

Mutational and Expressional Analysis of DOK2 Gene in Non-small Cell Lung Cancers

Purpose: Mounting evidence indicates that perturbation of tyrosine phosphorylation is implicated in the development of many human diseases, including cancers. Docking proteins (DOKs) are tyrosine-phosphorylated proteins that negatively regulate tyrosine kinase signaling and they are considered to be tumor suppressors. Deletion and the altered expression of the DOK2 gene have been studied in leukemias and lung cancers. However, the somatic mutation status of the DOK2 gene has not been studied in lung cancers. The aim of this study was to see whether alterations of DOK2 protein expression and somatic mutation of the DOK2 gene are present in human non-small cell lung cancer (NSCLC). **Materials and Methods:** We analyzed DOK2 somatic mutation in 45 NSCLCs (23 adenocarcinomas (AD) and 22 squamous cell carcinomas (SCC) by single-strand conformation polymorphism (SSCP). We examined the DOK2 protein expression in 45 NSCLCs by immunohistochemistry. **Results:** SSCP analysis revealed no evidence of somatic mutation in the DNA sequences encoding the DOK2 gene in the 45 NSCLCs. Among the informative cases, 27% and 21% of the ADs and SCCs showed allelic loss in the DOK2 locus, respectively. On the immunohistochemistry, DOK2 protein was expressed in the normal bronchial epithelial cells, while it was lost in 10 (22%) of the NSCLCs. **Conclusion:** Our data indicates that DOK2 is altered in NSCLC at the expressional level, but not at the mutational level. The data also suggests that loss of the expression of DOK2 might play roles in NSCLC development by possibly altering tyrosine kinase signaling. (**J Lung Cancer 2011;10(1):26 – 31**)

Key Words: Non-small cell lung carcinoma, DOK2 protein, Tumor suppressor, Gene expression, Mutation

Nam Jin Yoo, M.D.
Min Sung Kim, M.S. and
Sug Hyung Lee, M.D.

Department of Pathology, College of
Medicine, The Catholic University of
Korea, Seoul, Korea

Received: February 9, 2011
Revised: March 28, 2011
Accepted: April 13, 2011

Address for correspondence
Sug Hyung Lee, M.D.
Department of Pathology, College of
Medicine, The Catholic University of
Korea, Banpo 4-dong, Seocho-gu,
Seoul 137-701, Korea
Tel: 82-2-2258-7311
Fax: 82-2-537-6586
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

This work was supported by a grant
from National Research Foundation of
Korea (2010-0021159).

서 론

타이로신 인산화(tyrosine phosphorylation)는 세포 신호전달계에서 가장 흔하고 중요한 조절과정으로, 세포성장, 분화, 생존, 사멸 등에 관여한다(1). 하지만, 타이로신 인산화는 세포에서 다양한 기전에 의해 엄격히 통제되어 세포의 항상성을 유지하게 한다(2-4). Docking protein (DOK)은 타이로신 인산화 과정의 adaptor protein으로 세포증식에 필요한 많은 타이로신 인산화 효소(tyrosine kinase)의 기질로 작용한다(5-11). DOK 단백질은 피드백 기전에 의해 타이로신 인산화 효소의 기능을 억제하는 역할을 한다(5,10,11). 이제까지 사람에서 7종류의 DOK 단백질(DOK1-7)이 밝혀졌으며

이중에서 DOK1, DOK2, DOK3는 기능적으로 유사하여 한 그룹으로 분류된다(7). *In vivo* 상태에서 DOK 단백질의 과발현은 수용체 타이로신 인산화 효소와 RAS의 하방에 존재하는 AKT와 ERK를 억제한다는 것이 밝혀졌다(5,10,11).

타이로신 인산화 신호전달계가 다양한 암에서 유전변화와 발현변화에 의해 활성화 된다(1-4). DOK1 및 DOK2 유전자 결손된 마우스는 myeloproliferative disorder과 lymphoproliferative disorder가 쉽게 발병한다(12-14). 또한, Berger 등(15)은 다양한 DOK 유전자 결손의 조합을 마우스에 조작하여 DOK 유전자의 기능을 조사하였고, 이를 통해 DOK1, DOK2, DOK3 중 어느 하나가 이형접합적(heterozygous) 결손된 마우스에서는 쉽게 폐쇄암이 발병한다는 것을 밝혔다. 사람의 폐쇄암에서 DOK2 유전자의 복제수 소실

(copy-number loss)과 발현의 감소도 규명된 바 있다. Berger 등(15)은 다양한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통해 DOK2가 폐암세포의 증식을 억제한다는 현상도 관찰하였다. 이런 일련의 연구들은 DOK2 유전자가 haploinsufficient tumor suppressor gene임을 제시한다(16). 그러나, 지금까지 DOK 유전자의 돌연변이에 대한 연구는 사람의 암에서 규명된 바가 없다. 또한, 폐암 이외의 암에서 DOK2의 발현에 관한 연구도 없는 실정이다. 이에 저자들은 본 연구에서 DOK2 유전자의 돌연변이가 비소세포성 폐암의 세포사멸 이상에 관여하는지를 알아보기 위해, 비소세포성 폐암 조직을 대상으로 돌연변이 및 발현연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 연구 대상

1999~2002년에 근치적 폐절제술을 받고 진단된 45명의 비소세포성 폐암환자의 폐조직을 대상으로 하였다. 폐조직은 메타칸에 고정되고 파라핀에 포매되었다. 폐암환자의 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin 및 eosin 염색을 실시한 후 2명의 진단병리의사가 독립적으로 WHO분류에 따라 분류하였으며, 이들은 편평상피암 22예, 샘암 23예였다. 36~79세의 연령분포를 보였으며 평균연령은 57세였다. 본 연구는 가톨릭대학교 의과대학 기관심의위원회의 승인 후 시행되었다(CUMC10U119).

2) 돌연변이 조사

Hematoxylin 및 eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수

집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. DOK2 유전자를 이루고 있는 genomic DNA는 5개의 엑손(exon) (엑손 1~5)으로 이루어진다. 본 연구는 모든 코딩 엑손의 돌연변이를 조사하였다. 이를 위해 이 부위를 증폭할 수 있는 시발체(primer) 10쌍을 제작하였다(Table 1). 방사성 동위원소인 [³²P]dCTP를 중합효소 연쇄반응에 포함시켜서 자기방사법(autoradiogram)으로 중합효소 연쇄반응 산물을 분석할 수 있게 하였다. 중합효소 연쇄반응은 혼합액을 94°C에서 10분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 53~62°C에서 40초와 72°C에서 40초씩 각각 35회 반복하였으며 72°C에서 5분간 연장반응을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응 산물을 single-strand conformation polymorphism (SSCP) 분석을 위해 non-denaturing gel에 running 후 건조하고 관찰하여, 정상 DNA에서 관찰되는 야생형(wild-type) band 이외의 band가 나타난 경우, 2회 이상 반복하여 확인하고, aberrant band를 잘라서 cyclic sequencing으로 DNA 염기서열을 분석하였다. SSCP, DNA 염기서열 분석에 관한 내용은 이전의 논문에서 자세하게 기술되어 있다(17,18).

3) 면역화학 염색

박절된 45예의 폐암조직 절편을 이용하여 DOK2 단백질에 대한 면역 조직 화학 검사를 시행하였다. 사람의 DOK2 단백질에 대한 토끼의 항체(Abcam, Cambridge, UK; dilution 1/100)가 일차 항체로 사용되었다. 면역 조직 화학 검사의 신호를 증폭시키기 위하여 전자레인지용 항원복원(antigen retrieval)이 시행되었으며 자세한 방법은 이전의 논문에서 자세하게 기술되었다(19). 면역염색은 일차항체를 4°C에서 15시간 처리한 후 DAKO REAL EnVision System (DAKO, Glostrup, Denmark)을 사용하여 시행하였다. 이후 diaminobenzidine으로 반응산물을 현상하고 hematoxylin으로 염색하였다. 결과는 30% 이상의 세포가 양성이면 양성으로 판정하였다. 양성을 발현 강도에 따라서 -, +로 나누었다. 결과는 2명의 진단병리의사가 독립적으로 판독하였다. 통계처리는 Fisher's exact test를 이용하여 발현의 차이를 분석하였다.

4) 이형접합체 소실(loss of heterozygosity)

DOK2 유전자의 대립유전자 상태를 45예의 비소세포성 폐암에서 조사하였다. 이를 위해 현미부수체 표지자(microsatellite marker)와 유전자 다형성 표지자(intragenic polymorphism marker)를 제작하였다(Table 2). 폐암의 암세포와 같은 환자의 정상세포로부터 DNA를 분리하고 표지자 주위의 시발체를 이용해 중합효소연쇄반응으로 증폭하였다. 현미

Table 1. Primer Sequences of DOK2 Gene Used in the SSCP

Gene	Sequences	Size, bp
DOK2	F: 5'-TTCTCAAATATACTGTTTC-3'	154
Exon 4	R: 5'-TATTATGTATCACAAATGG-3'	
DOK2	F: 5'-CTGGGGGATATAGTTCTCTT-3'	204
Exon 5-1	R: 5'-TGCATTTTCATTGACTTG-3'	
DOK2	F: 5'-CAATTGAAGCTCATTTTATG-3'	197
Exon 5-2	R: 5'-AACTACTCACAGGGTTATGG-3'	
DOK2	F: 5'-TCTCTTCATGTGAGGTATTC-3'	184
Exon 6	R: 5'-CTGAGGCTTCATAAATG-3'	
DOK2	F: 5'-AAGACTTAATTGCTTGAATC-3'	187
Exon 7	R: 5'-AATGTTTTAATGTTGCTGA-3'	
DOK2	F: 5'-GACTTTTATTGTTGGGTTTC-3'	173
Exon 8	R: 5'-TCAATCTGTTGGCTGTGG-3'	

DOK: docking proteins, SSCP: single-strand conformation polymorphism.

Table 2. LOH of DOK2 Gene in Lung Cancers Identified by Microsatellite Markers and Intragenic Polymorphisms

Gene	Markers	Distance away from the gene	No. of AD with LOH*	No. of SCC with LOH*
DOK2	rs2242240	Intragenic (exon 5)	4 (27)	3 (21)
	rs17853066	Intragenic (exon 5)		
	rs899428	Intragenic (intron 1)		
	AFM234YH10	4 kb		
	AFMA127YE5	164 kb		

Values are presented as number (%).

*Number of cancers with LOH at least of one of the markers among informative cases.

LOH: loss of heterozygosity, AD: adenocarcinoma, SCC: squamous cell carcinoma, DOK: docking proteins.

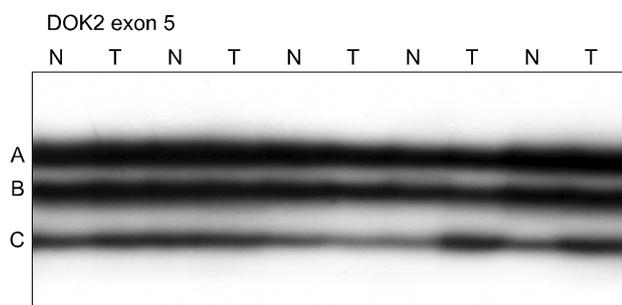


Fig. 1. Representative SSCP of DOK2 gene in lung cancers. Exon 5 of DOK2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a specific primer set. The PCR products from 5 representative cases of non-small cell lung cancers were visualized on SSCP. SSCP of DNA from the non-small cell lung cancers (T) shows no aberrant bands as compared to SSCPs from the normal tissues (N). DOK: docking proteins, SSCP: single-strand conformation polymorphism.

부수체 표지자는 중합효소 연쇄반응 후 6% polyacrylamide gel에 전기영동 하였고, 다형성 표지자는 중합효소 연쇄반응 후 SSCP gel에 전기영동 하였다. 이형접합체 소실은 정상에서 나타나는 2개의 대립유전자 중 한 개에서 50% 이상의 소실이 관찰된 것으로 정의하였다.

결 과

1) DOK2 돌연변이

미세절체를 통해서 암 및 정상세포를 비소세포성 폐암 조직에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 10쌍의 시발체로 증폭하고 SSCP로 분석하였다. 중합효소 연쇄반응 산물은 SSCP에서 잘 관찰되어서, 미세절체를 통한 DNA의 획득 및 중합효소 연쇄반응에 이상이 없음을 알 수 있었다(Fig. 1). SSCP를 분석한 결과 중합효소 연쇄반응의 결과물은 정상조직의 DNA와 같이 야생형의 band로만 나타났으며, 돌연변이에서 보이는 이상 band는 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 이들은 염기서열 분석 결과 돌연변

Table 3. Summary of DOK2 Expression in Lung Cancers by Immunohistochemistry

Histologic types	DOK2 expression	
	-	+
Squamous cell carcinoma (n=22)	4	18
Adenocarcinoma (n=23)	6	17
Total (%)	10 (22)	36 (80)

DOK: docking proteins.

이가 없는 정상 염기서열을 가지고 있었다. SSCP 결과는 해당 DOK2 유전자의 돌연변이가 분석한 45예의 폐암에서 나타나지 않음을 의미했다. 이 실험은 미세절체, 중합효소 연쇄반응, SSCP 및 염기서열 분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

2) DOK2 단백질 발현

조사한 45예의 폐암에서 DOK2 단백질의 발현은 35예(78%)에서 양성하였고 10예(22%)에서 음성이었다(Table 3, Fig. 2). 22예의 편평상피암에서 18예(82%)가 양성하였고, 4예(18%)에서는 발현이 나타나지 않았다. 23예의 샘암에서 17예(87%)가 DOK2 발현이 양성하였고, 6예(13%)에서는 발현이 나타나지 않았다. DOK2 발현은 편평상피암 및 샘암에서 발현의 통계학적 차이는 없었다(Fisher's exact test, two tails, p>0.05). DOK2의 면역 조직 화학 염색은 양성의 경우에는 세포질 및 핵에 나타났(Fig. 2). 정상 기관지 혹은 세기관지 상피는 DOK2 발현 양성을 나타냈다(Fig. 2). 일차 항체를 처리하지 않은 음성 대조군은 DOK2 면역 염색에 대해 음성을 보여 면역 염색이 특이적인 것을 나타냈다. DOK2의 발현은 환자의 성별, 나이, 암의 전이, 암의 진행단계 등에 의해 차이가 없었다(Fisher's exact test, two tails, p>0.05).

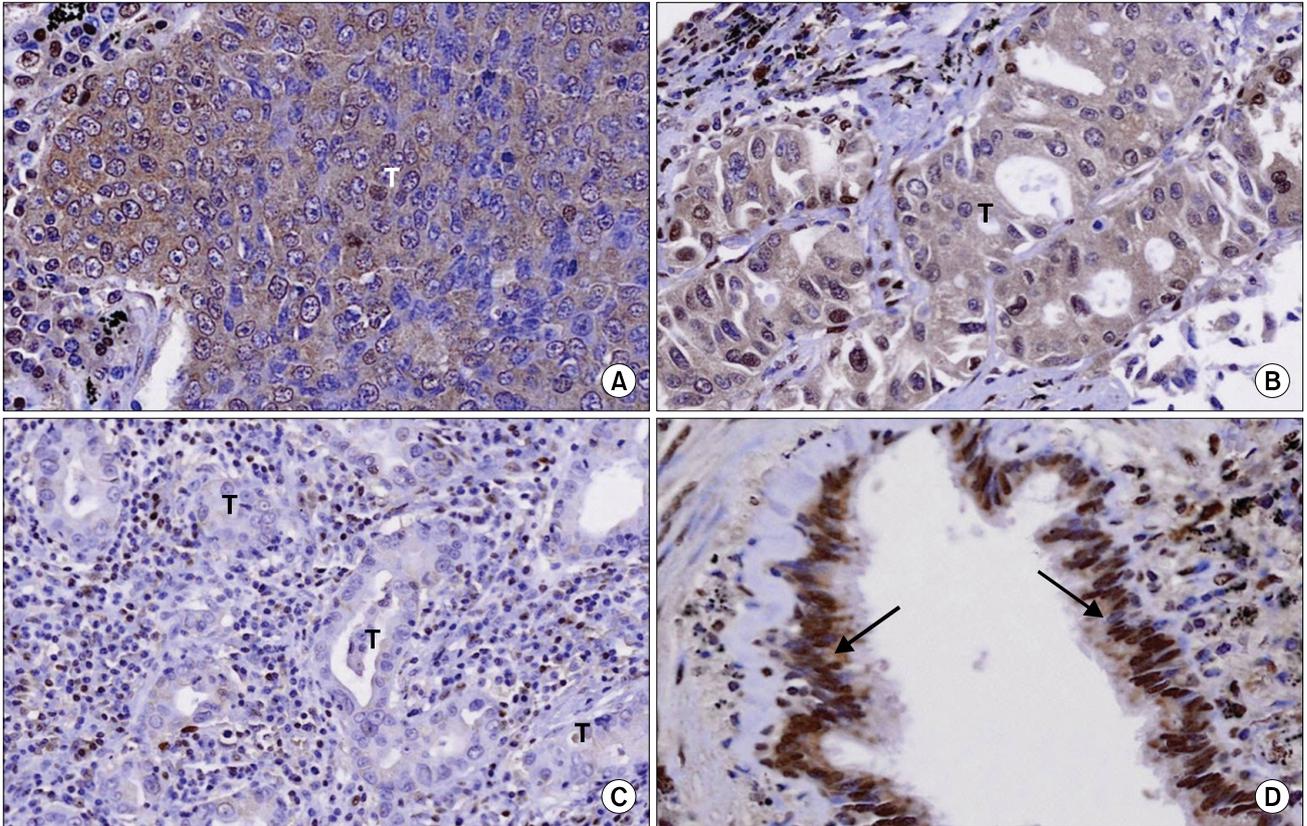


Fig. 2. Visualization of DOK2 expression in lung cancer tissues by immunohistochemistry. (A) A nest of a squamous cell carcinoma (T) shows DOK2 immunostaining in the cancer cells. (B) Glands of an adenocarcinoma shows DOK2 immunostaining in the cancer cells (T). (C) In another adenocarcinoma, the cancer cells in the glands (T) are negative for DOK2 immunostaining. (D) Normal bronchial epithelial cells (arrow) are positive for DOK2 immunostaining (original magnification A, B, D, $\times 200$; C, $\times 100$).

3) 이형접합체 소실(loss of heterozygosity)

22예의 편평상피암은 14예에서, 23예의 샘암은 15예에서 이형접합체 소실 분석이 가능했다(informative). 이들 14예의 편평상피암에서 3예(21%)와 15예의 샘암에서 4예(27%)가 이형접합체 소실을 보였다(Table 2). 이형접합체 소실을 보인 7예 모두가 DOK2 단백질의 발현이 면역 염색에서 소실된 것을 관찰하였다.

고안 및 결론

타이로신 인산화 신호전달계가 암에서 활성화되며, 타이로신 인산화의 억제 유전자인 DOK2 유전자가 사람의 폐샘암에서 유전자의 복제수 소실과 발현의 감소에 의해 불활성화 될 가능성이 높다는 선행연구가 본 연구를 시행하게 된 이유였다. 본 연구는 DOK2의 돌연변이 및 발현연구를 비소세포성 폐암을 대상으로 시행하였다. 요약하면, 본 연

구의 목적은 DOK2 유전자의 돌연변이와 발현을 함께 비소세포성 폐암 조직에서 조사하여 비소세포성 폐암의 발생과 타이로신 인산화 신호전달계의 관련성을 규명하는 것이었다. 연구결과 DOK2는 정상 폐기관지 상피세포에서는 잘 발현되었지만 22%의 비소세포성 폐암에서는 발현되지 않는 것이 관찰되었다. 또한, DOK2 유전자가 45예의 비소세포성 폐암 조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였다. 이를 통해서 본 연구자들은 비소세포성 폐암의 발생과정에서 DOK2 단백질의 발현 감소가 모종의 역할을 할 가능성을 제시하였다. 하지만, DOK2 유전자의 돌연변이는 발견되지 않아 이 유전자의 돌연변이는 비소세포성 폐암의 병 발생 기전에서 중요한 역할을 담당하지 않으리라는 것을 알 수 있었다.

면역 염색에 의해 판명된 DOK2 단백질의 발현은 정상 기관지 상피에서는 잘 발현된 반면에 22%의 비소세포성 폐암에서는 발현되지 않았다(Table 3). 또한, DOK2 발현의 감소는 샘암과 편평상피암 모두에서 나타나는 것을 보였다. 폐

샘암에서 DOK2 발현감소는 보고된 바가 있지만(15), 폐의 편평상피암에서의 발현은 보고된 바가 없었다. 이는 DOK2 불활성화가 비소세포성 폐암의 조직유형과는 관계없이 암 발병에 관여할 가능성이 있음을 암시하는 결과이다.

선행연구에서 DOK2가 정상 혈액세포와 폐 상피세포에서 발현하고 종양억제 유전자로 작용한다는 것이 밝혀진 바 있다(15). 하지만, 선행연구에서 밝혀진 폐 상피의 DOK2 발현은 immunoblotting에 의한 것이어서 세포 내의 위치를 알 수 없었다. 본 연구의 면역 염색은 DOK2가 정상 폐 기관지 상피세포에서 발현한다는 것을 확인하고 그 위치가 세포질과 핵에 동시에 존재한다는 것을 보여주었다(Fig. 2). DOK2는 수용체 및 세포질의 타이로신 인산화 효소에 의해 인산화되는 adaptor protein으로 이는 세포 내의 위치가 세포질일 가능성이 높음을 제시하였다(5-15). 하지만, 본 연구의 결과는 DOK2가 세포질뿐 아니라 핵에도 발현함을 보여주었다(Fig. 2). 이 소견과 관련하여, 세포 내 단백질의 위치를 예측하는 컴퓨터 프로그램인 PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) 역시 DOK2 단백질이 세포질과 핵에 모두 존재할 것으로 예측하였다. 하지만, 현재까지의 연구로는 DOK2가 핵에서 어떤 기능하는지 알 수 없는데 이는 향후의 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다. 핵에서의 DOK2 발현은 정상세포뿐 아니라 암세포에서도 나타났는데(Fig. 2), DOK2의 핵 내 발현이 암발병에 어떤 영향을 주는지도 연구되어야 할 사항이다.

전형적인 암억제 유전자는 두 대립유전자(alleles)가 모두 불활성화 되었을 때 암 발병을 유도한다고 알려져 있다(16). 하지만, p53과 PTEN 같은 많은 종양억제 유전자가 암 발병 과정에서 하나의 대립유전자로 소실되는 경우가 많다는 것이 알려져 있으며, 이런 현상을 haploinsufficiency라고 명명한다(16,20). 선행연구를 통해 DOK2가 폐암발병에서 haploinsufficient tumor suppressor gene이라는 것이 밝혀져 있다(15). 본 연구에서 DOK2의 돌연변이는 발견되지 않았지만 이형접합체 소실이 샘암(27%) 및 편평상피암(21%)에서 관찰되었으며 이를 통해 DOK2 유전자의 대립 유전자 하나가 소실되고 haploinsufficiency가 나타날 것을 예상할 수 있다.

본 연구가 비소세포성 폐암의 DOK2 소실을 밝혔지만, 빈도(22%)는 높지 않은 편이다. 단백질 발현의 소실은 다양한 기전에 의해 나타난다. 본 연구에서는 DOK2 이형접합체 소실이 나타난 모든 예에서 DOK2 단백질의 소실이 관찰되어 이형접합체 소실이 중요한 DOK 단백질 소실의 중요한 기전임을 제시한다. 다른 대표적인 단백질 발현소실의 기전은 과메틸화(hypermethylation)이다. DOK2 단백질의 발현

이 과메틸화에 의해 조절되는지에 대한 연구는 아직 없으므로 DOK2 과메틸화가 폐암에서 나타날 가능성에 대한 조사가 필요한 실정이다. DOK2에 의한 인산화 조절 기전은 많은 경로의 종합으로 이루어지는 복잡한 기전이다(5-15). 따라서, 한 유전자의 이상과 임상 데이터의 관련성은 잘 나타나기 어려운 구조이며, 본 연구의 DOK2 발현 감소가 비소세포성 폐암 환자의 임상정보와 연관성이 없는 것도 관련이 있다고 하겠다. 향후 DOK2 이외의 DOK 유전자 및 DOK2 관련 유전자를 동시에 연구하는 것이 DOK2의 암 발병 기전 규명 및 임상관련성 규명에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:361-370.
- Neel BG, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:193-204.
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005;353:172-187.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-365.
- Di Cristofano A, Carpino N, Dunant N, et al. Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J Biol Chem* 1998;273:4827-4830.
- Suzu S, Tanaka-Douzon M, Nomaguchi K, et al. p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. *EMBO J* 2000;19:5114-5122.
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, et al. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 2001;154:345-354.
- Dong S, Corre B, Foulon E, et al. T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med* 2006;203:2509-2518.
- Gérard A, Favre C, Garçon F, et al. Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene* 2004;23:1594-1598.
- Cong F, Yuan B, Goff SP. Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol Cell Biol* 1999;19:8314-8325.
- Jones N, Dumont DJ. Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. *Curr Biol* 1999;9:1057-1060.
- Niki M, Di Cristofano A, Zhao M, et al. Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J Exp Med* 2004;200:1689-1695.
- Mashima R, Hishida Y, Tezuka T, Yamanashi Y. The roles

- of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol Rev* 2009;232:273-285.
14. Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, et al. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J Exp Med* 2004;200:1681-1687.
 15. Berger AH, Niki M, Morotti A, et al. Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. *Nat Genet* 2010;42:216-223.
 16. Berger AH, Pandolfi PP. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *J Pathol* 2011;223:137-146.
 17. Lee SH, Shin MS, Park WS, et al. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999;18:3754-3760.
 18. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005;24:1477-1480.
 19. Lee JW, Jeong EG, Soung YH, et al. Decreased expression of tumour suppressor Bax-interacting factor-1 (Bif-1), a Bax activator, in gastric carcinomas. *Pathology* 2006;38:312-315.
 20. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004;116:235-246.
-