

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Oksana Gerulis

FcγRIIB roll melanoomi inhibeerimisel

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Kiira Gildemann, MSc

TARTU 2013

Sisukord

SISUKORD.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1. Fc retseptorid: üldine iseloomustus.....	5
1.2. Fc-gamma retseptorid.....	8
1.3. Fc γ RIIB klassi retseptor hiirel ja inimesel.....	10
1.4. Fc γ RIIB retseptor ja kasvaja.....	13
1.5. Melanoom.....	14
1.6. Fc γ RIIB kui melanoomi pinnal esinev retseptor.....	17
2. Eksperimentaalne osa.....	20
2.1. Töö eesmärgid.....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Fc γ RIIB ekspresseeriva konstrukti loomine.....	21
2.2.2. Rakkude kasvatamine.....	22
2.2.3. Elektroporatsioon.....	22
2.2.4. Western Blot.....	23
2.2.5. Immunofluorestsents.....	24
2.3. Tulemused.....	26
2.3.1. Melanoomi rakuliinid ekspresseerivad Fc γ RIIB.....	26
2.3.2. Cop5_pQMc-FCGRIIB-2 ekspresseerib Fc γ RIIB retseptorit.....	27
2.3.3 Fc γ RIIB lokaliseerumine pQMc-FCGRIIB-2 konstruktiga elektroporeeritud cop5 rakkudes.....	28
2.4. Arutelu.....	31
KOKKUVÕTE.....	32
SUMMARY.....	33
KIRJANDUSE LOETELU.....	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	38

Kasutatud lühendid

ADCC – antikeha-sõltuv rakuline tsütotoksilisus (*antibody dependent cell cytotoxicity*)

ah – aminohape (*amino acid*)

Ag – antigeen (*antigen*)

BCR – B raku retseptor (*B cell receptor*)

BSA – veise albumiini seerum (*bovine serum albumin*)

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenüülindool (*4', 6-diamidino-2-phenylindole*)

EC – ekstratsellulaarne domään (*extracellular domain*)

FCS – veise loote seerum (*fetal calf serum*)

FDA – Toidu- ja Ravimi Amet (*Food and Drug Administration*)

IC – intratsellulaarne domään (*intracellular domain*)

IF – immunofluorestsents (*Immunofluorescence*)

IFN – interferoon (*interferon*)

IgSF – immunoglobuliini superpererekond (*immunoglobulin superfamily*)

IL – interleukiin (*interleukin*)

ITAM - immunoretseptori türosiinil põhinev aktiveeriv motiiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

ITIM – immunoretseptori türosiinil põhinev inhibeeriv motiiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*)

MTO – Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)

NK – loomulikud tapjarakud (*natural killer cell*)

PBS - fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus (*phosphate buffered saline*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldehüüd (paraformaldehyde)

PVDF – polüvinülideen fluoriid (*polyvinylidene fluoride*)

SDS - naatrium dodetsüül sulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

TM – transmembranne domään (*transmembrane domain*)

WWB – Western bloti pesulahus (*Western Blot Wash Buffer*)

Sissejuhatus

Fc retseptorid on immuunrakkude pinnal asetsevad glükoproteiinid. Seondudes spetsiifiliste antikehadega või nende kompleksidega, edastavad nad signaali raku sisemusse, mõjutades nii viimase funktsioone (aktiveerides või inhibeerides).

Selle klassi retseptoritüüpi, täpsemalt Fc γ RIIB, on leitud ka melanoomi rakkude pinnal. Melanoom on oma olemuselt nahavähk, mis varajases arengustaadiumis on kirurgiliselt efektiivselt ravitav, kuid siirete korral on praktiliselt ravimatu. Antud töö eesmärk on anda ülevaade nimetatud retseptorite mõjust melanoomi kasvule.

Töö alguses tutvustatakse Fc retseptorite üldist struktuuri ja funktsioone. Edasi käsitletakse melanoomi poolt ekspresseeritavaid Fc retseptoreid ja nende rolli melanoomi progressiooni kontrollis.

Töö teises osas tutvustatakse eksperimentaalse töö tulemusi, mille eesmärgiks oli konstrueerida Fc γ RIIB ekspresseeriv vektor, millega saaks edaspidi uurida täpsemalt selle retseptori rolli melanoomi inhibeerimises melanoomispetsiifiliste antikehade manustamisel.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudis. Täna oma juhendajat Kiira Gildemann, kes aitas mind käesoleva töö koostamisel. Samuti soovin tänada ka kõiki teisi mind abistanud inimesi nõuannete ja õpetussõnade eest.

1. Kirjanduse ülevaade

Rakuline retseptor on molekul raku pinnal, selle tsütoplasmas või organoidi peal, mis spetsiifiliselt reageerib kindla keemilise ühendi seondumisele, muutes oma konformatsiooni. See ühend e. ligand edastab omakorda rakule või rakulisele organellile reguloorset signaali. Ligande esineb kahte tüüpi: agoniste, mis aktiveerivad retseptoreid, ja antagonistide, mis inhibeerivad retseptoreid. (Andmed: <http://www.answers.com>).

Rakulised retseptorid jagunevad kahte klassi: rakusisesed ja transmembraansed retseptorid.

- Rakusisesteks retseptoriteks on tavaliselt transkriptsiooni faktorid (näiteks glükokortikoidide retseptorid) või valgud, mis reageerivad transkriptsiooni faktoritega. Suurem osa neist reageerivad ligandidega tsütoplasmas. Aktiveeritud retseptorid liiguvad koos ligandiga rakutuuma, seonduvad seal DNA-ga ja siis kas indutseerivad või supresseerivad mõne geeni või geenide klasteri ekspressiooni. (N.N.Muskambarov, S.L.Kuznetsov „Molekuljarnaja biologija“, 2007)
- Transmembraansed retseptorid on valgud, mis asuvad ja töötavad mitte ainult rakuvälises membraanis, vaid ka kompartmentide ja organellide membraanides. Seondumine signaalmolekuliga (hormooniga või mediaatoriga) toimub rakumembraani pinnal, aga rakuline vastus formeerub raku sisemuses. Seega, nad mängivad väga tähtsat rolli rakkudevahelistes signaalide edastamises. Paljud transmembraansed valgud koosnevad kahest või mitmest subühikust, mis toimivad koos, võivad dissotsieeruda, muuta oma konformatsiooni või minna üle kõrgemale aktivatsiooniastmele ligandiga seondues. (Andmed: <http://www.answers.com>).

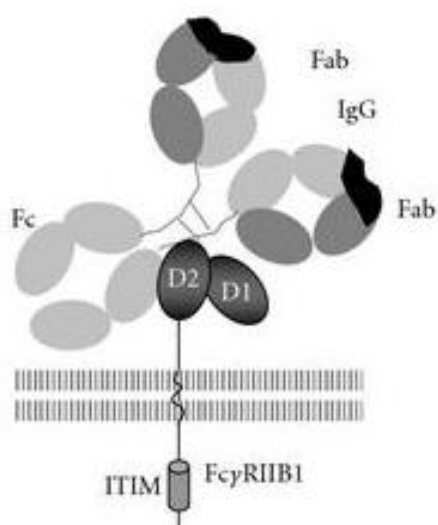
Transmembraansete retseptorite hulka kuuluvad ka Fc retseptorid.

1.1. Fc retseptorid: üldine iseloomustus

FcR on glükoproteiinid, mis kuuluvad immunoglobuliinide superperekonda (IgSF). Fc retseptorite nimetus tuleneb antikehadega seondumise eripärast – nad seovad antikeha Fc regiooni (Joonis nr. 1 ja nr. 2). On olemas mitu erinevat tüüpi Fc retseptoreid, mis on klassifitseeritud antikeha tüübi järgi, mida nad ära tunnevad. Näiteks, IgG antikeha siduvaid

retseptoreid nimetatakse Fc-gamma retseptoriteks (Fc γ retseptorid), IgA antikeha siduvaid aga Fc-alfa retseptoriteks (Fc α retseptorid) jne (Marc Daeron jt., 1997).

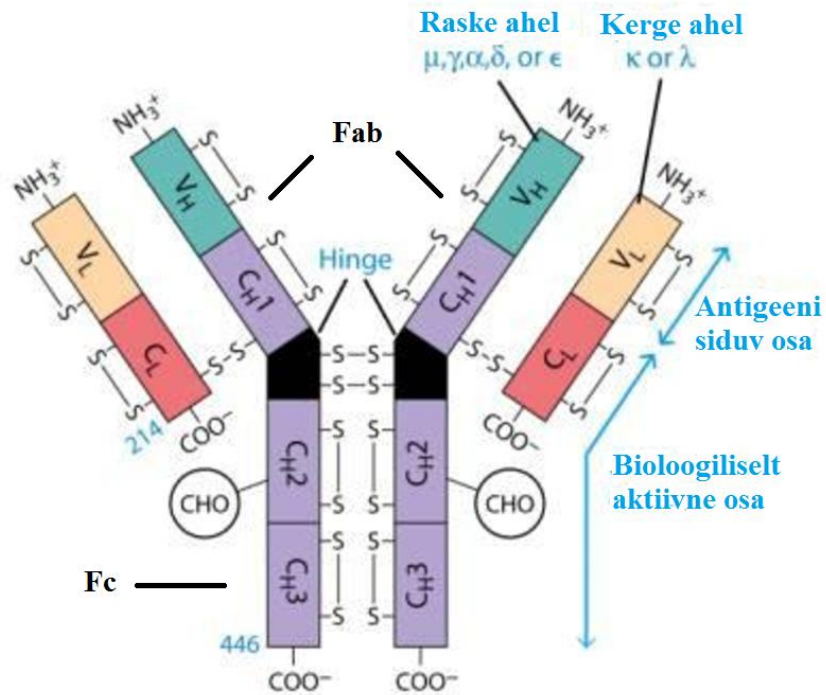
Fc retseptorid jagunevad erinevateks rühmadeks ka oma mõju järgi. Esineb aktiveerivaid retseptoreid (aktiveerivad raku funktsioone, millel nad asuvad) ja inhibeerivaid retseptoreid (inhibeerivad neid ekspresseeriva raku funktsioone). Aktiveerivatel Fc retseptoritel on intratsütoplasmaatilises osas immunoretseptor türosiinil põhinev aktiveeriv motiiv (ITAM - ing. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Marc Daeron jt., (1997)). See motiiv koosneb kahest YxxL järjestusest, mille kõrval on tavaliselt seitse muutuvat jääki (Tyr-X-X-(Leu/Ile)-X(7)-Tyr-X-X-(Leu/Ile), kus X tähistab suvalist aminohapet) (Falk Nimmerjahn and Jeffrey V. Ravetch, 2008; Marc Daeron jt., 1997). Fc retseptoritel, mis ei kutsu esile rakkude aktivatsiooni, ei ole ITAM motiivi. Neil retseptoritel on oma ehituses motiiv, mis inhibeerib rakkude funktsioone. See motiiv koosneb 13 aminohappelisest lõigust (Ala-Glu-Asn -Thr-Ile-Thr-Tyr-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Pro) (Jeffrey V.Ravetch and Lewis I. Lanier, 2000; Susheela Tridandapani jt., 2002) ja seega on tal vaid üks YxxL järjestus. Seda nimetatakse immunoretseptor türosiinil põhinevaks inhibeerivaks motiiviks (ITIM - ing. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif).(Marc Daeron jt., 1997).



Joonis nr. 1: Fc γ R retseptori seondumine IgG antikehaga Fc γ RIIB retseptori näitel (Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010)

Fc retseptoreid leidub paljude immuunsüsteemi rakkude pinnal. Siia kuuluvad dendriitilised rakud, B rakud, NK rakud, makrofaagid, neutrofiilid, eosinofiilid, basofiilid ja nuumrakud (Atsuhiko Masuda, jt., 2009). Need võimaldavad rakkudel siduda üksikuid antikehi või antigeen-antikeha immuunkomplekse (Falk Nimmerjahn jt. 2008). Fc retseptorid seovad antikehi (Atsuhiko Masuda jt., 2009; Tatyana Tarasenko jt., 2007) (Joonis nr. 1) nende Fc regiooni (nn. saba) kaudu (Joonis nr. 2). See protsess aktiveerib (juhul kui on tegemist aktiveeriva retseptoriga) Fc retseptoreid

ekspresseerivaid rakke. Fagotsütoosi aktiveerimine on kõige iseloomulikum Fc retseptorite funktsioon (Peter Boross jt., 2008; Atsuhiko Masuda jt., 2009).



Joonis nr. 2: IgG antikeha struktuur, kuhu on märgitud Fab ja Fc regiooni asukoht (“Immunology: Understanding the Immune System“, Klaus D. Elgert, 1998). Immunoglobuliinid (Ig) koosnevad kahest raskest ja kahest kergest ahelast, millest igaüks sisaldab N-terminaalset antigeeni siduvat varieeruvat domääni ja C-terminaalset konstantset domääni, mis vastutab antikehade efektorfunktsioonide eest. Antikeha COOH – terminaalset domään moodustab Fc regiooni, mis on kaasahaaratud rakulise aktivatsiooni ülekandmises, tänu oma võimele seonduda spetsiifilistele retseptoritele, mida nim. Fc retseptorid (Wolf H. Fridman, 1991).

ITAM-iga Fc retseptorid võivad esile kutsuda raku aktivatsiooni, näiteks endotsütoosi ja fagotsütoosi, kuid vastuse iseloom sõltub rakutüübist. Näiteks makrofaagid hakkavad „neelama“ ja tappa IgG antikehadega „mürgistatud“ haigustekitajat fagotsütoosi teel peale Fc retseptorite seondumist antigeen-antikeha kompleksiga. Veel ühte protsessi, mida vahendavad Fc retseptorid, nimetatakse antikeha-sõltuv raku vahendatud tsütotoksilisus (ADCC – ing. antibody dependent cell mediated cytotoxicity) (Brigitte K. Flesch and Jürgen Neppert, 2000). Selle reaktsiooni käigus vabastatakse NK rakkudest nende pinnal olevate Fc retseptorite aktiveerumise tagajärjel tsütotoksilisi molekule sisaldavad graanulid, et tappa antikehadega kaetud rakke (Joel F. G. Cohen-Solal jt, 2010; Falk Nimmerjahn and Jeffrey V. Ravetch, 2007).

1.2. Fc-gamma retseptorid

Kõik Fc γ retseptorid kuuluvad immunglobuliinide perekonda. Fc γ retseptorid omakorda jagunevad subtüüpideks: Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a), Fc γ RIIIB (CD16a), mis erinevad üksteisest oma ehituse ja affiinsuse poolest antikehade suhtes (*Atsuhiko Masuda jt., 2009; Pierre Bruhns jt., 2011*). Fc γ RI-l on kõrge affiinsus monomeersete IgG antikehade suhtes, samal ajal kui Fc γ RII ja Fc γ RIII on madala affiinsusega monomeersete IgG suhtes, kuid seovad tugevalt IgG sisaldavaid immuunkomplekse (*Lydie Cassard jt., 2002, Lydie Cassard jt., 2006*) nii inimesel (*Tabel nr. 1*) kui ka hiirel (*Tabel nr. 2*).

Tabel nr. 1: Fc γ R retseptorite affiinsus IgG antikehade suhtes inimese (*Wolf H. Fridman, 1991*). Fc γ R retseptorid on jagatud kahte tüüpi, sõltuvalt nende affiinsusest IgG suhtes. Klassikaliselt, kõrge affiinsusega retseptoriteks peetakse neid, millest K_A on suurem, kui $10^8 M^{-1}$ (Fc γ RI), samal ajal kui madala affiinsusega Fc γ R retseptoritel K_A on väiksem, kui $10^8 M^{-1}$ (Fc γ RII ja Fc γ RIII), (*Pierre Bruhns, jne., 2009*).

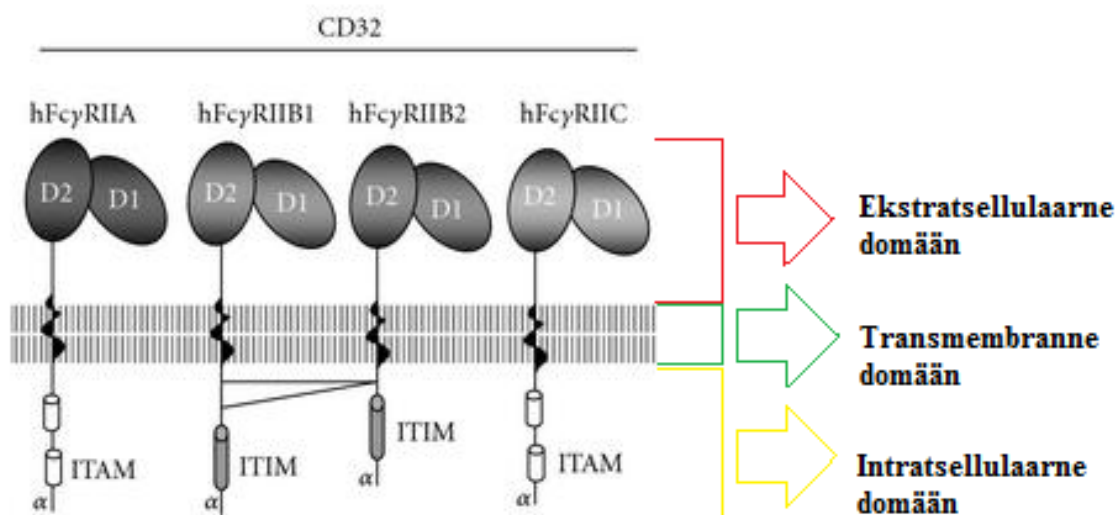
	Inimene		
	Fc γ R tüüp		
	I	II	III
Rakud	Makrofaagid	Monotsüüdid Neutrofiilid Eosinofiilid Trombotsüüdid B lümfotsüüdid	Makrofaagid Neutrofiilid Eosinofiilid NK rakud T lümfotsüüdid
Nomenklatuur	CD64	CD32	CD16
K_a	$10^8 M^{-1}$	$10^5-10^6 M^{-1}$	$10^5-10^6 M^{-1}$
Seondumine	IgG1, G3	IgG1, G3 > G2, G4	IgG1, G3 > G2, G4

Tabel nr. 2: FcγR retseptorite affiinsus IgG antikehade suhtes hiirel (Wolf H. Fridman, 1991).

Rakud	Hiir		
	FcγR tüüp		
	I	II	III
	Makrofaagid	Makrofaagid B lümfotsüüdid T lümfotsüüdid	NK rakud
Ka	10 ⁸ M ⁻¹	10 ⁵ -10 ⁶ M ⁻¹	10 ⁵ -10 ⁶ M ⁻¹
Seondumine	IgG2a	IgG1, G2b, G2a	IgG1, G2b, G2a

Hiirel ja inimesel eksisteerib kolm klassi FcγR – FcγRI, FcγRII ja FcγRIII.

Nende retseptorite üldine struktuur on sarnane: ekstratsellulaarne domään (EC - ing. extracellular domain) on moodustunud kas kahest (FcγRII, FcγRIII) või kolmest (FcγRI) Ig-domäänist, hüdrofoobsest transmembraansest (TM - ing. transmembrane domain) ja intratsellulaarsest e. rakusisesest domäänist (IC - ing. intracellular domain) (Joonis nr.3).



Joonis nr. 3: Inimese FcγR retseptorite struktuur FcγRII retseptorite näitel. Nende retseptorite üldine struktuur on sarnane: ekstratsellulaarne domään (EC - ing. extracellular domain), mis asub rakust väljaspool, hüdrofoobne transmembraanne domään (TM - ing. transmembrane domain) ja intratsellulaarne e. rakusisesene domään (IC - ing. intracellular domain) (Joel F. G. Cohen-Solal jt, 2010).

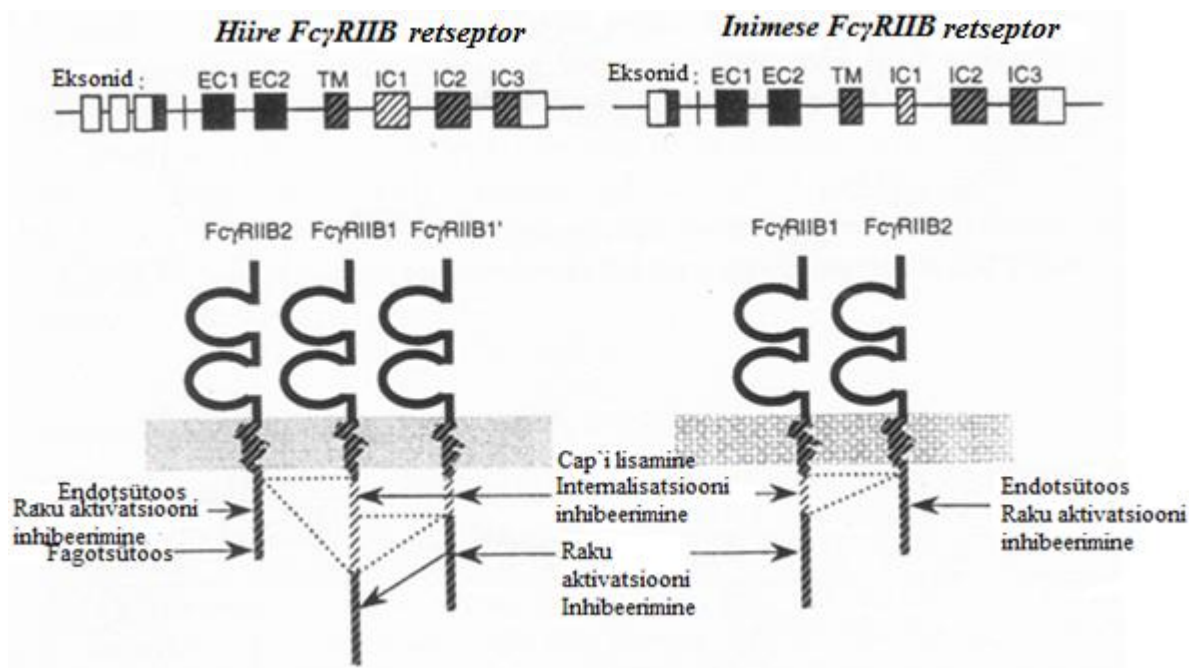
On leitud tugev homoloogia (70-95%) hiire ja inimese Fc γ R EC domäänide vahel. Alternatiivse splaisingu tõttu tekib Fc γ RII eksonitel lisatüüpi divergeerimine IC regioonis. Erinevalt sellest, TM ja EC regioonid varieeruvad Fc γ R puhul väga vähe (*Wolf H. Fridman, 1991*).

Retseptorite ekstratsellulaarne osa on keerdunud kokku kaheks või kolmeks globulaarseks domääniks, mida nimetatakse „Ig-C2“, mis koosnevad liigikaudu 90 aminohappe jäägist. Fc γ RI on kolm Ig-C2 domääni: N-terminaalne D1, D2 ja membraani-proksimaalne D3. Fc γ RII-1 ja Fc γ RIII-1 on ainult kaks nendest domäänidest: N-terminaalne D1 ja D2. D1 on tavaliselt rohkem glükosüleeritud domään kui D2 (*Joel F. G. Cohen-Solal jt, 2010*).

Fc γ R interakteeruvad immunoglobuliin G-ga (IgG) oma D2 domääni kaudu (ekstratsellulaarne domään), mis tunneb ära Fc osa IgG molekulil. Variatsioonid IgG Fc osa iseloomus, D domäänide arvus ja erinevused glükosüleerimise tasemes moduleerivad sidumisaffiinsust IgG isotüüpide ja iga kindla Fc γ R vahel (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*).

1.3.Fc γ RIIB klassi retseptor hiirel ja inimesel

Fc γ RIIB on ainuke inhibeeriva funktsiooniga retseptor, mis kuulub üheaahelaliste, IgG antikehade suhtes madala affiinsusega retseptorite hulka. Need retseptorid asetsevad rakumembraani välimises kihis (*Marc Daeron jt., 1997*). Nad on kodeeritud üksiku geeni kahe alleeliga, mis asub esimesel kromosoomil nii inimesel (1q23-24) kui ka hiirel. Ainult üks ekson kodeerib Fc γ RIIB transmembraanset domääni, kolm eksonit kodeerivad intratsellulaarset domääni. Ekstratsellulaarset domääni kodeerib inimesel kaks eksonit ja hiirel üks ekson (*Joonis nr. 4*) (*Sylvan Latour, jt. 1996*).



Joonis nr. 4: *FcγRIIB* geeni ja retseptorite skemaatiline struktuur inimesel ja hiirel. Hiire ja inimese retseptorite erinevad isovormid on moodustunud alternatiivse splaisingu tulemusena. Nende üldine struktuur on sarnane, erinedes ainult spetsiifiliste insertioonide poolest (Wolf H. Fridman, 1991). *FcγRIIB1* retseptor on mõlemal juhul pikem, sisaldades enda ehituses membraani küljes hoidvat järjestust, mis hiirel on 47 aminohapet pikk ja inimesel on see 19 aminohapet pikk (Sylvan Latour, jt. 1996).

FcγRIIB1 spetsiifiline insertioon on kodeeritud esimese IC eksoni poolt ja inimesel on see lühem (19 ah), võrreldes hiire omaga (47 ah) (Sylvan Latour, jt. 1996).

Hiire *FcγRIIB* eksisteerib kolme isovormina, mis on tekkinud *FcγRIIB* transkriptide alternatiivse splaisingu tulemusena. *FcγRIIB1* sisaldab järjestusi, mis on kodeeritud kõikide eksonite poolt. *FcγRIIB2* ei sisalda järjestusi, mis on kodeeritud esimese IC eksoni poolt. *FcγRIIB3* isovorm ei sisalda järjestusi, mis on kodeeritud TM ja IC esimese eksoni poolt. Need eksisteerivad vabalt ringlevate molekulidena (Sylvain Latour, jt. 1996).

Inimese *FcγRIIB* retseptor esineb kahe variandina: alternatiivse splaisingu tulemusena on moodustunud kaks inhibeerivat *FcγRIIB* isovormi, millest *FcγRIIB1* omab 19 aminohape pikkust membraani küljes hoidvat järjestust, mis aga puudub *FcγRIIB2-1* (Sylvan Latour, jt. 1996).

FcγRIIB2 on endotsütootiline retseptor, mida ekspresseerivad monotsüüdid, makrofaagid ja dendriitrakud. Need rakud on kaasahaaratud antigeenide protsessingu ja presenteerimise regulatsiooni (Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010). Ingrid E. Van Den Herik-Oudijk jt. on tõestanud selle retseptori endotsütootilist iseloomu. Oma uuringutes viisid nad läbi internalisatsiooni

katsed Fc γ RII retseptoritega. Tulemustest selgus, et Fc γ RIIB2 retseptor on suuteline väga efektiivseks (ca. 95%) FcR-Ab komplekside internalisatsiooniks, samas kui Fc γ RIIB1 isovorm teeb seda väga tagasihoidlikult (*Tabel nr. 3*). Nad oletasid, et tulemuste erinevustes mängib suuremat rolli just ülalmainitud 19 aminohappesest koosneva inserdi (IC ekson) olemasolu Fc γ RIIB1 retseptoris (*Ingrid E. Van Den Herik-Oudijk, jt. 1994*). Fc γ RIIB1 on mitte-endotsütootiline retseptor (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*), mida ekspresseeritakse tavaliselt B rakkudel ja nuumrakkudel (*Wolf H. Fridman, 1991*).

Tabel nr. 3: Bioloogilised efektid, mida vahendavad erinevad Fc γ RII molekulid. Fc γ RII retseptori üks isovormidest, Fc γ RIIB2 retseptor, on suuteline väga efektiivseks internalisatsiooniks, võrreldes teise isovormiga, Fc γ RIIB1 retseptoriga (*Ingrid E. Van Den Herik-Oudijk, jt. 1994*).

Function	Receptor				
	IIB1	IIB1*	IIB2	Ia	Ia Tail ⁻
Capping	++	+++	-	-	-
Internalization	+/-	-	++	+++	-

Paljud immuunsüsteemi rakud koekspressseerivad nii aktiveerivaid kui ka inhibeerivaid Fc γ R. Fc γ R-sõltuvad IgG kasvajakavastaste antikehade efektorfunktsioonid on tasakaalustatud inhibeerivate Fc γ RIIB retseptoritega. (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*).

Fc γ RIIB1 inhibeeriva retseptori koagregatsioon aktiveeriva retseptoriga, mis sisaldab ITAM motiivi, initsieerib inhibeeriva signaali (*Susheela Tridandapani jt., 2001*).

Fc γ RIIB homoagregatsioon võib põhjustada, aga võib ka mitte põhjustada ITIM türosiini fosforüleerimist. (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*). Fc γ RIIB on alati sünteesitud samaaegselt talle vastupidise toimega retseptoritega. Sellest tulenevalt, määrab konkreetse raku jaoks aktivatsioonikünnise ära aktiveeriva või inhibeeriva Fc γ R seondumissuhe (A/I suhe) antikehaga. See künnis võib olla suurendatud selliste faktorite poolt, mis kontrollivad nende retseptorite ekspressiooni rakumembraanil (faktoriteks võivad olla signaali edastamise võime või interaktsioon IgG molekuliga) (*Kenneth G. C. Smith and Menna R. Clatworthy, 2010*). Seega, kui inhibeerivate retseptorite osakaal raku peal on suurem, toimub proliferatsiooni inhibeerimine. (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*).

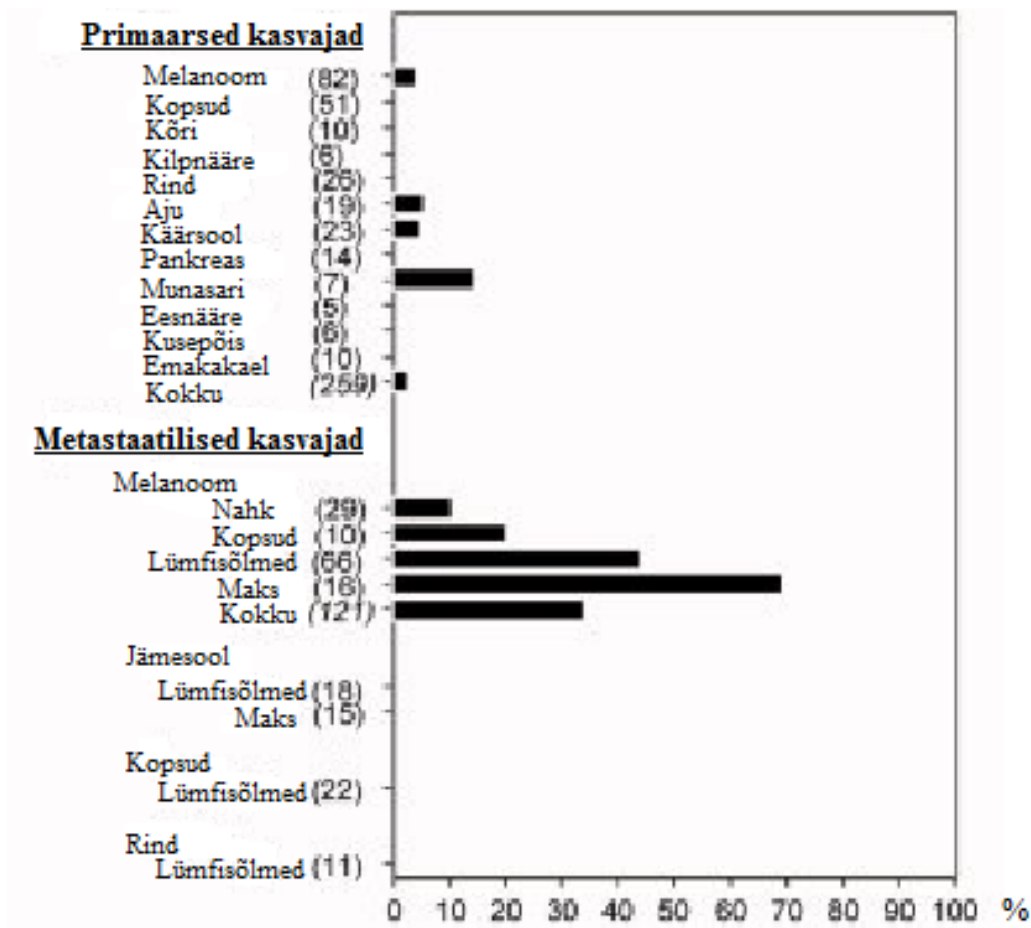
1.4.FcγRIIB retseptorid ja kasvaja

1970. aastal avastati, et ka mittevereloomelise päritoluga rakud suudavad ekspresseerida FcγR retseptoreid. Näiteks võib tuua Langerhansi rakud (nahas ja limaskestades olemasolevad dendriitilised rakud) (*Andmed: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/547591/human-skin/26798/Immunoregulation-and-Langerhans-cells?anchor=ref1104853>*) ja Purkinje rakud (suured neuronid, mida rohkelt leidub ajukese kooses) (*Andmed: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/484088/Purkinje-cell>*), mis ekspresseerivad FcγRIIB. (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*).

Milgrom jt. oletasid esimestena kasvajate võimet ekspresseerida FcγR. Nad kasutasid krüostaatilise hemadsorptsiooni tehnikat demonstreerimaks, et lõigud erinevatest hiirte sarkoomidest absorbeerisid antikehaga seotud lamba erütrotsüüte.

Tonder ja Thunold avastasid samuti, et mõned inimese mittevereloomelise päritoluga pahaloolumulised kasvajakud absorbeerisid antikehaga seotud lamba erütrotsüüte viisil, mis on sõltuv antikeha Fc osast. Samal ajal näitas Isaac Witz IgG antikehade esinemist mittelümfoidse kasvaja kudedes ja täheldas, et see seondumine ei olnud mingil moel kasvaja antigeenide spetsiifiline, oletades, et need olid seotud kasvajaga oma Fc osa kaudu (*Joel F.G. Cohen-Solal jt., 2010*).

FcγR ekspressiooni on uuritud inimese mittevereloomelise päritolu kasvajate biopsia materjalil. Analüüsiti 259 primaarset kasvajat ja 187 metastaatilist kasvajat. Tulemused näitasid, et suurem osa primaarsete kasvajate rakkudest oli negatiivsed FcγRIIB retseptori suhtes. Kuid mõnedel primaarsetel kasvajatel oli siiski retseptori madal ekspressioon. Ainult 4% käärsoole kartsinoomi (1/23), 5% melanoomi (4/85), 5% aju kartsinoomi (1/19) ja 14% munasarjade kartsinoomi (1/7) biopsiatest olid positiivsed. Võrdluseks metastaatilisest melanoomist oli 34% (45/121) positiivsed FcγRIIB suhtes. (*Lydie Cassard jt., 2008*) (*Joonis nr. 5*).



Joonis nr. 5: Horisontaalsed sambad näitavad FcγRIIB-positiivsete kasvajate protsentuaalset osakaalu. Suurem osa primaarsete kasvajate rakkudest oli negatiivsed FcγRIIB retseptori suhtes. Kuid mõnedel primaarsetel kasvajatel oli siiski retseptori madal ekspressioon, umbes 2,7% (7/259). Võrdluseks metastaatilisest melanoomist oli 34% (45/121) positiivsed FcγRIIB suhtes. (Lydie Cassard jt., 2008)

FcγR mängivad tähtsat rolli organismi immuunvastuse moodustamises ja kontrollivad IgG antikehade efektorfunktsioone. Paljude kasvajavormide puhul toodab organism tuumorivastaseid antikehi, et tuvastada kasvajakke, tekitada antigeen-antikeha komplekse ja selle kaudu aktiveerida immuunrakke ning sellega omakorda tekitada tuumorivastane immuunvastus (Marc Daeron jt., 1997)

1.5.Melanoom

Melanoom on pahaloomuline kasvaja, nahakasvaja eriliik (Joonis nr. 6), mis areneb

melanotsüütidest. Need on rakud, mis produtseerivad tumedat pigmenti melaniini, mis määrab naha värvuse (Andmed: www.kasvaja.net). See kasvajatüüp lokaliseerub valdavalt nahas, aga võib esineda ka teistes kehaosades, kaasa arvatud silma pärissoonkestas ehk koroideas (Andmed: <http://www.mayoclinic.com/health/medical/IM02341>) ja limaskestade epiteelil (suuõõnes, tupes, soolestikus) (Richard A. Sturm jt., 1998). Samas, melanoom võib tekkida igas kehaosas, kus esineb melanotsüüte. See on ohtlikeim inimese pahaloomulistest kasvajatest, mis tihti tekitab retsidiive ja metastaase lümfoogeensel ning hematogeense teel peaaegu kõikidesse organitesse (Andmed: www.kasvaja.net).



Joonis nr. 6: Melanoomi näide. Kasvaja on asümmeetriliste piirjoontega ja ebahühtlase värvusega (Andmed: <http://findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/>).

Melanoom võib ilmnedasarnaselt sünnimärgile või siis nagu värvi, vormi, suuruse või tunnetuse muutusena juba olemasolevates sünnimärkides või taretähnides. Tavaliselt on melanoom asümmeetriliste piirjoontega ja ebahühtlase värvusega. Sügelemine on veel üks tähtis tunnus melanoomi tekke puhul, kuid seda võib esineda ka healoomuliste sünnimärkide puhul. Melanoomid on tavaliselt tumepruunist kuni sinakasmustani ning nende sees võib olla erinevaid värvitoone kuni täieliku pigmentituseni välja. Sekundaarseteks nähtudeks võivad olla veritsemine, koorikutega kattumine, haavandumine, sügelemine või tüügastumine. Kliiniliselt võib melanoom esineda väga erinevate vormidena. Kui diagnoos on kindlaks tehtud õigel ajal ehk melanoomi varajases staadiumis ja on alustatud varakult raviga, on prognoos hea (Esther de Vries jt., 2003).

Haiguse etioloogia on ebaselge. Umbes 10% haigetest tekib melanoom tervele nahale (*Richard A. Sturm jt., 1998*). 10–20% areneb melanoom aastaid püsinud malignest lentiigost, eriti vanematel inimestel. Umbes 30% juhtudest areneb melanoom pigmenteeritud sünnimärgist (eriti kui neid on ärritatud, traumeeritud või need on olnud põletikus). (*Andmed: <http://www.vita.ee>*)

Kasvaja võib tekkida igas vanuses inimesel, kuid kõige sagedamini 40-60 aastastel (keskmine vanus 45a.) ja rohkem neil, kes oma töö tõttu peavad palju aega väljas päikese käes viibima (*Esther de Vries jt., 2003*). Seega, ultraviolettkiirgusel on selle tekkel oluline roll.

Melanoom on harvem esinev, võrreldes teiste kasvajatüüpidega. Siiski on see üks ohtlikematest vormidest ja põhjustab suurema osa haigestunute surma (75%) (*Andmed: www.findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/*). Vastavalt MTO (Maailma Terviseorganisatsioon) statistikale, sureb maailmas melanoomi 48 tuhat inimest aastas. Igal aastal diagnoosivad arstid maailmas umbes 160000 uut melanoomi haigusjuhtu. Naised haigestuvad sagedamini, meestel esineb nahakasvajate poole vähem, kuid mehi sureb poole rohkem, kuna melanoom avastatakse neil tihti liiga hilja. Tavaliselt ilmnevad melanoomi sümptomid meestel seljal ning naistel jalgadel ja näol (päikesega kõige rohkem mõjutatavad alad) (*Andmed: www.kasvaja.net*).

Esinemissagedus regioonides suureneb põhjast ekvaatori suunas. Erandlikult on kõrgeim haigestumus Taanis (2008. aastal 24 juhtu 100 000 elaniku kohta). Eestis on esinemissageduseks 3-5 haigusjuhtu 100 000 elaniku kohta aastas, Saksamaal 15/100 000 juhtu aastas, Austraalias aga 30-50 haigusjuhtu 100 000 elaniku kohta aastas (*Esther de Vries jt., 2003*). Viimast võib seletada ultraviolettkiirguse eest kaitsva osoonikihi hõrenemisega Austraalia kohal. Sama situatsioon on tekkinud ka Norra pealinnas Oslos, kus haigestumise tase on kõrgem, võrreldes ülejäänud Norra piirkonnaga (*Norwegian Cancer Registry, 2004*). Melanoomi esinemissagedus kasvab teadmata põhjusel aasta-aastalt üle kogu maailma (*Andmed: www.findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/*). Dermatoloogidele teeb muret, et suremus hõlmab ka noori inimesi. Ka Eestis teeb enim muret melanoomi haigestumise jätkuv suurenemine – haigus moodustab Eestis 15% kõikidest nahakasvajatest, kusjuures viimase 30 aasta jooksul on haigestumus sagenenud üle kolme korra. Samas on Eestis melanoomi haigestumine väiksem kui põhjanaabritel (*Esther de Vries jt., 2003*).

Kuigi ekvaatorile lähematel aladel on kasvaja esinemine sagedasem, on siiski mustanahalistest inimestest rohkem ohustatud valgenahalised, kuna nende nahk on päikesekiirguse suhtes tundlikum (*Richard A. Sturm jt., 1998*).

Peamiseks ravimeetodiks peetakse ka tänapäeval kasvaja kirurgilist eemaldamist. Seda meetodit kasutatakse tavaliselt melanoomi varasema staadiumi puhul, kui kasvaja on veel

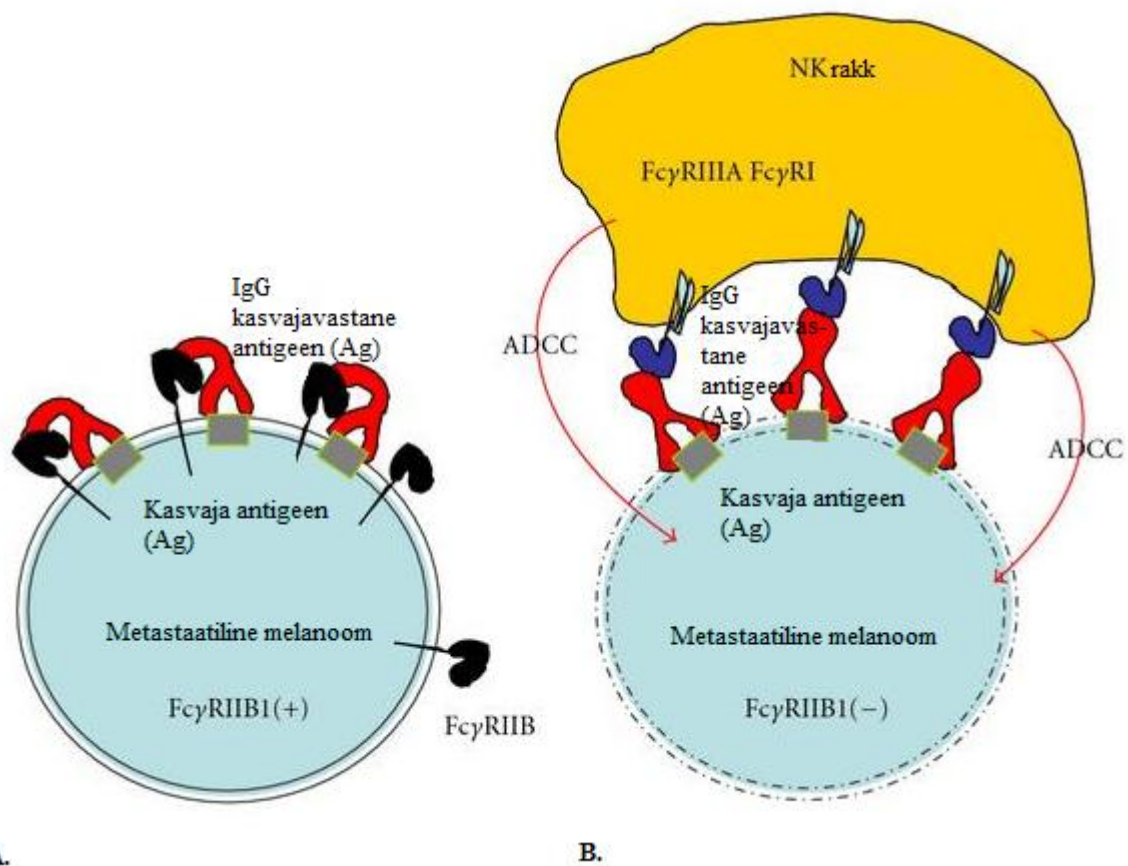
õhuke ega ole levinud naaberkudedesse (*Andmed: www.kasvaja.ee*). Peaaegu 50% juhtudel on haigus ravitav kirurgiliselt, kus elulemus 5 aasta jooksul on 80-100% (*D.M.Parkin, 2002*). Kuid kaugemale arenenud haiguse korral on prognoos kehv, kus 5 aasta elulemus on alla 10% ja suhteline elulemus on 6-8,5 kuud (*T. Crosby ja R. Fish jt., 2000*).

Kemoteraapias on melanoomi puhul kasutusel rida preparaate (näiteks müstofaraan, dakarbasiin). Praeguseks on USA Toidu-ja Ravimi ameti (FDA - ing. Food and Drug Administration) poolt heaks kiidetud ainult dakarbasiin. Raviefekt on madal, ca 6-10 %. Seetõttu leiab kemoteraapia kasutamist vaid üksikjuhtudel. Kemoteraapia kaugelearenenud melanoomi korral on jätkuvalt ebapiisav (*Lee ja Tomsu, 2000; Bajetta ja Del Vecchio, 2002*).

Uuema raviviisina on kasutusele võetud immuunoteraapia, mis baseerub printsiibil, et peremehe immuunsüsteem on võimeline genereerima immuunvastust kasvaja antigeenide vastu. Immuunravi kasutatakse operatsioonijärgse lisaravina, kui on tegemist kõrge siirete riskiga nahamelanoomiga või kui on siirded lümfisõlmedes. Ravi eesmärk on haiguse taastekke riski vähendamine. Kombinatsiooni keemiaraviga kasutatakse juhul, kui melanoom on kaugmetastaase andnud (*Adam I Riker, jt. 2007*). Praeguseks on FDA poolt kinnitatud metastaatilise melanoomi ravimiks interleukiin-2 (IL-2). Samuti on selle organisatsiooni poolt aktsepteeritud INF- α (interferoon- α) kasutamine, kuid positiivsed tulemused patsientide ravimisel on märksa harvemad (*Adam I Riker, jt. 2007; Christina J. Kim jt, 2002*).

1.6. Fc γ RIIB, kui melanoomi pinnal esinev retseptor

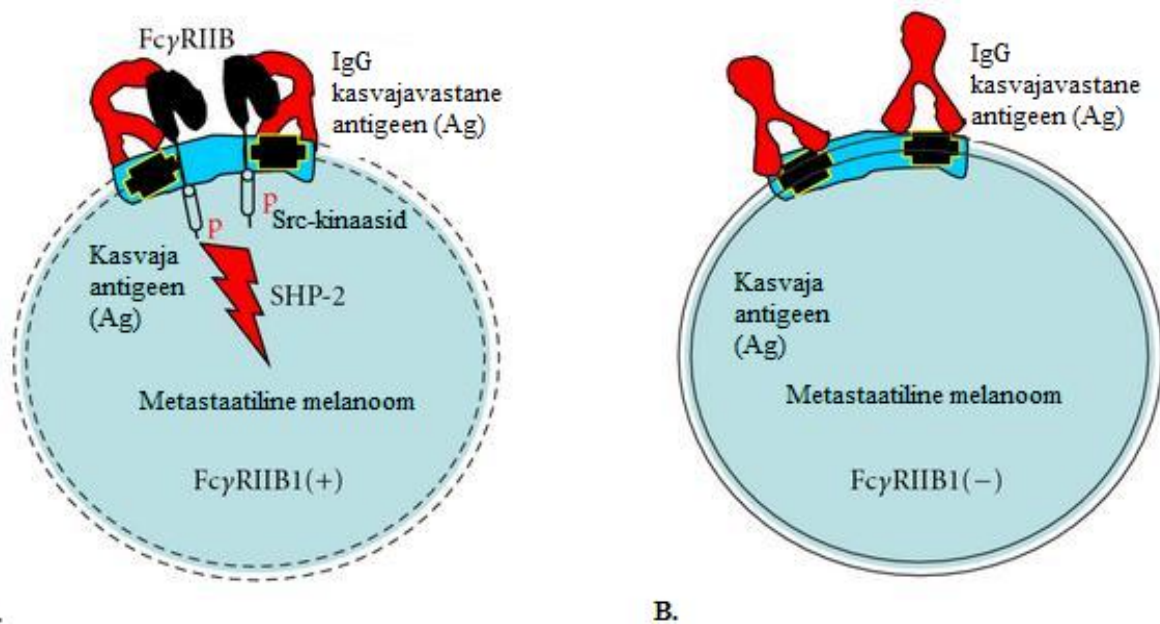
Fc γ RIIB ekspressioon kasvajal kaitseb metastaatilist melanoomi ADCC vastu (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*). Metastaatilised melanoomid, mis ekspresseerivad Fc γ RIIB retseptoreid, on resistentsed *in vitro* ja samuti immunokompetentses hiires *in vivo* ADCC vastu, mida vahendavad teatud retseptoritest sõltuvad efektorrakud (NK rakud, neutrofiilid monotsüüdid või makrofaagid) (*Lydie Cassard jt., 2008*). Kasvaja Fc γ RIIB retseptorid on ligimeelitamise retseptorid. Fc osa tuumorivastastel antikehadel on hõivatud Fc γ RIIB retseptoriga ega suuda enam seostuda efektorrakkude pinnal olevate aktiveerivate Fc γ retseptoritega (*Joonis nr. 7*) (*Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010*).



Joonis nr. 7: A) *FcγRIIB* retseptorite ekspresseerimine kasvaja pinnal kaitseb neid ADCC mõju eest: antikeha Fab region on seotud melanoomi antigeeniga, aga Fc region on seotud *FcγRIIB*, mis ei luba antikehale seonduda efektorrakkudega. B) *FcγRIIB* retseptorite puudumisel on melanoomi rakud heaks sihtmärgiks ADCC jaoks: antikeha seondub melanoomi antigeeniga, samal ajal kui tema Fc region jääb vabaks, kuhu saab liituda oma aktiveerivate Fc retseptoritega efektorrakk (Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010).

Kõik melanoomi raku pinnal leitud retseptorid on funktsionaalsed. Nad suudavad siduda antikeha Fc osa ja nende võime alustada rakkulise fosforülatsiooni kaskaadi inhibeerimist on säilinud (Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010).

Praeguseks on leitud ka, et kasutades spetsiifilisi antikehasid on võimalik melanoomi kasvu peatada. Need antikehad seonduvad oma Fab regioniga kasvajaga, sel ajal kui Fc region on seotud kasvaja pinnal olevate *FcγRIIB1* retseptoritega (Joonis nr. 8). Selle tulemusel ITIM motiiv fosforülitakse ja see lülitab sisse raku funktsioone inhibeeriva kaskaadi (Shiang-Jong Tzeng jt., 2005)



Joonis nr. 8: A) *FcγRIIB* retseptorite ekspressioon metastaatilise melanoomi pinnal inhibeerib tuumori kasvu. Antikehade seondumine metastaatilise melanoomi antigeeniga ja melanoomi rakkude pinnal oleva inhibeeriva retseptoriga kutsus esile raku funktsioone inhibeeriva kaskaadi. B) *FcγRIIB* inhibeerivate retseptorite puudumisel, antikehade seondumine melanoomi antigeeniga iseeneselt ei mõjuta raku kasvu (Joel F. G. Cohen-Solal jt., 2010).

Seega, teatud tingimustel *FcγRIIB* retseptorite ekspresseerimine metastaatilise melanoomi pinnal võib põhjustada tuumori kasvu inhibeerimist tuumorispetsiifiliste antikehadega.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

Antud töö on osa suuremast projektist. Meie laboris on eelnevalt avastatud melanoomispetsiifiline antikeha (andmed avaldamata), millel on omadus pärssida melanoomi kasvu. Selle antikeha toimemehhanismi välja selgitamisel tekkis vajadus uurida ka võimalust, et ta inhibeerib tuumori proliferatsiooni melanoomi pinnal olevate inhibeerivate Fc γ R kaudu, kuna pärssiv efekt ei esine ainult loomudelis, vaid jääb alles ka koekultuuris, kus teised immuunsüsteemi osad puuduvad. Sel antikehal on ka omadus internaliseeruda, mis samuti võib olla tingitud Fc γ RIIB2-ga seondumisest.

Meie arvates võib Fc γ RIIB2 olla üks võimalikest melanoomi kasvu pärssiva antikeha toimemehhanismidest. Seda seetõttu, et Fc γ RIIB2 võimaldab nii melanoomirakkude inhibeerimist, kui ka antikeha internaliseerimist.

Töö eesmärgiks oli esiteks konstrueerida vektor, mis kodeeriks hiire Fc γ RIIB valgu järjestust; teiseks oli vaja see konstrukt sisse viia koekultuuri rakkudesse, kus natiivselt Fc γ RIIB puudub ja testida selle ekspressiooni.

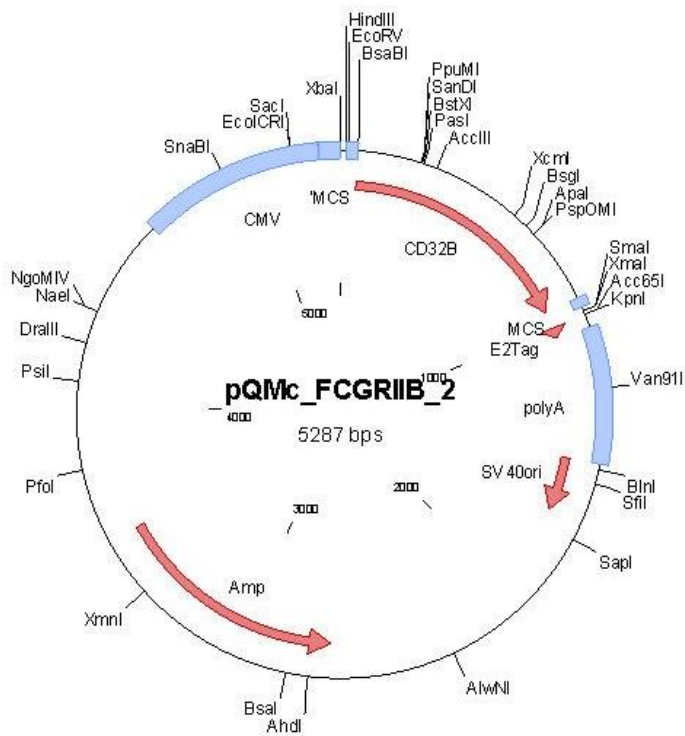
2.2.Materjal ja meetodika

2.2.1. FcγRIIB ekspresseeriva konstrukti loomine

Totaalne RNA eraldati Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudi laboris eelnevalt koekultuuris kasvatatud hiire mastotsütoomi rakuliinist P815 (Mouse lymphoblast-like mastocytoma cell line), (Nucleospin RNA2; MACHEREY-NAGEL). Eraldatud RNA pealt sünteesiti pöördtranskriptaasi abil meid huvitava retseptori kodeeriva ala üheaahelaline DNA, e. "first-strand" (RT-PCR, Fermentas). Sellele järgnes teise ahela, e. „second strand“ süntees PCR'i amplifikatsiooni reaktsiooniga. Nii esimese ahela süntees kui ka PCR oli läbi viidud FcγRIIB kodeerivale järjestusele spetsiifiliste praimeritega (forward primer – 5' TCTAGAGAGCTGATGGGAATCCTGCCG 3', reverse primer – 5' CCCGGGTAGATCCTGGCCTTTCTGGCT 3'). Praimerid disainiti kasutades Clone Manager programmi, võttes aluseks NCBI andmebaasis oleva hiire FcγRIIB järjestuse. Praimerite ottesse olid lisatud HindIII ja Cfr9I restriktasidid, et lihtsustada selle klonerimist vektorisse.

Saadud cDNA kloneriti pQMcTagA vektorisse (*Joonis nr. 9*), mis oli eelnevalt olemas meie laboris. Konstrukti klonerimiseks ja paljundamiseks kasutati kompetentseid *E.coli* rakke XL-10 (valmistatud Inoue meetodi järgi, (Inoue et al. 1990 Gene 1996)).

Valmis konstrukti sekveneeriti, et kontrollida saadud järjestust. Seda võrreldi tarkvara (Bioedit) abil NCBI andmebaasis oleva hiire FcγRIIB järjestusega.



Joonis nr. 9: Konstrueeritud pQMc_FcγRIIb plasmiid.

2.2.2. Rakkude kasvatamine

Meid huvitava retseptori ekspresseerimiseks oli valitud Cop5 - hiire fibroblastide rakuliin, kus oli eelnevalt tuvastatud (WB abil), et nad ei ekspresseeri Fc retseptorit. Rakud kasvatati IMDM söötmes (Gibco, Suurbritannia), kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FCS – ing. Fetal calf serum) (Sebak, Germany), penitsilliini ja streptomütsiini 1 U/ml, 37 °C juures 5%-lises CO₂ atmosfääris.

2.2.3. Elektroporatsioon

Katseks kasutati Gene Pulser System (BioRad) .

Üheks elektroporatsiooniks koguti ca. 2×10^6 rakku. Rakud elektroporeeriti IMDM söötmes carrier DNA ja NaBES'i juuresolekul, 220 V ja 975 μF juures ühe pulsiga. Igaks elektroporatsiooniks oli lisatud 2 μg DNA'd. Proovideks olid võetud pQMc_FcγRIIb plasmiid,

positiivseks kontrolliks oli Drp_egfp plasmiid ja negatiivseks kontrolliks olid elektroporeerimata rakud.

Rakud jäeti termostaati kasvama 37 °C juures 48 tunniks. Pärast mainitud aega koguti rakud tassidelt, pesti PBS'iga ja lüüsi lisades. 5xLaemmlli puhvrit (2%SDS, 50mM TrisHCl pH6,8, 0,1% bromofenool sinine, 2% betamercaptoetanool, 20% glütserool) ja inkubeeriti proove 10 minuti jooksul 100°C juures.

2.2.4. Western blot

Esiteks viidi läbi Western Blot erinevate mittevereloomelise päritoluga rakuliinidega FcγRIIB retseptori ekspressiooni detekteerimiseks. Nendeks rakuliinideks olid hiire melanoomi liinid - B16F0 ja B16F10; inimese melanoomi liinid - Bowes, MeWo, SK-MEL-5, SK-MEL-25 ja SK-MEL-28; HeLa (inimese emakakaelavähi rakuliin), P815 (hiire mastotsütoomi liin) ja HEK-293 (inimese embrüonaalse neeruepiteeli rakuliin). Primaarseks antikehaks kasutati goat anti-CD32B (Santa-Cruz, 1:300, mis detekteerib nii inimese kui ka hiire FcγRIIB retseptorit) ja sekundaarseks antikehaks – rabbit anti-goat (1:1000, LabAS). Analüüsi kirjeldus on allpool.

Teise Western Blot'i eesmärgiks oli kontrollida FcγRIIB ekspressiooni elektroporeeritud rakkudes. Meie poolt elektroporeeritud retseptori ekspressioon cop5 rakkudes oli analüüsitud 10%-lises SDS polüakrüülamiid geelis, vastavalt Laemmlli meetodile. Molekulaarse massi markeriks kasutati Pierce Prestained Protein Molecular Weight Markerit (Thermo Scientific).

Geeli ülekanne toimus 15V juures 15 minuti jooksul polüvinülideen fluoriid filtrile (PVDF, Millipore) (Trans-Blot, BioRad). Seejärel lõigati PVDF filter ribadeks ja inkubeeriti blokilahuses (5% lõssi, 0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20) toatemperatuuril 1 tund.

Signaalid detekteeriti inkubeerides filtriribasid erinevate primaarsete antikehadega: 2%-lõssilahuses (2% lõssi, 0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20) toatemperatuuril loksutil 1 tunni jooksul. FcγRIIB detekteerimiseks kasutati goat anti-CD32B antikeha (Santa-Cruz, 1:1000), EGFP signaali detekteerimiseks - rabbit anti-egfp antikeha (1:1000). Negatiivse kontrolli jaoks kasutati samu antikehasid. Seejärel pesti filtreid hoolikalt 3 korda 15 minuti jooksul Westerni pesulahusega (0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20; WWB – ing. Western Wash Buffer). Seejärel inkubeeriti filtriribasid sekundaarse antikeha lahusega 2%-

lõssilahuses 1 tunni jooksul loksutil toatemperatuuril (Fc γ RIIB puhul - rabbit anti-goat 1:500, LabAS.), EGFP puhul - goat anti-rabbit (LabAS, 1:2500))

Filtriribad pesti uuesti 3 korda 15minuti jooksul. Spetsiifilised signaalid olid eksponeeritud filmile kasutades Western bloti detekteerimisreagenti tugevdatud kemoluminestsentsiga (ECLtm, Amersham Biosciences).

2.2.5. Immunofluorestsents analüüs (IF)

IF analüüsi läbiviimiseks elektroporeeriti rakke uuesti, kasutades sama DNAd ja samades kontsentratsioonides, nagu mainitud ülalpool. Elektroporeeritud rakke külvati söötmega tassidele, kuhu olid paigutatud klaasid. 48 tundi hiljem tõsteti klaasid kinnitunud rakkudega kannudega plaadile edasiseks manipuleerimiseks.

Rakud olid fikseeritud 1 ml 4% PFA/PBS (paraformaldehüüd) lahuses 15 minuti jooksul toatemperatuuril ja seejärel loputatud 1 ml-ga 1x PBS lahusega.

Immunofluorestsents meetodil märklaudvalgu detekteerimiseks pooled rakkudest permeabiliseeriti 1ml 0,05% TritonX-100/PBS lahuses 5 minuti jooksul toatemperatuuril (ülejäanud rakud ei olnud permeabiliseeritud, et hinnata valgu ekspressiooni ainult raku pinnal). Seejärel rakud loputati 1ml 1x PBS lahusega. Järgnevalt blokeeriti kõik rakud 2ml 4% BSA/0,05% Tween20/PBS lahuses 30 min jooksul loksutil toatemperatuuril.

Rakud inkubeeriti primaarse antikehaga (Fc γ RIIB detekteerimiseks – goat anti-CD32B (Santa-Cruz, 1:25) , EGFP - rabbit anti-egfp (1:1000) ja negatiivse kontrolli jaoks võeti mõlemad antikehad) 1ml 2% BSA/0,05% Tween20/PBS lahuses 1 tunni jooksul toatemperatuuril. Siis rakud pesti 3 korda 5 minuti jooksul 1ml 0,05% Tween20/PBS lahusega ja loputati 1ml 1x PBS lahusega.

Järgnevalt rakke inkubeeriti sekundaarse antikehaga. Fc γ RIIB jaoks kasutati donkey anti-goat PerCP (1:1000, Santa-Cruz, CA, USA), EGFP jaoks goat anti-rabbit Alexa 488 (1:1000, Invitrogen, Ameerika Ühendriigid). Rakud inkubeeriti sekundaarse antikeha juuresolekul 1ml 2%BSA/0,05% Tween20/PBS lahuses 1 tunni jooksul loksutil pimedas. Peale seda rakud pesti, nagu ka peale primaarset antikeha (3x 5 minutit).

Rakutuumade visualiseerimiseks lisati rakkudele 1 ml 0,2 µg/µl DAPI 1x PBS lahust. Rakud inkubeeriti lahuses 30 minuti jooksul pimedas.

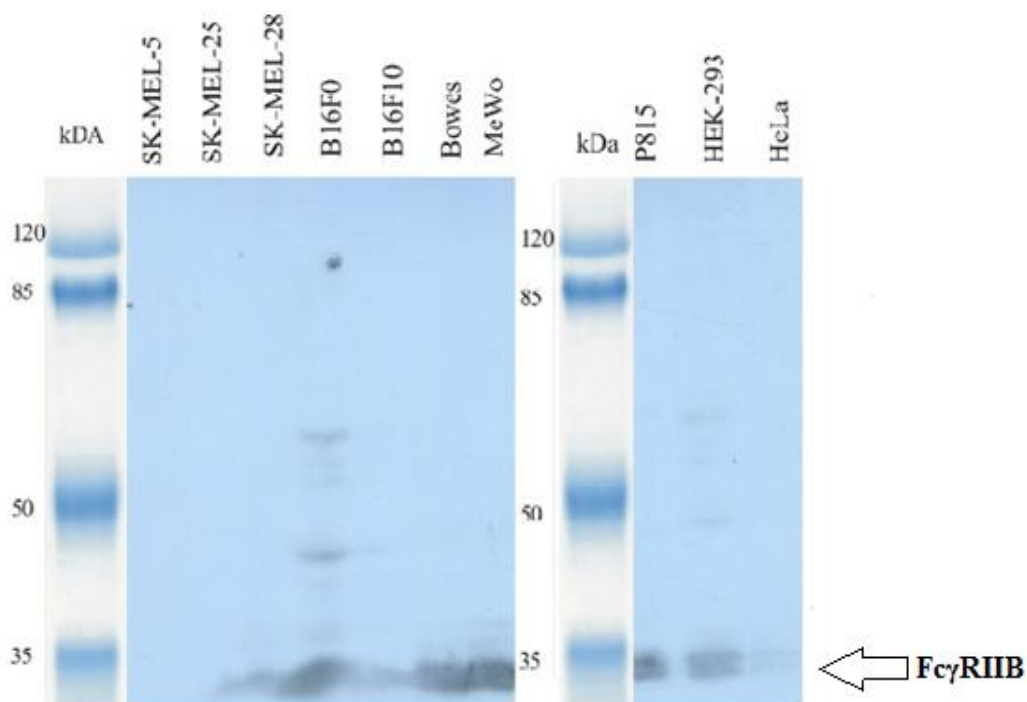
Seejärel kanti klaasid rakkudega alusklaasidele. Rakkude kuivamise ja signaali hääbumise takistamiseks kasutati Mowiol slow-fade lahust. Signaal visualiseeriti konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss AG, Saksamaa)

2.3. Tulemused

2.3.1. Melanoomi rakuliinid ekspresseerivad Fc γ RIIB

Meie laboris kasutatakse nii loomkatseteks kui ka koekultuuri katseteks erinevaid melanoomi rakuliine. Selleks et kindlaks teha, kas meid huvitava antikeha toimemehhanismiks võib olla Fc γ RIIB poolt raku inhibeerimine, oli vaja eelnevalt testida neid rakuliine Fc γ RIIB ekspressiooni suhtes. Selleks tehti Western Bloti analüüs kõikide melanoomi rakuliinide lüsaatidega – SK-MEL-5, SK-MEL-25, SK-MEL-28, MeWo, Bowes (inimese melanoomi rakuliinid); B16F0 ja B16F10 (hiire melanoomi rakuliinid). Kontrollideks võeti need rakuliinid, mis peaksid ekspresseerima Fc γ RIIB, milleks olid P815 (hiire mastotsütoomi liin) ja HEK-293 (inimese embrüonaalse neeruepiteeli rakuliin) ja negatiivne rakuliin – HeLa (inimese emakakaelavähi liin).

Fc γ RIIB detekteeriti anti-CD32 antikehaga, mis on spetsiifiline nii inimese kui ka hiire Fc γ RIIB retseptorile. Western bloti tulemused näitasid, nagu oli ka eeldatud, et peaaegu kõik meie laboris kasutatud melanoomi rakuliinid ekspresseerivad Fc γ RIIB retseptorit oma pinnal (*Joonis nr. 9*). Nagu näha joonisel nr. 9, on olemas 32 kDa retseptori signaal B16F0, B16F10, SK-MEL-28, MeWo, Bowes melanoomi liinidel, kuid see puudub SK-MEL-5 ja SK-MEL-25 liinidel.



Joonis nr. 10 : Western blot mittevereloomelise päritoluga rakuliinidega. Fc γ RIIB detekteeriti anti-CD32 antikehaga. 32 kDa retseptori signaal on näha B16F0, B16F10, SK-MEL-28, Bowes, MeWo, HEK-293, P815 rakkudel, aga puudub SK-MEL-5 ja SK-MEL-25, HeLa rakkudel.

2.3.2. Cop5_pQMc-FCGRIIB-2 ekspresseerib FcγRIIB retseptorit

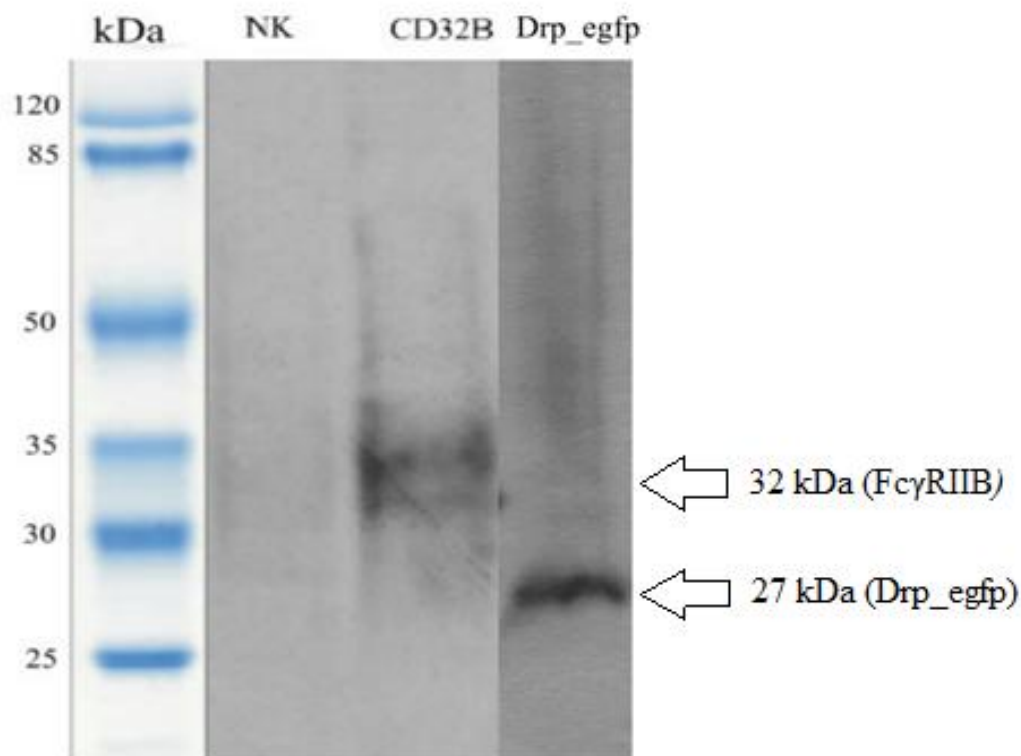
P815 rakuliinist eraldatud FcγRIIB järjestus kloneeriti edukalt pQMc vektorisse. Sekveneerimise tulemusel selgus, et meie poolt valmistatud konstruktsioon sisaldab FcγRIIB2 retseptori järjestust. FcγRIIB2 retseptor on võimeline inhibeerima raku proliferatsiooni peale kontakti antikeha Fc regiooniga.

Selleks et testida FcγRIIB retseptori võimet inhibeerida raku kasvu, oli esialgu vaja seda kodeeriv vektor sisse viia rakkudesse, mis natiivselt seda ei ekspresseeri, ja kontrollida ekspressiooni. Selleks valiti FcγRIIB negatiivne Cop5 (hiire fibroblastid) rakuliin.

Nendesse rakkudesse viidi pQMc-FCGRIIB-2 konstruktsioon sisse elektroporatsiooni abil. 48 tunni möödumisel vaadeldi retseptori ekspressioonitaset Western Bloti abil.

Sihthärg-valgu detekteerimiseks kasutati primaarse antikehana goat anti-CD32 ja sekundaarse antikehana rabbit anti-goat HRP konjugaati. Positiivse kontrolli jaoks võeti rakud, kuhu oli sisse viidud Drp_egfp konstruktsioon, et kindel olle analüüsi kõigi etappide läbiviimise korrektsuses. Negatiivse kontrolli jaoks kasutati elektroporeerimata Cop5 rakke.

Joonisel nr. 11 on näha, et cop5 rakud, kuhu oli elektroporeeritud pQMc-FCGRIIB-2 konstruktsioon, ekspresseerivad FcγRIIB retseptorit (CD32B veerg), samal ajal kui negatiivse kontrolli veerus puudus signaal (NK). Positiivse kontrolli signaal oli samuti hästi jälgitav (Drp_egfp).



Joonis nr. 11: *Cop5_pQMc-FCGRIIB-2* ekspresseerib *FcγRIIB* retseptorit. Western blot analüüs *Cop5* rakuliiniga: NK - elektroporeerimata rakud, CD32B – rakud elektroporeeritud *pQMc-FCGRIIB-2* konstruktiga, Drp_egfp - rakud elektroporeeritud Drp_egfp konstruktiga. *FcγRIIB* retseptori detekteerimiseks kasutati primaarse antikehana goat anti-CD32 ja sekundaarse antikehana rabbit anti-goat HRP. *FcγRIIB* retseptori positiivne signaal on näha 32 kDa juures CD32B veerus. Positiivseks kontrolliks oli võetud Drp_egfp elektroporeeritud rakud, mis andsid samuti selge signaali Drp_egfp veerus 27 kDa juures. Samas negiivse kontrolli rakud (NK veerg) ei andnud mingit signaali.

2.3.3. *FcγRIIB* lokaliseerumine *pQMc-FCGRIIB-2* konstruktiga elektroporeeritud *Cop5* rakkudes

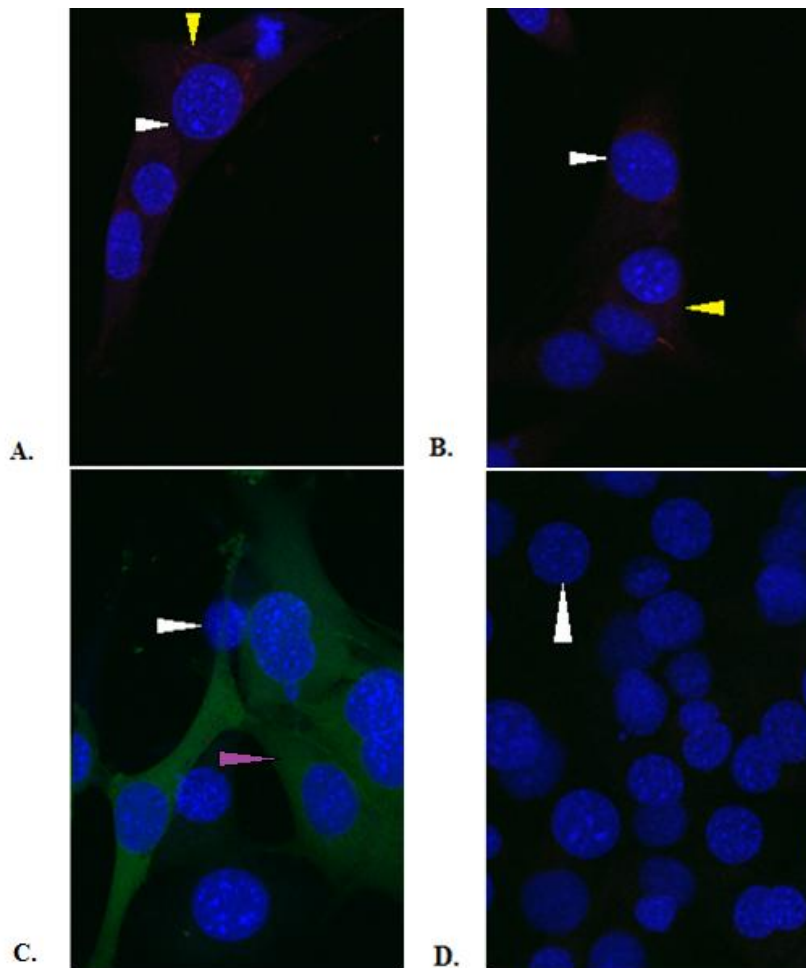
Western Bloti tulemustest selgus, et *cop5* rakud, kuhu oli eelnevalt elektroporeeritud *pQMc-FCGRIIB-2* konstrukti, ekspresseerivad *FcγRIIB* retseptorit. Antud töö järgmiseks etapiks oli välja selgitada, kas see sünteesitav retseptor on õiges konformatsioonis ja kas see viiakse ka raku pinnale.

Selleks viidi läbi immunofluorestsentsi analüüs, kus *pQMc-FCGRIIB-2* konstruktiga elektroporeeritud rakud fikseeriti klaasidele ja *FcγRIIB* retseptori ekspressiooni vaadeldi

mikroskoobiga. Fc γ RIIB signaal detekteeriti anti-CD32B antikehaga, millele seoti sekundaarne antikeha flourestseeruva märgisega. Kontrollideks olid rakud, kuhu oli sisse viidud EGFP konstrukt, ja elektroporeerimata rakud. Selleks et vaadelda retseptori ekspressiooni ainult rakupinnal, analüüsiti PFA-ga fikseeritud permeabiliseerimata rakke.

Nagu näha joonisel 12 A ja B, ekspresseerivad pQMc-FCGRIIB-2-ga elektroporeeritud Cop5 rakud Fc γ RIIB retseptorit. Fc γ RIIB signaali olemasolu (punane) permeabiliseeritud rakkudel (joonis 12.B) kinnitab, et seda retseptorit ekspresseeritakse. Permeabiliseerimata rakkudes positiivse signaali olemasolu annab tunnistust selle kohta, et retseptor asub raku pinnal.

Seega õnnestus immunofluorestsents analüüsiga kinnitada juba sekveneeritud ja WB-l kontrollitud pQMc-FCGRIIB-2 ekspressiooni ka selle meetodikaga. Samuti leidis kinnitust, et see retseptor lokaliseerub Cop5 rakkudes nii raku pinnal (Joonis 12.A), kui leidub teda ka raku sisemuses, valdavalt tuuma ümbruses (Joonis 12.B). EGFP (roheline) signaali olemasolu positiivse kontrolli rakkudes ja igasuguse signaali, peale rakutuuma signaali (sinine), puudumine negatiivses kontrollis, kinnitab, et katse oli korrektselt läbi viidud ja et tegu pole artefaktiga.



Joonis nr. 12: *FcγRIIB* ekspresseerivate Cop5 rakkude immuunfluorestsents analüüs. *FcγRIIB* signaal detekteeriti anti-CD32B antikehaga, millele seoti flourestseeruva märgisega sekundaarne antikeha. Kontrollideks olid rakud, kuhu oli sisse viidud EGFP konstrukt – positiivne kontroll, ja elektroporeerimata rakud – negatiivne kontroll. Rakutuuma visualiseerimiseks kasutati DAPI-t. Piltidel on valgete nooltega tähistatud rakutuumad (sinine), kollaste nooltega - *FcγRIIB* retseptorite olemasolu (punane), lilla värvi nooled näitavad EGFP signaali (roheline). A) Permeabiliseerimata pQMc-FCGRIIB-2 elektroporeeritud Cop5 rakud. *FcγRIIB* retseptorite signaali on näha kogu rakupinna ulatuses. B) Samad rakud nagu A, kuid permeabiliseeritud TritonX-100-ga. *FcγRIIB* retseptorite punane signaal on rohkem detekteeritav rakutuumade läheduses. C) Cop5 rakud elektroporeeritud Drp_egfp konstruktiga. EGFP roheline signaal on detekteeritav ühtlaselt kogu raku ulatuses. D) Elektroporeerimata Cop5 rakud, töödeldud samade antikehadega, näha on ainult tuuma visualiseeriv DAPI signaal.

2.4. Arutelu

Ülalpool kirjeldatud katsed on ainult väike osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on vaadelda Fc γ RIIB2 mõju mittevereloomelise päritoluga rakkude proliferatsioonile. Meie laboris on leitud melanoomispetsiifiline antikeha, mis pärsib melanoomirakkude proliferatsiooni (andmed avaldamata). Selle antikeha täpne toimemehhanism on siiani teadmata, kuid see töötab nii loomudel kui ka koekultuuris ehk rakuliinidel, kus kõik muud immuunsüsteemi komponendid puuduvad. Üks selle antikeha omadustest on ka see, et ta internaliseerub melanoomirakkudesse. Kuna Fc γ RIIB2 retseptor omab nii raku kasvu pärssivat toimet, seondudes mõne antikehaga, kui ka suudab internaliseerida endaga seotud antikeha, siis sattus see meie huviorbiiti kui potentsiaalne melanoomi pärssiva antikeha toimet vahendav retseptor.

Esmalt oli vaja kontrollida, kas meie laboris kasutusel olevad melanoomirakud ekspresseerivad Fc γ RIIB retseptorit. Western Bloti tulemused näitasid, et enamus melanoomi rakuliinidest, mida kasutati seda antikeha katsetades, omavad Fc γ RIIB retseptorit oma pinnal. Need tulemused korreleerusid ka meie laboris eelnevalt tehtud töödega, kus mõned melanoomi rakuliinid (need millel ei ole seda retseptorit) ei olnud pärsitud selle antikeha poolt.

Selleks et jälgida, kas selle antikeha toimemehhanismiks on Fc γ RIIB retseptor, oli vaja luua mudel, kus seda testida. Selleks oli vaja isoleerida Fc γ RIIB järjestus, kloneerida see ekspressioonivektorisse ja viia see sisse rakuliini, mis seda retseptorit iseenesest ei tooda. Selgus, et saadud konstrukt pQMc-FCGRIIB-2, mis sisaldab Fc γ RIIB2 kodeerivat järjestust, ekspresseerib cop5 rakuliinis Fc γ RIIB retseptorit. Immunofluorestsentsi analüüsi abil saime ka kinnituse, et selle konstrukti rakku sisse viimisel, viiakse Fc γ RIIB retseptor ka raku pinnale. See võib tähendada, et kõik selle funktsioonid säiluvad.

Seega on üks etapp antud projektist läbi viidud ja antikeha toimemehhanismi testimise mudel on välja töötatud.

Järgmiseks etapiks on selle mudeli abil uurimine, kas meie laboris leitud antikeha pärsib ka Fc γ RIIB ekspresseerivaid (elektroporeeritud Cop5 rakud) mittemelanoomi rakke.

Edaspidi on plaanis teha ka internaliseerimise katseid, et saada kinnitust retseptori võimele algatada endotsütoosi mittevereloomelise päritoluga rakkudes. Internalisatsiooni uurimise käigus tahame uurida, kuidas mõjub meie laboris avastatud melanoomispetsiifiline antikeha tuumori proliferatsioonile, sisenedes kasvajakudesse Fc γ RIIB2 retseptori kaudu või abil.

Kokkuvõte

Fc retseptorid on üks tüüp rakupinna glükoproteiinidest, mis asuvad vereloomelise päritoluga rakkude pinnal. Aga tänapäeval on teada, et neid esineb ka mittehematopoeetilise päritoluga rakkudel. Me kontrollisime ja leidsime, et kasvajakud, näiteks hiire mastotsütoomi rakud, ekspresseerivad seda valku. Selle klassi kindel retseptoritüüp, täpsemalt Fc γ RIIB, oli leitud ka melanoomi pinnal.

Fc γ RIIB2 retseptor on meie huviorbiiti tõusnud kui potentsiaalne melanoomi pärssiva antikeha mõju vahendaja, sest ta omab nii raku kasvu inhibeerivat toimet kui ka suudab internaliseerida endaga seotud antikeha. Antud töö eesmärkideks oli esiteks konstrueerida vektor, mis kodeeriks hiire Fc γ RIIB valgu järjestust. P815 rakuliinist eraldatud RNA-lt amplifitseeritud Fc γ RIIB järjestus oli edukalt kloonitud pQMc vektorisse. Saadud pQMc-FCGRIIB-2 konstrukti sekveneerimisel selgus, et meie poolt valmistatud plasmiid sisaldab Fc γ RIIB2 retseptori järjestust.

Teiseks oli vajalik see konstruktsioon sisse viia rakkudesse, kus natiivselt Fc γ RIIB ekspressioon puudub, ja testida selle ekspressiooni taset, et edasistes eksperimentides uurida retseptori võimet inhibeerida raku kasvu. Selleks valiti Cop5 (hiire fibroblastid) rakuliin. Western bloti tulemustest selgus, et rakud, kuhu oli elektroporeeritud pQMc-FCGRIIB-2 konstruktsioon, ekspresseerivad Fc γ RIIB retseptorit.

Selle töö järgmine etapp oli välja selgitada, kas Cop5 rakuliinis sünteesitav retseptor on ka õiges konformatsioonis ja kas see viiakse ka raku pinnale. Selleks viidi läbi immunofluorestsentsi analüüs. Et kontrollida retseptori ekspressiooni ainult raku pinnal, tehti analüüs nii permeabiliseeritud kui ka permeabiliseerimata rakkudel. Tulemused näitasid, et retseptoreid ekspresseeritakse elektroporeeritud rakkudes ja need viiakse ka rakkude pinnale.

Tehtu on väike osa suuremast uurimistööst, võimaldades ka edaspidi uurida Fc γ RIIB retseptorit. Tulevikus on plaanis tegeleda meie laboris avastatud melanoomispetsiifilise antikehaga ja selle toimemehhanismi väljaselgitamisega. Plaanis on teha proliferatsiooni katseid, kasutades transientselt Fc γ RIIB ekspresseerivaid Cop5 rakke ja melanoomispetsiifilist antikeha, et vaadelda selle antikeha mõju mitte-melanoomi, kuid Fc γ RIIB positiivsete kasvaja rakkudele. Kuna me teame, et meie melanoomi-spetsiifiline antikeha viiakse melanoomi rakkudesse, on vajalik teostada ka internaliseerimise katseid elektroporeeritud Cop5 rakkudega. Vajadusel võib läbi viia ka mõned muud analüüsid, mida kasutati antikeha omaduste kirjeldamiseks melanoomi rakkudega, nagu näiteks rakutsükli ja apoptoosi analüüsid. Positiivsete tulemuste korral on plaanis vaadelda seda mudelit inimese rakkude peal.

FcγRIIB role in the inhibition of melanoma

Summary

Oksana Gerulis

Fc receptors are a type of cell surface receptors that are typically found in cells with hematopoietic origin, although they have been shown to be present in non-hematopoietic cells also. We have proved that tumor cells like those of mouse mastocytoma also express this protein. A specific receptor FcγRIIB was found to be expressed in melanoma cells.

FcγRIIB2 receptor attracted attention as a potential mechanism of action of melanoma suppressing antibody, developed in our lab, because of its cytostatic effects and the ability to internalize the antibody that binds to it.

The aim of this thesis was to, at first, construct a mouse FcγRIIB protein encoding vector. FcγRIIB sequence was successfully derived from the P815 cell line and cloned into pQMc vector. Sequencing showed that our construct contains FcγRIIB2 receptor encoding sequence. Secondly, the construct was inserted into a cell line with no native FcγRIIB receptor expression, so that in the future, we could do some studies to determine the receptor's ability to inhibit cell growth. For those purposes the Cop5 (mouse fibroblasts) cell line was chosen. The results of Western blot analysis confirmed that cells with pQMc-FCGRIIB-2 construct electroporated into them do in fact express the FcγRIIB receptor.

The next step of this work was to confirm that the correct conformation of the receptor is synthesized and that it is in fact transported to the cell surface. For that purpose immunofluorescence analysis was performed on un-permeabilized cells. The results showed the receptor conformation to be correct and confirmed its expression on the surface of electroporated cells.

This work is a small part of a bigger study and we hope to continue studying the FcγRIIB receptor. Further studies on melanoma-suppressing antibody and its properties as well as continuing research on the cytostatic effect of FcγRIIB receptor on non-melanoma cells should be conducted. Electroporated Cop5 cell internalization tests should follow, since our melanoma-specific antibody is inserted into melanoma cells. If required additional analyses that were used to describe antibody's properties, such as cell cycle and apoptosis tests, could be performed. In case of positive results this model should be tested on human cells. If the latter will be conducted successfully, then the testing on human cell lines would be warranted.

KIRJANDUSE LOETELU

Adam I Riker, Soroosh Radfar, SuHu Liu, Yixiang Wang & Hung T Khong. (2007). Immunotherapy of melanoma: a critical review of current concepts and future strategies. Expert Opin. Biol. Ther. (2007) 7(3):1471-2598.

Atsuhiko Masuda, Masaru Yoshida, Hideyuki Shiomi, Yoshinori Morita, Hiromu Kutsumi, Hidet Inokuchi, Shigeto Mizuno, Akira Nakamura, Toshiyuki Takai, Richard S. Blumberg and Takeshi Azuma. (2009). Role of Fc Receptors as a Therapeutic Target. Inflammation & Allergy – Drug Targets, 2009, Vol. 8, No. 1.

Brigitte K. Flesch and Jürgen Neppert. (2000). Functions of the Fc Receptors for Immunoglobulin G. Journal of Clinical Laboratory Analysis 14:141-156 (2000).

Christina J. Kim, Sophie Dessureault, Dimitry Gabrilovich, Douglas S.Reintgen and Craig L. Slingluff. (2002). Immunotherapy of Melanoma. Cancer Control, January/February 2002, Vol.9, No. 1.

D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. (2002). Global cancer statistics, 2002. Ca-A Cancer Journal for Clinicians, Vol. 55, No. 2, 74-108, 2005.

E. Bajetta, M. Del Vecchio, C. Bernard-Marty et al (2002). Metastatic melanoma chemotherapy. Seminars in Oncology, Vol. 29, No. 5, 427-445, 2002.

Esther de Vries, Jerzy E. Tyczynski and D. Maxwell Parkin. Cutaneous Malignant Melanoma in Europe. (2003). European Network of Cancer Registries. International Agency for Research on Cancer. No 4, November 2003.

Falk Nimmerjahn and Jeffrey V. Ravetch. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nature Journal, vol. 8.

Falk Nimmerjahn and Jeffrey V. Ravetch. (2008). Antibodies, Fc receptors and cancer. Current Opinion in Immunology 2007, 19:239-245.

Jeffrey V. Ravetch and Lewis L. Lanier. (2000). Immune Inhibitory Receptors. Science, 2000, Vol. 290.

Joel F.G. Cohen-Solal, Lydie Cassard, Emilie M. Fournier, Shannon M. Loncar, Wolf Herman Fridman and Catherine Sautes-Fridman. (2010). Metastatic Melanoma Express Inhibitory Low Affinity Fc Gamma Receptor and Escape Humoral Immunity. Dermatology Publishing Corporation, Volume 2010, Article ID 657406, 11 pages.

Ingrid E. Van Den Herik-Oudijk, Nomdo A. C. Westerdal, Niek V. Henriquez, Peter J. A. Capel, and Jan G. J. Van De Winkel. Funktional Analys of Human FcγRII (CD32) Isoforms Expressed in B Lymphocytes. (1994). Journal of Immunology, 152:574.

Kenneth G. C. Smith, Menna R. Clatworthy. (2010). FcγRIIB autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. Nature Reviews Immunology 10, 328-343 (2010).

Klaus D. Elgert. (1998). Teaduslik raamat “ Immunology: Understanding the Immune System“. Chapter 4: Antibodies: Structure and Function. Lk: 76-104.

Lydie Cassard, Joel Cohen-Solal, Sophie Camilleri-Broet, Emilie Fournier, Wolf Herman Fridman, Catherine Sautes-Fridman. (2006). Fc gamma receptors and cancer. Springer Semin Immun 28:321-328.

Lydie Cassard, Joel F. G. Cohen-Solal, Emilie M. Fournier, Sophie Camilleri-Broet, Alain Spatz, Salem Chouaib, Cecile Badoual, Audrey Varin Sylvain Fisson, Pierre Duvillard, Charlotte Boix, Shannon M. Loncar, Xavier Sastre-Garau, Alan N. Houghton, Marie-Francoise Avril, Ion Gresser, Wolf H. Fridman and Catherine Sautes-Fridman. (2008). Selective expression of inhibitory Fcγ receptor by metastatic melanoma impairs tumor susceptibility to IgG-dependent cellular response. Int. J. Cancer: 123, 2832-2839.

Lydie Cassard, Joel F. G. Cohen-Solal, Annie Galinha, Xavier Sastre-Garau, Claire Mathiot, Jerome Galon, Thierry Dorval, Alain Bernheim, Wolf H. Fridman and Catherine Sautes-Fridman. (2002). Modulation of tumor growth by inhibitory Fcγ receptor expressed by human melanoma cells. The Journal of Clinical Investigation, November 2002, Volume 110, Number 10.

Marc Daeron. (1997). Fc Receptor Biology. Immunol. 15: 203-34 .

M. L. Lee, K. Tomsu, and K. B. Von Eschen. (2002). Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. Melanoma Research, Vol. 10, No. 1, 81-92, 2000.

N.N.Muskambarov, S.L.Kuznetsov .Molekuljarnaja biologija. (2007). Lk: 260-262. (Teaduslik raamat vene keeles).

Peter Boross, Kees van de Poel, Jan Gj Van de Winkel, Jeanette HW Leusen. (2008). Fc Receptors. Encyclopedia of Life Sciences, September 2008.

Pierre Bruhns, Bruno Iannascoli, Patrick England, David A. Mancardi, Nadine Fernandez, Sylvie Jorieux and Marc Daeron. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. Blood, April 2009, Volume 113, Number 16.

Richard A. Sturm, Neil F. Box, and Michelle Ramsay. (1998). Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. BioEssays 20:712-721, 1998.

Shiang-Jong Tzeng, Silvia Bolland, Kazunori Inabe, Tomohiro Kurosaki and Susan K. Pierce. (2005). The B Cell Inhibitory Fc Receptor Triggers Apoptosis by a Novel c-Abl Family Kinase-dependent Pathway. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, No. 42, 35247-35254.

Susheela Tridandapani, Kristina Siefker, Jean-Luc Teillaud, Jo Ellen Carter, Mark D. Wewers and Clark L. Anderson. (2002). Regulated Expression and Inhibitory Function of FcγRIIB in Human Monocytic Cells. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, No. 7, 5082-5089.

Sylvan Latour, Wolf H. Fridman, and Marc Daeron. (1996). Identification, Molecular Cloning, Biologic Properties, and Tissue Distribution of a Novel Isoform of Murine Low-Affinity IgG Receptor Homologous to Human FcγRIIB. The Journal of Immunology, 1996, 157: 189-197.

Tatyana Tarasenko, Johnathan A. Dean and Sylvia Bolland. (2007). FcγRIIB as a modulator of autoimmune disease susceptibility. *Autoimmunity*, September 2007, 40(6): 409-417.

The presence of metastatic melanoma in Norway. Norwegian Cancer Register, 2004.

T.Crosby, R.Fish, B. Coles, and M. D. Mason. (2000). Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, No. 2, CD001215, 2000.

Wolf H.Fridman. (1991). Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *The FASEB Journal*, vol.5: 2684-2690.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

1. <http://www.answers.com/topic/membrane/receptors/>
2. www.kasvaja.net
3. www.findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/
4. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/484088/Purkinje-cell>
5. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/547591/human-skin/26798/Immunoregulation-and-Langerhans-cells?anchor=ref1104853>
6. <http://www.mayoclinic.com/health/medical/IM02341>
7. <http://www.princeton.edu/genomics/mcclean/protocols/Inoue-Method-for-Preparation-of-Competent-E-Coli.pdf>