

## Slutrapport för projekt nr H1047299

### Studier av mekanismer för melanomuppkomst hos avblekbar skimmel i syfte att utveckla behandlingsmetoder.

*Anslagsmottagare Dr Anna Hjälms Golovko, institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Box 582, 751 23 Uppsala*

#### Bakgrund

Mutationen som orsakar avblekbar skimmel, som ger en vackert vit häst, kan hittas hos en rad olika hästraser, såsom Arab-, Lipizzaner- och Islandshästen. Denna mutation är den absolut vanligaste orsaken till vit teckning hos hästar och har säkerligen bibehållts genom avel för den prestige som den ger dess ägare<sup>1</sup>. Skimmel-anlaget är ett dominant anlag gentemot andra standardfärger. En skimmel föds med normal färgteckning, men börjar bli gråhåriga redan under det första levnadsåret. De kan vara helt vita vid 6-8 års ålder, även om stora varitioner förekommer. Noterbart är att hudpigmenteringen förblir oförändrad. Dessa avblekbara skimlar drabbas till förbluffande hög andel av melanom med ökande ålder. Det har uppskattats att 80% av vita skimlar som har uppnått en ålder av 15 år har melanom, vilket är en väldigt ovanlig åkomma hos andra hästar<sup>2</sup>. De drabbade hästarna kan uppvisa ett flertal kraftigt pigmenterade tumörer. Dessa tumörer förekommer vid svansrotens undersida, perineum och läpparna, men också i skelettmusklerna, artärväggarna eller bukfettet<sup>3</sup>. Även om de flesta melanom initialt är av benign karaktär, så kan cirka 66% av dessa tumörer övergå till malign form. Histologiska och immunohistokemiska studier har visat att hudtumörerna förekommer vid dermis och uppvisar likheter med både humant malignt blå nevu och humant malignt desmoplastisk melanom<sup>3</sup>. Ett flertal av de vita skimlarna utvecklar också en vitiligo-liknande avpigmentering av hud, vilket tros vara ett autoimmunt svar på närvaron av melanom.

#### Medicinska och ekonomiska aspekter av melanom hos avblekbar skimmel

Melanom hos skimmel är vanligtvis av benign karaktär, men dess utveckling måste undersökas regelbundet då de kan bli stora och orsaka svårare sekundära hälsoproblem för hästen. Tumörerna kan övergå till malign fas och ge upphov till dottertumörer i de interna organen. Detta leder snabbt till sjukdomsframkallad död eller till avlivning genom veterinärs omsorg. Förutom de negativa hälsoeffekterna hos hästen, så påverkas också ägaren negativt både emotionellt och ekonomiskt (veterinärkostnader och värdeminskning).

Olika behandlingsmetoder har testats, med varierande framgång<sup>2,4</sup>. Kirurgisk avlägsnande av små tumörer kan vara framgångsrikt, men större tumörer är ofta problematiska p.g.a. dess storlek och frekventa återfall. Kemoterapi med cytostatika har prövats med varierande resultat, men har ifrågasatts på grund av den diagnostiska osäkerheten. Vacciner riktade mot tumörer är kostnadskrävande och har hittills inte gett de resultat som önskas. Generellt är det dock så att det är önskvärt med väldigt mycket effektivare behandlingsformer av melanom. Utan tvekan så skulle identifiering av involverade molekylära mekanismer bana väg för utvecklandet av nya sätt att behandla melanomtumörer hos häst.

#### Identifiering av mutationen för skimmelanlaget

Mutationen som orsakar den avblekbara skimmel anlaget är en extra kopia (duplicering) av en del (4.6 kb) av Syntaxin 17 (STX17) genen<sup>5</sup>. Denna mutation upreglerar uttrycket av både genen för STX17 och den närliggande genen Nuclear Receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3), vilket tyder på deras medverkan i upprättandet av den Skimmel-fenotypen. STX17 är en divergent medlem i familjen av syntaxin-proteiner (t-SNAREs), vars medlemmar är involverade i intracellulär vesikeltransport. Förutom den fullängdsproteinet STX17 genen kodar för en trunckerade isoform som saknar den N-terminala delen viktigt för vesikelbildning. Båda isoformerna är starkt upreglerade av Skimmel-mutationen<sup>5</sup>. Inga tidigare data har indikerat en roll STX17 i melanocyterna eller i utvecklingen av melanom, har dessutom ingen funktionell mutation ännu beskrivits i något annat däggdjur. NR4A3 tillhör NR4A-gruppen av nukleära hormonreceptorer; en grupp av proteiner involverade i bl.a. reglering av cell cykeln,

programmerad celldöd och initiering av concertillväxt<sup>6</sup>. NR4A proteinerna är involverade i processen som följer vid UV-framkallad skada av DNA i melanocyter<sup>7</sup>. Ackumulerande bevis tyder på att NR4A familjen kan ha en tumör-främjande roll i humana melanom<sup>8</sup>.

Vi har tidigare föreslagit en förklaring till varför samma mutation leder både till förlust av pigmentering i håret och melanomutveckling i huden<sup>5</sup>. Vår hypotes var att skimmelmutationen stimulerar tillväxten av pigmentceller och att detta utarmar de stamceller som behövs för pigmentering av håren samtidigt som den ökar risken för tumörutveckling av de pigmentceller som ger upphov till pigment i huden. Våra studier stödjer denna hypotes (se nedan).

## **Mål**

Den övergripande målsättningen med projektet har varit att vidarestudera de underliggande mekanismerna för skimmelfenotypen i syfte att 1) förbättra vår förståelse om melanocytbiologien och utvecklandet av melanomtumörer och 2) utveckla nya effektiva behandlingsmetoder mot melanom hos skimlar.

## **Material och metoder**

### In vitro studier

#### *Skimmelhästmelanom cellinjer*

I samarbete med Dr Seltenhammer (University of Veterinary Medicine, Wien, Österrike) har vi etablerat och utförligt karakteriserat cellinjer från primära och metastatiska skimmel melanomtumörer som användes till att studera de molekylära mekanismer bakom skimmelmutationen och evaluering av potentiella behandlingsstrategier med småmolekylära substanser.

#### *Stabila mus melanocytcellinjer*

Vi har skapat stabila mus melanocytcellinjer som överuttrycker var och en av de gener som uppregleras av Skimmel-mutationen i hästmelanocyter och melanom (i.e. NR4A3, STX17 fullängd och STX17 trunkerade proteiner) för att detaljstudera de mekanismer som ovan nämnda gener stimulerar för aktivering av respektive signaleringsväg för ökad celledelning.

### In vivo studier

#### *"knock-in" transgen möss*

För att kunna studera effekterna av mutationen i skimmel och utvecklandet av melanom, i ett fysiologiskt sammanhang, så har vi genererat en "knock-in" transgen mus som har den ortologa STX17-regionen utbytt mot hästens skimmelmutation. Den modell ska också användas till att testa olika behandlingsstrategier för melanomtumörer.

#### *Transgena zebrafiskar*

I samarbete med Dr. Tom Becker (University of Sydney, Australia) har vi genererat transgena zebrafiskar som bär på STX17-duplikationen från häst fuserat till en eGFP-reporter för att studera uttrycksmönster under embryoutvecklingen hos zebrafisk.

### Molekylärbiologiska och Biokemiska metoder

För att studera molekylära och biokemiska händelser bakom skimmelmutationen har olika metoder använts t.ex. immunoprecipitering, Western, Northern, blots, olika typ PCR, luciferase assays, immunohisto- och cytokeremi, flow cytometri, osv.

### Nästa-generationers sekvensning

Vi har använt sequence capture och nästa-generationers sekvensning för re-sekvensning av skimmel haplotypen.

## **Resultat och diskussion**

## Verkningsmekanismen bakom skimmelmutationen

### *Analys av den regulatoriska potentialen av STX17 duplikationen<sup>9</sup>*

I samarbete med Dr. Tom Becker (University of Sydney, Australia) har vi genererat transgena zebrafiskar som bär på STX17-duplikationen från häst fuserat till en eGFP-reporter och studerat uttrycksmönster under embryoutvecklingen hos zebrafisk. Våra data visar att två kopior av det duplicerade segmentet verkar som en kraftfull förstärkare i neuronala crest celler och har melonoforspecifik aktivitet under

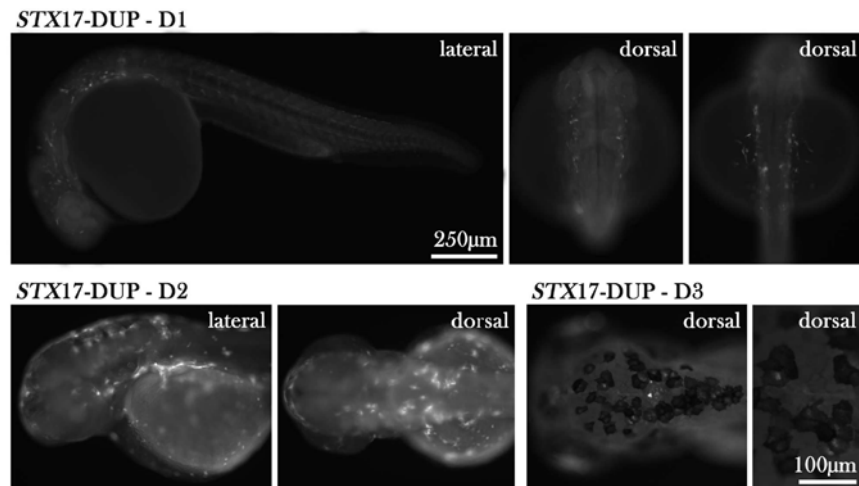
zebrafiskens embryogenes (Fig. 1), medans en kopia av det duplicerade segmentet verkas som en svagare förstärkare. Dessa effekter är helt konsistenta med fenotypen av Grey-mutationen hos skimmel. Vi har vidare utfört luciferase reporter assays i mus melan-a celler, för att studera de regulatoriska regionerna i

duplikationen och påvisa vävnadsspecifika aktiviteter av dessa element. En av regionerna upreglerade reporter genen specifikt i melanocyter; en region

som innehåller två MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) bindningsställen essentiella för aktiviteten. MITF reglerar utveckling av melanocyten och dessa av oss påvisade bindningsställen är väldigt spännande kandidater för mediering av den melanocyt-specifika aktiviteten hos dessa element. Dessa resultat ger stark support för den mekanistiska funktionen av STX17-duplikationen och ger en förklaring till den melanocyt-specifika effekten hos Grey allelen hos avlekt skimmel.

### *Analys av kopietsvariation av STX17 duplikationen i melanom hos skimmel<sup>10</sup>*

Ett förekommande fenomen är att duplikationer som orsakar en fenotyp, kan finnas i olika kopietal. Ju mer kopior desto starkare fenotyp. Vi har därför studerat om duplikation av STX17 visar kopietsvariation hos skimmel. Våra data visar entydigt olika kopietal i DNA från blod jämfört med från tumör. De högsta kopietalet förekom i tumörer klassade som aggressiva eller från hästar som avlivats på grund av interna tumörer (Fig 2, tabell 1). Dessa resultat påvisar att mutationen agerar som ett melanomdrivande regulatoriskt element. Vidare så har vi använt sequence capture och nästa-generations sekvensning för re-sekvensning av hela den 352 kb stora Grey haplotypen. Detta gjordes för att utesluta möjligheten att andra polymorfismer visar en associering till fenotypen av STX17 duplikationen, och som då potentiellt skulle kunna bidra till fenotypen. Vi har ej hittat andra mutationer som associerar starkt till fenotypen, vilket konfirmerar att STX17 duplikationen är den enda drivande mutationen hos skimmel.



**Figure 1.** Transgen zebrafisk embryos som uttrycker eGFP under kontroll av den duplicerade (två kopior; STX17-DUP) hästsekvensen uppströms av en zebrafisk gata2 promotor. Överst: Live bilder från dag 1 efter befruktning (1dpf; D1) som visar reporter uttryck i neural crest. D, E, F: Bilder vid 2dpf (D2) som visar uttryck i differentierande melanocyter. D3: Förstoring av dorsala melanoforer, som visar den epiteliala formen på dessa celler och co-uttryck med melanin.

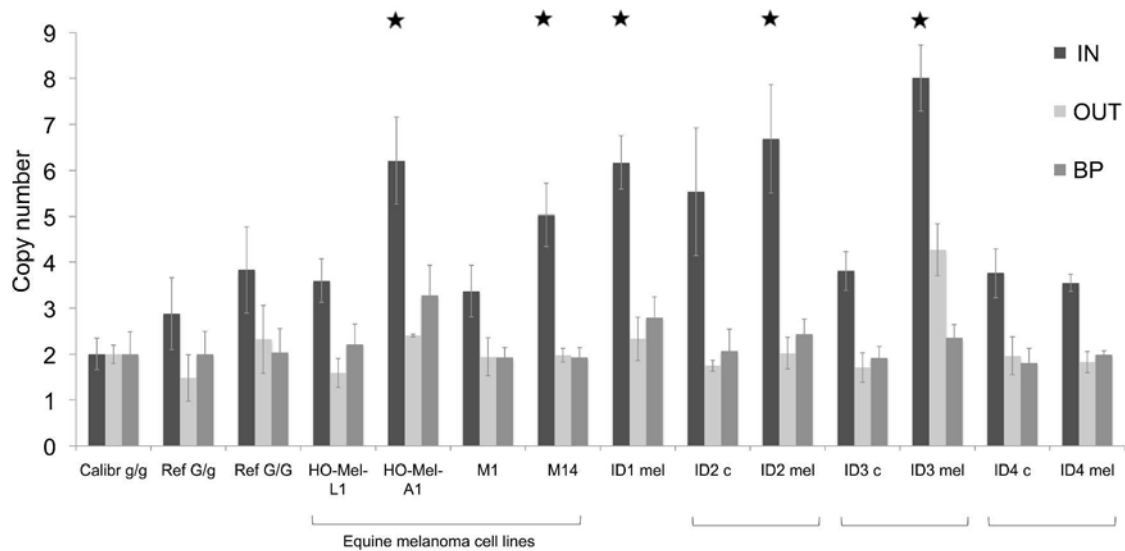


Figure 2. Kopietalsanalys av *STX17* duplikationen i DNA från kontroll (blod) DNA vs. melanoma DNA (c=kontroll DNA, mel=melanom DNA) genom användandet av tre oberoende prober; IN=internt i den duplicerade sekvensen, OUT= utanför den duplicerade sekvensen och BP=gränsen mellan den 5'-flankerade sekvensen och 5'-ändan av duplikationen. Provet "Calibr" är en g/g individ med ett känt kopietal av 2, som används som kalibrator i analysen. Blod DNA från en G/g och en G/G häst testades i analysen och resultatet är visat som en referens för förväntat kopietal för varje genotyp. Rak parantes grupperar häst melanom cellinjerna eller det parvisa DNA:t från blod och melanom prover. Felmarginaler representerar kopietalsfrekvensen erhållet från quadripla prover i varje analys som erhållits från mjukvaran CopyCaller.

ID	Grey	Type	Breed	Comments
Calibrator	<i>g/g</i>	gDNA	Arabian	Calibrator in analysis
Ref G/g	<i>G/g</i>	gDNA	Thoroughbred	Genotype reference
Ref G/G	<i>G/G</i>	gDNA	Lipizzaner	Genotype reference
HO-MelL	<i>G/g</i>	Equine melanoma cell line	Lipizzaner	Normal growth
HO-MelA	<i>G/g</i>	Equine melanoma cell line	Arabian	Malignant
M1	<i>G/g</i>	Equine melanoma cell line	Irish warmblood	Normal growth
M14	<i>G/G</i>	Equine melanoma cell line	Andalusian	Malignant
ID1	<i>G/g</i>	tumour DNA	Thoroughbred	Euthanized due to melanoma tumours
ID2	<i>G/G</i>	gDNA + tumour DNA	Shagya Arabian	Euthanized due to melanoma tumours
ID3	<i>G/g</i>	gDNA + tumour DNA	Swedish warmblood	Euthanized due to melanoma tumours
ID4	<i>G/g</i>	gDNA + tumour DNA	Connemara	Cremello (few pigments), euthanized due to laminatis, very small melanomas

Tabell 1. Prover använda i kopietalsanalys av Skimmel-lokuset

### Molekylära kedjor som påverkas av skimmelmutationen

#### *Konstant aktivering av ERK-signaleringskedjan<sup>11</sup>*

Vi har visat att MEK/ERK-signaleringskedjan är konstant aktiverad i hästens melanomaceller (Fig 3 till vänster) och ger en tillväxtbefrämjande signal i dessa celler. Denna signaleringskedja spelar en central roll för melanocyten normala celldelning och konstant aktivering av ERK1/2 har en stark koppling till utvecklandet av melanom<sup>12</sup>. Vidare så har vi hittat höga nivåer av aktivt ERK1/2 även i normala epidermala melanocyter hos Skimmlar men inte hos icke-Skimmlar (Fig 3 till höger), vilket tyder på att Skimmel melanocyter är predisponerade för melanom. Till skillnad

från de flesta humana melanom, vars aktivering av ERK signalering är kopplat till aktiverande mutationer i eller uppströms av MEK/ERK-signaleringskedjan, så finns inte sådana mutationer i melanom hos häst. Dessa fynd tyder på att närvaron av skimmelmutationen är en ny mekanism som orsakar konstant aktivering av MEK/ERK-signaleringskedjan i melanocyter. Vi föreslår en övergripande mekanism där Skimmelmutationen först orsakar signifikant ökad aktivering av ERK signalering och en efterföljande expansion av antalet mutationskopior driver utvecklandet av melanom genom än mer ökad aktivering av ERK.

### Andra tumör-relevanta signaleringskedjor<sup>12</sup>

För att definiera skillnader under utvecklandet av skimmel-melanom, så har vi jämfört två cellinjer från primära och metastatiska tumörer, respektive. Dessa cellinjer uppvisar liknande

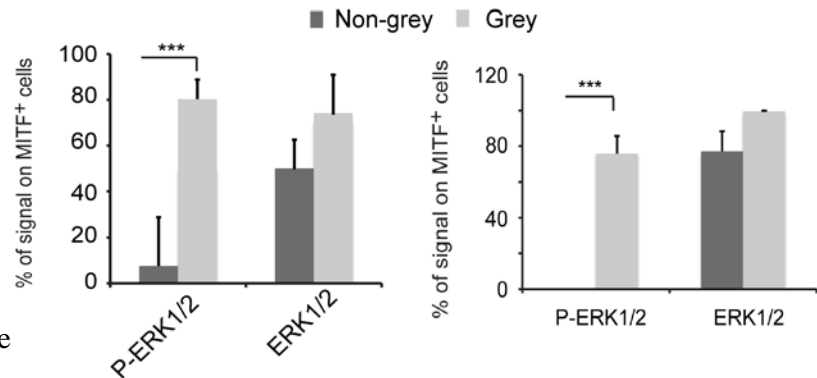
morfologi, snabb tillväxt och tumorigenes både *in vitro* och *in vivo*. Den metastatiska cellinjen uppvisar dock en signifikant ökad aggresivitet i fråga om högre prolifereringshastighet och tumörtillväxt i nakna möss, samt en nära haploid uppsättning av kromosomer; där primära cellinjen har en nära diploids uppsättning. Vi har också analyserat aktivering av olika signaleringsvägar under utvecklandet av melanom. Medans aktiveringsnivåerna hos ERK var signifikant ökad i båda cellinjerna så var PI3K/Akt endast aktiverad i den metastatiska cellinjen, vilket verkar ge ett skydd mot apoptos och en progression mot metastasis hos humana melanom. PI3K/Akt kan därmed vara involverat också i utvecklandet mot metastaser i melanom hos skimmel. Aktivering av PI3K/Akt skedde samtidigt som en förlust av PTEN tumörsuppressorer; vilket ofta ses i human melanom. Analys av expressionnivåer av andra viktiga tumörsuppressorer, p16 och p53, båda påverkade i melanom, visade att p53 var starkt uppreglerat i båda cellinjerna, medans p16 var detekterbar i den primära cellinjen så var den helt odetekterbar i den metastatiska cellinjen. Detta visar potentiellt att tumörsuppressorn p16 har en roll i utvecklandet av melanom.

### Funktionella betydelsen av de gener som påverkas av skimmelmutationen<sup>13</sup>

Studier i de nyskapade stabila mus melanocytcellinjer som överuttrycker var och en av de gener som uppregleras av Skimmel-mutationen i hästmelanocyter och melanom (i.e. NR4A3, STX17 fullängd och STX17 trunkerade proteiner) har visat att NR4A3 proteinet starkt uppreglerar ERK-kedjan vid stimulering, medan den trunkerade STX17 har upreglerande effekt på Akt-kedjan i både ostimulerad och stimulerad tillstånd. Dessutom så har vi data för att kombinerad verkan av dessa gener ökar deras effekt på de respektive signaleringskedjorna. Detta återspeglas av deras stimulerande effekt på celledelning, med den starkaste effekten uppnått av NR4A3. Dessa resultat tyder på att dessa gener kan fungera som onkogener i melanocyter och bana vägen för utveckling av genspecifika behandlingsstrategier.

### Skapandet av transgena möss

För att kunna studera effekterna av mutationen i skimmel och utvecklandet av melanom, i ett fysiologiskt sammanhang, så genererade vi "knock-in" transgena möss som har den ortologa STX17-regionen utbytt mot hästens skimmelmutation. Denna skimmelmus kommer förutom användning i studier av mekanismer för tillväxt av melanom, vara grund för test av terapeutiska



**Figure 3.** Vänster: Mätning av P-ERK1/2 och ERK1/2 immunofluorescent signaler i förhållande med den totala mängden av MITF+ celler i (vänster): melanomvävnader hos icke-skimmel (n=12; mörkgrå staplar) och skimmel (n=19; ljusgrå staplar) hästar och (höger): hudvävnader hos icke-skimmel (n=9; mörkgrå staplar) och skimmel (n=12; ljusgrå staplar) hästar, visat som mean  $\pm$  s.e. i tre oberoende försök. \*\*\*,  $P < 0.001$ .

behandlingstrategier för in vivo behandling av melanomtumörer.

#### *Tillämpad forskning*

Det andra projektets mål var att resultaten från vår grundläggande forskning, av de de underliggande mekanismerna för skimmelfenotypen, ska kunna användas för att utveckla nya effektiva behandlingsmetoder mot melanom hos dessa hästar. Våra resultat från tidigare studier indikerar att HSP90, C- och BRAF kinases, MEK/ERK och PIK3/Akt är potentiella måltavlor för farmaceutisk behandling av melanom hos skimmelhäst. Vi har också visat att vissa småmolekylära substanser mot ovannämnda aktörer har en effektiv verkan i cellinjer som har sitt ursprung från häst melanom.

Vi ska därför vidare testa dessa ämnen på våra "knock-in" transgena möss tumörer att sedan bestämma vilka av dessa substanser kan vidare testas på melanomtumörer hos skimmel hästar.

#### **Publikationer relaterade till projektet**

##### *Refereegranskade internationella tidskrifter*

1. Sundström E, Komisarczuk A, Jiang L, Golovko A, Navratilova P, Rinkwitz S, Becker TS, Andersson IL. (2011) Identification of a melanocyte-specific, microphthalmia-associated transcription factor-dependent regulatory element in the intronic duplication causing hair greying and melanoma in horses. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(1):28-36
2. Sundström E, Imsland F, Mikko S, Wade C, Sigurdsson S, Gerli Rosengren Pielberg, Golovko A, Curik I, Seltenhammer M, Sölkner J, Lindblad-Toh K, Andersson L. (2012) Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses. *BMC Genomics* 2012, 13:365.
3. Seltenhammer M, Sundström E, Falkner E, Kosiuk J, Neumüller J, Meisslitzer-Ruppitsch C, Almeder M, Cejka P, Majdic O, Steinberger P, Eder C, Losert U, Stöckl J, Niebauer G, Adolf W, Pavelka M, Andersson L, Sölkner J, Vetterlein M, Golovko A. (2014). Establishment and characterization of a primary and a metastatic melanoma cell line from Grey horses. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 50(1):56-65
4. Curik I, Druml T, Seltenhammer M, Sundström E, Pielberg GR, Andersson L, Sölkner J. (2013) Complex inheritance of melanoma and pigmentation of coat and skin in Grey horses. *PLoS Genet.* 9(2):e1003248
5. Jiang L, Campagne C, Sundström E, Imran S, Sousa P, Rosengren-Pielberg G, Seltenhammer M, Olsson MJ, Egidy G, Andersson L, Golovko A. (2014) Constitutive activation of the ERK pathway in melanoma and skin melanocytes in Grey horses. *Andra revision i BMC Cancer*

##### Konferensbidrag (projektet relevanta)

- Golovko A, Pielberg G, Sundström E, Andersson L. (2006) Functional characterization of the *Grey coat colour gene* in horses. 13<sup>th</sup> Meeting of the European Society for Pigment Cell Research, 24-27 September, Barcelona, Spain. Muntligt föredrag
- Sundström E, Pielberg G, Golovko A, Curik I, Lennartsson J, Seltenhammer M, Baumung R, Binns M, Lindgren G, Fitzsimmons C, Sandberg K, Vetterlein M, Pontén F, Heldin CH, Sölkner J & Andersson L. (2007) Positional cloning of the *Grey coat colour gene* in horses. The Biology of Genomes, May 8-12, Cold Spring Harbor Laboratory, USA Muntligt föredrag
- Golovko A, Jiang L, Pielberg G., Sundström E., Andersson L. (2009) Exploring the mechanism of a dominant mutation predisposing to melanoma in Grey horses. 15th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research. September 20–23, Münster, Germany. Muntligt föredrag
- Golovko A, Jiang L, Sundström E, Seltenhammer M, Rosengren-Pielberg G, Egidy, G, Andersson L (2010) Functional characterization of STX17 in Grey horse melanoma. 16th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research. September 4-7,

Hinxton, UK. Muntligt föredrag  
Golovko A, Völker J, Andersson, L (2014) SNP analysis of KIT gene in melanoma of Grey horses. XXII International Pigment Cell Conference. September 4-7, Singapore. Poster.

#### *Populärvetenskaplig artikel*

Sundström, E. and Andersson, L. 2008. Den vita hästens gåta löst. *Forskning och Framsteg* 8:40-43.

#### *Övrig resultatförmedling*

Vi publicerar i både vetenskapliga och populärvetenskapliga tidskrifter (se ovan nämnda publikationer) och håller ofta muntlig föredrag på olika nationella och internationella konferenser. Vi får ofta hålla muntlig framställan vid olika internationella konferenser (se ovan nämnda konferensbidrag). De data som vi presenterar, med Stiftelsen Hästforskning beskriven som finansierad, väcker stort intresse hos forskare, veterinärer och andra.

Under projekttiden anslagsmottagaren och en av våra samarbetspartner inom projektet, Dr Seltenhammer blev inbjudna att hålla ett seminarium hos Prof. Dot Bennett, University of London, UK, som senare resulterade i samarbete för odling av melanocyter och melanomceller. Anslagsmottagaren har vid annat tillfälle hållit ett föredrag för veterinärer och hästuppfödare vid Federal Stud Piber (Köflach, Austria).

Vidare har resultaten från forskningen presenterats för olika studentgrupper i olika kurser och andra sammanhang vid heminstitutionen.

Våra resultat har också spridits via publicering på websidor (t.ex. HästSverige, Formas)

#### *Övrigt*

Sammantaget har studierna varit mycket fruktsamma och lett till flera forskningssamarbeten både nationellt och internationellt (SLU; St. George's, University of London, UK; University of Veterinary Medicine, Wien, Österrike; University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Wien, Österrike; INRA-ENVA, France; University of Sydney, Australia).

#### Referenser

1. Sponenberg 2003 *Equine Coat Color Genetics*, 215. Blackwell, Ames, Iowa
2. Sutton and Coleman 1997 In: RIRDC, Barton, Australia, 1-34.
3. Seltenhammer et al. 2004. *Pigment Cell Res.* **17**, 674-681
4. Champion S (2003) <http://www.championvet.com/articles/details.asp?aID=93>
5. Rosengren-Pielberg et al. 2008 *Nature Genetics* **40**:1004 - 1009
6. Maxwell and Muscat 2006 *Nucl. Recept. Signal.* **4**: e002
7. Smith et al. 2008 *J Biol Chem.* **283**(18):12564-70
8. Smith et al. 2011 *Pigment Cell Melanoma Res* **24**: 551-563.
9. Sundström et al. 2011 *Pigment Cell Melanoma Res* **25**: 28-36.
10. Sundström et al. 2012 *BMC Genomics* **13**:365.
11. Jiang et al. 2014 *BMC Cancer* (andra revision)
12. Seltenhammer et al. 2013 *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 50(1):56-65
13. Jiang et al. (Under bearbetning)