on ERK activation in response to EGF stimulation. Whole cell lysates were prepared from COS-7 cells transfected with empty vector (left lanes), the expression plasmid for FLAG-GAREM (center lanes), or that for the FLAG-GAREM Δ P-rich mutant (right lanes) and then stimulated with EGF for time indicated. Proteins were compared by immunoblotting with anti-GAREM (upper panel), anti-phospho-ERK1/2 (middle panel), and anti-ERK1/2 antibodies (lower panel). (C) Effect of GAREM expression on transformation of the cultured cells. NIH3T3 cells were transfected with mock vector (left), the expression plasmid for wild-type GAREM (center) or that for Δ P-rich mutant (right). Cells were cultured in soft agar for 14 days. Three independent sets of experiments were carried out, and the representative set of the colonies are shown. The scale bars represent 200 μ m.

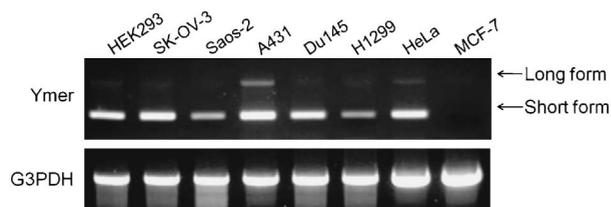


Fig. 6. Comparison of Ymer mRNA Expression Level

mRNA expression level of Ymer short form is higher than that of long form in various cancer cell lines examined. Quantitative-PCR was carried out using oligonucleotide primers specific for Ymer mRNA. The amplified DNA fragments derived from Ymer mRNA are indicated by arrows in the upper panel. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA was used as a control. To assess the relative expression levels of Ymer transcripts, a reverse transcriptase-PCR assay was performed using RNA prepared from eight different human culture cell lines.

reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) 法で調べた。⁷⁾ EGF 受容体を過剰発現している A431 細胞では Ymer の Long form が、他の細胞よりも発現していることがわかった (Fig. 6)。これらの中には EGF 受容体は発現していないが、EGF 受容体ファミリーのメンバーである Her2 を過剰に発現しているものもある。Her2 は EGF 受容体と比べてエンドサイトーシスされ難いということが知られており、¹⁸⁾ Ymer が、成長因子受容体の過剰発現が原因となっているがんの疾患バイオマーカーとして機能する可能性も考えられる。

8. おわりに

われわれの解析を含め、数多くのリン酸化プロテオミクス研究によって、EGF 受容体下流シグナル伝達で機能する可能性のあるタンパク質分子が数多く同定されている。その中で、機能未知タンパク質を優先的に機能解析することで、より包括的に EGF 受容体を介したシグナル伝達機構が解明されれば、基礎生命科学の発展に貢献できると考えている。また、そこから、新規治療標的の探索やバイオマーカーの開発を含めた創薬への応用も期待される。

謝辞 本研究に協力して頂いた、静岡県立大学大学院薬学研究科創薬探索センターの浅井章良教授、研究員の皆様、そして、徳島大学分子酵素学(現：疾患酵素学)研究センター・酵素分子生理学(現：疾患プロテオミクス)研究部門の研究員の皆様に、ここで深く感謝申し上げます。

REFERENCES

1) Normanno N., De Luca A., Bianco C.,

Strizzi L., Mancino M., Maiello M. R., Carotenuto A., De Feo G., Caponigro F., Salomon D. S., *Gene*, **366**, 2–16 (2006).

- 2) Konishi H., Tashiro K., Murata Y., Nabeshi H., Yamauchi E., Taniguchi H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 28919–28931 (2006).
- 3) Dustin M. L., Olszowy M. W., Holdorf A. D., Li J., Bromley S., Desai N., Widder P., Rosenberger F., van der Merwe P. A., Allen P. M., Shaw A. S., *Cell*, **94**, 667–677 (1998).
- 4) Kirsch K. H., Georgescu M. M., Shishido T., Langdon W. Y., Birge R. B., Hanafusa H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 4957–4963 (2001).
- 5) Lynch D. K., Winata S. C., Lyons R. J., Hughes W. E., Lehrbach G. M., Wasinger V., Corthals G., Cordwell S., Daly R. J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 21805–21813 (2003).
- 6) Morita E., Sandrin V., Alam S. L., Eckert D. M., Gygi S. P., Sundquist W. I., *Cell Host Microbe*, **2**, 41–53 (2007).
- 7) Tashiro K., Konishi H., Sano E., Nabeshi H., Yamauchi E., Taniguchi H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 24612–24622 (2006).
- 8) Vazza G., Picelli S., Bozzato A., Mostacciuolo M. L., *Gene*, **314**, 113–120 (2003).
- 9) Blagoev B., Ong S. E., Kratchmarova I., Mann M., *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1139–1145 (2004).
- 10) Zhang Y., Wolf-Yadlin A., Ross P. L., Pappin D. J., Rush J., Lauffenburger D. A., White F. M., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1240–1250 (2005).
- 11) Rush J., Moritz A., Lee K. A., Guo A., Goss V. L., Spek E. J., Zhang H., Zha X. M., Polakiewicz R. D., Michael J. C., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 94–101 (2005).
- 12) Penengo L., Mapelli M., Murachelli A. G., Confalonieri S., Magri L., Musacchio A., Di Fiore P. P., Polo S., Schneider T. R., *Cell*, **124**, 1183–1195 (2006).
- 13) Sano E., Shono S., Tashiro K., Konishi H., Yamauchi E., Taniguchi H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1036–1047 (2008).
- 14) Anderson P., Kedersha N., *J. Cell Biol.*, **172**, 803–808 (2006).
- 15) Tashiro K., Tsunematsu T., Okubo H., Ohta T., Sano E., Yamauchi E., Taniguchi H., Konishi H., *J. Biol. Chem.*, **284**, 20206–20214 (2009).

-
- 16) Thelemann A., Petti F., Griffin G., Iwata K., Hunt T., Settinaro T., Fenyo D., Gibson N., Haley J. D., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 356–376 (2005).
- 17) Koizumi F., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **132**, 105–110 (2008).
- 18) Roepstorff K., Grøvdal L., Grandal M., Lerdrup M., van Deurs B., *Histochem. Cell Biol.*, **129**, 563–578 (2008).