

# **Kvantitering av Regulatoriske T-celler vha. den intracellulære markøren FoxP3 og RT-PCR**

**5.års oppgave ved immunologi og transfusjonsmedisinsk avdeling, UiT**

**Student: Kristian Kolstad**

**Kull: mk-02**

**Veileder: Professor Anne Husebekk /doktorgradsstudent Maria Theres**

**Ahlen**

## **Innholdsfortegnelse:**

Resyme	s2
Forkortelser	s3
1 Introduksjon	
1,1 Mor-foster immunologi	s4
1,2 Regulatoriske T-celler	s6
1,3 Real time PCR, primere og prober	s10
1,4 FoxP3 og housekeeping genene RPL 30 og HPRT	s11
1,5 Tabell med nukleotidsekvenser for primere og prober brukt i RT-PCR	s12
1,6 Formål	s12
2 Materiale og metode	
2,1 Blodprøvemateriale	s13
2,2 Mononukleære celler	s13
2,3 Kloning av gener i e.coli bakterier vha. TOPO kloningreaksjon	s15
2,4 Eluering av plasmid fra E.coli	s16
2,5 Sekvensering av plasmid-insert	s17
2,6 Kutting og rensing av plasmid	s17
2,7 Produktene ble raskt rensset vha etanolfelling	s17
2,8 Lagging av standardkurve vha Real Time PCR	s18
2,9 Kvantitering av FoxP3 fra fullblod hos friske blodgivere	s19
3 Resultater	
3,1 cDNA syntese	s19
3,2 Screening av tranformanter etter dykning av e.coli	s20
3,3 Agarosegel med kuttet og ukuttet plasmid	s21
3,4 Standardkurver	s22
3,5 Eksempel på bruk av standardkurve	s24
4 Diskusjon/Konklusjon	
4,1 Metodeoptimalisering	s25
4,2 Standardkurver	s26
4,3 Generell diskusjon	s26
5 Referanser	s27

## Resymé:

To prosent av gravide kvinner i Norge har blodplatetyper HPA 1bb og 10 % av disse danner antistoffer mot fosterets HPA 1a positive blodplater i HPA 1a inkompatible svangerskap. Mekanismen for dette er trolig immunisering mot blodplater overført fra foster til mor (fæto-maternell blødning) eller HPA 1a antigenet introdusert via vitronectin reseptoren på invaderende trofoblaster tidlig i svangerskapet. Det vanlige er at mor tolererer fætale antigener, og alloantistoffproduksjon representerer brudd på toleranse for fætale antigener. Det er mye kunnskap om lokale immunologiske faktorer som kan forklare toleranse for fætale antigener. Tilstedeværelsen av regulatoriske CD4+ CD25+ FoxP3+ T-celler (Tregs) er en viktig faktor for å forklare det ”immunologiske paradokset” knyttet til at mor tolererer fosteret i hele svangerskapet til tross for mors immunsystem er optimalisert for å forkaste alloantigener. Regulatoriske T-celler er også sentrale i infeksjonsforsvaret, ved kreftutvikling og i forbindelse med autoimmune sykdommer, da deres oppgave er å regulere immunresponsen. FoxP3 er en relativt spesifikk markør for Tregs.

Vårt mål var å lage en prosedyre for kvantitering av FoxP3 uttrykket i Tregs fra fullblod vha. RT-PCR. FoxP3 ble amplifisert fra mRNA isolert fra blodceller hos friske blodgivere for å lage en standardkurve. Uttrykket FoxP3 ble sammenlignet med housekeeping gener som uttrykkes konstant i T-celler for å finne endringer i FoxP3 uttrykket i ulike kliniske situasjoner.

Metoden som ble laget ,ble testet på ni friske blodgivere. Dette viste at FoxP3 uttrykket ikke var konstant hos blodgivere. For få prøver ble analysert til å fortelle noe om normalområdet hos friske mennesker. Metodens nytteverdi er vanskelig å vurdere på dette tidspunkt, men ved analyser av enda flere friske blodgivere, samt sammenligning med prøver fra gravide og pasienter med ulike sykdomsbilder, vil FoxP3 uttrykket i Tregs kunne være av klinisk betydning. Forandringer i metoden med bruk av celledatering og parallelle kjøring med flowcytometri er også planlagt gjort for å få et enda klarere innblikk i hvordan FoxP3 uttrykkes i ulike situasjoner (graviditet/sykdom).

Forhåpentligvis kan metoden benyttes som et supplement til dagens diagnostikk når den er fullstendig klarlagt og evaluert.

## **Forkortelser.**

APC: Antigenpresenterende Celle

CD: Clusters of Differentiation

cDNA: Syklisk DNA

GP: Glykoprotein

HLA: Human Leukocyte Antigen

HPA: Human Platelet Antigen

IL: Interleukin

IPEX: Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X linked syndrom

MHC: Major Histocompatibility Complex

NAIT: Neonatal Alloimmun Trombocytopeni

NK: Natural Killer

RNA: Ribonucleic Acid

TLR: Toll-Like-Receptor

RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction

# 1. Introduksjon

## 1,1. Mor-foster immunologi

Fosteret har halvparten av genuttrykket fra mor og halvparten fra far. Mor har generelt et aktivt alloimmunforsvar, men tolererer normalt kontakt med føtale (paternelle) alloantigener gjennom hele svangerskapet. Hvordan kan det ha seg at de aller fleste svangerskap og fødsler gjennomføres uten alloimmunisering hvis "fremmede" antigener er i kontakt med mors immunceller omlag ni måneder? Noen ganger immuniseres imidlertid mor. To prosent av gravide kvinner er HPA 1bb positive og ti prosent av disse danner anti HPA-1a antistoffer mot fosterets HPA 1a positive blodplater. Mellom førti og femti prosent av kvinnene som danner antistoff føder barn med trombocytopeni, altså barn med økt risiko for blødninger. Man er spesielt bekymret for de intrakraniale blødningene. Grunnlaget for NAIT er oftest (>80%) at fosteret har arvet HPA 1a antigenet fra far, og mor vil i noen tilfeller immuniseres (1). Det er svært få tilfeller av dette i Norge, men det er likevel noen viktige og dels ubesvarte spørsmål innenfor dette emnet. Hvorfor er det bare noen få kvinner som danner antistoff, mens de aller fleste tolererer HPA 1a antigenet?

For å besvare spørsmålet over må man se på immunologien og interaksjonen mellom mor og foster under et svangerskap. I seg selv er det et immunologisk paradoks at et foster med celler med andre overflatemarkører enn mor kan overleve i morens kropp. Under utviklingen av placenta vandrer celler differensiert fra cytotrofoblasten, de invaderende trofoblastene inn i morens uterus. Trofoblaster er ekstraembryonalt materiale fra den ytre cellemassen av blastocysten (2). Disse differensierer og enkelte blir invasive og invaderer morens livmor. Trofoblastene har ikke-polymorfe MHC molekyler (HLA E, G og C) og umetylert DNA (3). Oppgaven deres er å erstatte endotelcellene i spiralarteriene og nedbryte muscularis mucosa slik at spiralarteriene blir vide og venelignende (4). Dermed får fosteret den nødvendige mengden næringsfylt blod. Blodstrømmen i spiralarteriene skal så mye som femtendobles i løpet av svangerskapet (4).

Man skulle tro at trofoblastene umiddelbart skulle bli angrepet av morens immunceller, men dette er som regel ikke tilfellet. Man vet imidlertid at preeklampsi trolig er

forårsaket av dårlig trofoblastfunksjon (4). Samtidig har man sett at trofoblaster har et Beta-3 integrin som en del av vitronectin reseptoren på overflaten. Beta-3 integrinet inneholder HPA 1a epitopen og kan være grunnlaget for dannelsen av antistoffer mot trombocytene, da man finner denne reseptorene igjen som en del av GP 2b3a på blodplatene. Immunisering mot denne reseptoren på trofoblasten kan dermed også føre til antistoff som reagerer med HPA 1a epitopen på blodplatene(5).

Mange beskriver den pågående mor-foster interaksjonen som en immunologisk "battleground". Man har prøvd å forklare de immunologisk interaksjonene mellom mor-foster gjennom mange kjente modeller fra de brukt i bekjempelsen av mikrober. I artikkelen "The immunological Paradox of Pregnancy: A Reappraisal", blir "Selv/infeksiøst", "Manglende Selv" og "Farlig" vurdert med tanke på om det kan forklare mor-foster interaksjonen. "Selv/infeksiøst" omhandler det at en mikroorganisme presenterer fremmed materiale til en TLR på APC, "Manglende selv" går ut på at NK celler reagerer på celler som mangler både mikrobeassosierte og selvassosierte overflatestrukturer, men "Farlig" teorien omfatter APCs reaksjon på skadet materiale. Konklusjonen ble at ingen av disse modellene var egnet, da svangerskapet måtte betraktes som et mer balansert (regulert) miljø, der fosteret måtte ernæres, men ikke angripes (3).

Det er mange teorier relatert til hvordan morens immunforsvar hindres i å angripe fosteret, men fortsatt klarer å holde ett så tett samarbeid. I uterus ser man for seg at lokale faktorer kan være viktig. Det er bl.a. vist at føtalt materiale forbruker tryptofan som er en essensiell aminosyre for celler som deler seg fort, og dermed forhindrer T celle proliferasjon (6,7). Trofoblaster uttrykker HLA G på overflaten, som er skal hindre NK celle aktivering (8). I tillegg uttrykker trofoblaster Fas ligand som fører til apoptose av aktiverte maternelle lymfocytter som uttrykker Fas. Til slutt hindres komplimentaktivering av Crry proteinet og dermed skapes det en mor-foster toleranse (9).

Selv om disse lokale faktorene forklarer hvorfor fosteret ikke angripes av mors

immunforsvar, forklarer det ikke den kjente effekten svangerskap har på bla. autoimmune sykdommer. Gravide kvinner blir ofte bedre av sine autoimmune sykdommer i forbindelse med svangerskapet. Det må altså være mer enn lokale faktorer som spiller inn. I denne sammenheng har det blitt fokusert mye på regulatoriske T-celler. Disse cellene er ikke bare aktuelle i forbindelse med mor-foster immunologi, men også i forbindelse med infeksjoner, kreft og autoimmune sykdommer er Tregs celler med på å modulere kroppens immunrespons (10).

## **1,2 Regulatoriske T-celler**

*Struktur og egenskaper.*

De regulatoriske T-cellene deles inn i induserbare og naturlig regulatoriske (10)

1) Induserbare: naive CD4+ eller CD8+, samt CD25- T-celler som blir regulatoriske etter stimulering av antigen. Disse cellene virker regulatorisk ved å produsere IL-10 og TGF-beta (10).

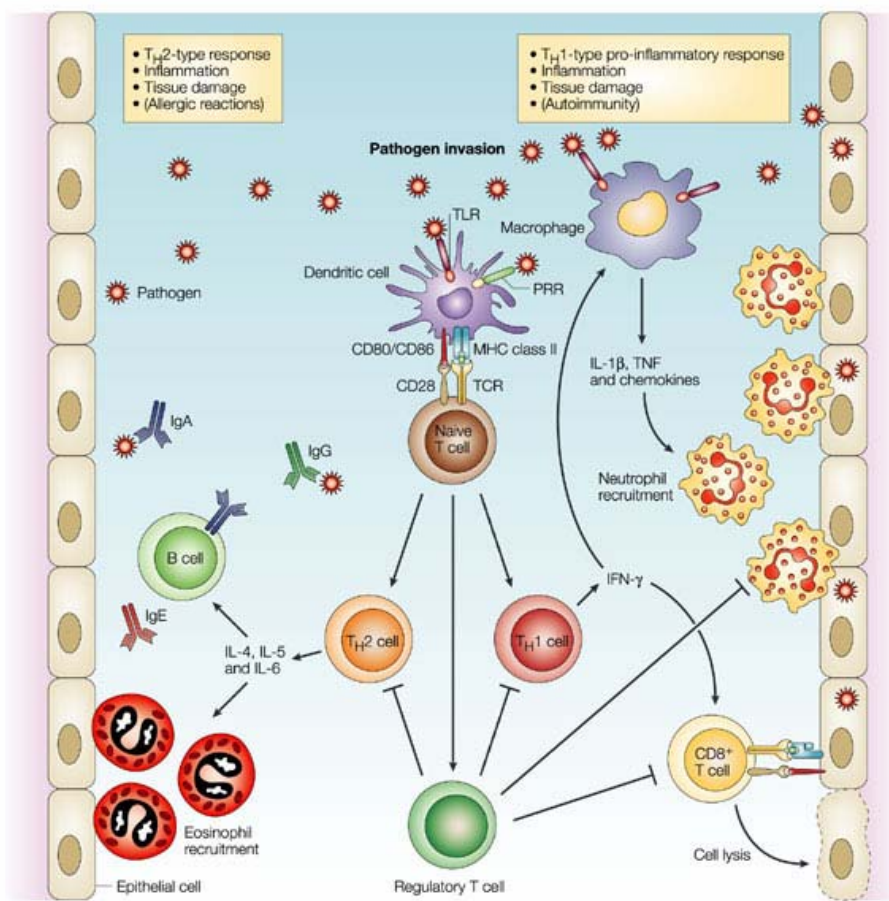
2) Naturlig regulatoriske: CD 4+ CD25+ FoxP3+ celler som produseres i tymus. Disse cellene produserer trolig også IL-10 og TGF-beta, men celle-celle interaksjoner ser ut til å være enda viktigere (kalles Tregs). CD 25 er en del av IL-2 reseptoren som etter binding av cytokinet IL 2 fører til aktivering av disse cellene. Aktiverte naturlig regulatoriske celler har CTLA 4 molekyler på overflaten. Dette molekylet virker inhibitorisk på andre T-celler (10).

Det er kjent at aktiverte T-celler har CD25 som overflatemarkør. CD25 er presentert på overflaten av Th1 og Th2 celler. Det har også blitt påvist regulatoriske egenskaper hos CD25- celler, de induserbare regulatoriske (10). CD25 egner seg dermed dårlig til å isolere og kvantitere regulatoriske T-celler. Man har nå begynt å bruke den intracellulære markøren FoxP3 i denne prosessen.

I immunologien har det lenge vært snakk om to typer T-celler, CD4+ T-hjelper celler og CD8+ cytotoxiske T-celler. De CD4+ T-cellene har videre blitt inndelt i Th1 og Th2 celler etter hvilke cytokiner de utskiller; om de er pro- eller anti-inflammatoriske. Th1 cellene produserer IFN- $\gamma$  som aktiverer CD8+ cytotoxiske T-celler og makrofager. De

fører dermed til fagocytose og celle-lysning. Makrofagene virker igjen vha TNF og kjemokiner på de nøytrofile granulocytterne. Denne "delen" av immunforsvaret kalles det cellulære immunforsvaret da det destruerer celler for å få kontroll over virus, intracellulære bakterier og parasitter, peptidantigener som presenteres for T-cellene i gropen på MHC klasse II molekyler (10,11).

De CD4<sup>+</sup> Th2 cellene produserer IL-4, 5 og 6 som stimulerer til differensiering av B-celler til antistoffproduserende plasmaceller, samt rekruttering av eosinofile granulocytter. Dette kalles det humorale immunforsvaret og er effektivt for å eliminere ekstracellulære patogener. De regulatoriske T-cellene er viktig i kontrollen/balansen i immunforsvaret (10,11).



Nature Reviews | Immunology

Fig 1: Figuren viser hvordan regulatoriske T-celler balanserer immunresponsen med at de virker på både Th2 og Th1 celler. De er dermed med å regulere den pro- og anti-inflammatoriske responsen. Mills KH, *Nature Reviews Immunology* 4, 841-855 (2004); doi:10.1038/nri1485



### *Mekanismen for funksjon*

Tregs utøver sin funksjon vha celle-celle interaksjoner og ved et sett av typiske overflatemarkører, samt via cytokiner. Cellene uttrykker CTLA 4 på overflaten ved aktivering. CTLA 4 molekylet er med i T-celle-APC interaksjonen på samme måte som CD 28 vanligvis er; det binder til B7 på APC som co-stimulerende signal (signal 2). CD28 virker aktiverende, mens CTLA 4 virker inhiberende. CTLA 4 induserer dendritiske celler til å uttrykke indoleamin 2,3-dioxygenase, som bl.a. skal øke mor-foster toleransen ved å påvirke tryptofanmetabolismen og hindre proliferasjon av aktiverte T-lymfocytter. CTLA 4 er altså et kjent inhibitorisk molekyl (12,13). Tr1 cellene virker trolig ved å produsere IL-10 og TGF- $\beta$ . IL-10 virker antiinflammatorisk ved å hemme dannelsen av TNF og IL-12 i dendritiske celler og makrofager, men TGF- $\beta$  hemmer Th1 responsen ved å endre transkripsjonen av IL-12 reseptor (14)

### *Funksjon knyttet til sykdom/graviditet*

Kan en ubalanse av disse cellene være en av grunnene til et menneske blir angrepet av sitt eget immunforsvar (autoimmune sykdommer), eller at kreftceller ikke elimineres av immunforsvaret?

Tregs ble først oppdaget i 1995 da man fjernet CD4+CD25+ celler før man overførte de selekterte lymfocytene til mus uten tymus (mus uten evne til å produsere T-celler). Musene ble etter hvert rammet av mange autoimmune sykdommer. Man kunne dermed konkludere med at Tregs hindret dannelsen av autoimmunitet (11). Det er også vist at Tregs kontrollerer immunresponsen mot infeksjoner med bl.a. *Listeria Monocytogenes* og HSV, der de supprimerer CD8+ T-celler. Deres oppgave her er å balansere immunresponsen slik at man unngår vevsskade i verten, men samtidig klarer å eliminere mikroben (11). Vi har i første del diskutert Tregs i forbindelse med mor-foster immunologien.

Museforsøk viser at depleksjon av T regs (CD25+ fox P3 +) fører til aborter (10). I denne studien brukte de flow cytometri for å påvise CD4+CD25+ celler i svangerskapet, og kontrollerte resultatet mot ikke-gravide kontrollmus. Resultatet viste at det skjedde en

to/tre dobling i antall CD4+CD25+ celler i milt, inguinale lymfeknuder og blod. For å unngå feilkilder ble forsøket også gjort med syngene mus, og det ble vist signifikant økning av de regulatoriske cellene i disse musene også. Man tenkte seg at allogen stimulering i svangerskapet kunne bidra til økt Th1/Th2 respons, men denne mekanismen er eliminert i et syngent svangerskap. Den alloantigenuavhengige økningen av CD4+CD25+ celler indikerer at graviditet fører til en økning i populasjonen av regulatoriske T-celler systemisk hos mus (10). I samme artikkel ble uterine regulatoriske T-celler studert for å se på hvordan de lokale forholdene ble endret under graviditeten. Her ble FoxP3 brukt som markør på aktiverte regulatoriske T-celler. Vha. kvantitativ PCR ble det påvist en 1000 ganger høyere konsentrasjon hos gravide sammenlignet med ikke-gravide mus. Dette viste seg i både allogene og syngene svangerskap. Samlet konklusjon for denne studien er at det skjer en lokal og systemisk ekspansjon av regulatoriske T-celler i svangerskapet, og det ser ut som denne er drevet av svangerskapet i seg selv og ikke av allostimuleringen fra fosteret. Det ser ut som at dette er et obligatorisk fenomen for å få gjennomført svangerskapet da deplesjon uten unntak førte til abort (10). Hos mennesker er det også funnet et økt antall Tregs i parietal- og basallaget av decidua hos gravide. I en studie ble blod fra decidua sammenlignet med perifert blod med tanke på antallet Tregs. I tillegg til at antallet er signifikant høyere i placenta sammenlignet med perifert blod ellers, var det større fenotypiske forskjeller mellom T cellene i decidua. Dette tyder på at Tregs har svært spesifikke immunmodulerende oppgaver under svangerskapet (15). En annen studie har sett på forskjeller i andel Tregs i decidua ved spontanaborter og provosert aborter. Analysene viser at andelen Tregs er mye høyere hos gruppen med provosert abort enn i gruppen med spontanaborter. Denne gruppen beskriver at CD4+CD25+FoxP3+ Tregs med høyt CTLA4 uttrykk hemmer CD4+CD25- T-celler vha. celle-celle interaksjon (16).

### 1,3. Real time PCR, primere og prober

Real time PCR er en teknikk som kan påvise mRNA sekvenser etter at disse er revers transkribert til cDNA. I tillegg til primere som man har ved vanlig PCR, har man her også en probe. En probe er som primerne komplementære til transkriptet, men har også en fluorokrom (også kalt reporter) og et slokkemolekyl (quencher) bundet til sin 5' merkede og 3' merkede ende henholdsvis. Når både quencher og reporter er bundet til probe, vil quencher molekylet slukke det emiterte lyset fra reporteren. Når disse kommer fra hverandre vil imidlertid lys med en bestemt bølgelengde bli emitert. Dette lyset fanges opp av RT maskinen. RT-PCR reaksjonen kan man bruke enzymet Hotstar Taq, som i tillegg til den vanlige 5' - 3' polymerase aktiviteten også har 5' - endonukleaseaktivitet. I annealingsfasen der primere og prober binder DNA, vil enzymet tygge opp deler av proben slik at quencher og reporter kommer fra hverandre, noe som vil resultere i emitert lys som kvantiteres. Dette vil skje for hver syklus som blir kjørt helt til materiale i reaksjonen er brukt opp. Mengden emitert lys vil dermed være proporsjonalt med det akkumulerte og amplifiserte PCR produktet. Selve kvantiteringen skjer ved å definere en terskelverdi, der en Ct (cycle treshold) verdi vil tilsvare antall sykler før oppnådd terskelverdi. Denne Ct verdien er omvendt proporsjonal med konsentrasjonen av templat i utgangspunktet. Ved å kjenne konsentrasjonen i fem fortyninger av prøvamaterialet og deretter beregne tilhørende Ct verdi, kan man lage en lineær standardkurve. Denne kurven kan senere brukes i kvantitering i en ukjent prøve (17,18).

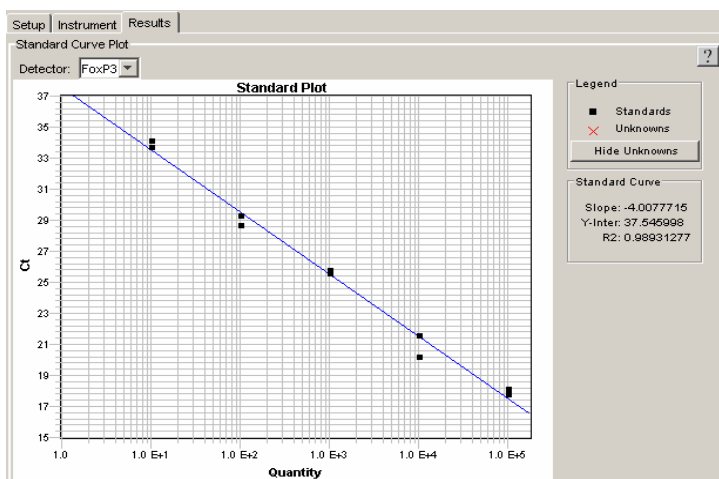


Fig 2: Figuren viser en standardkurve der Ct verdier utgjør y-aksen, mens konsentrasjonen er uttrykt logaritmisk på x-aksen. Linjen blir trukket utfra gjennomsnittet av punktene.

For å få gode resultater fra denne metoden er valg av prober og primere svært viktig. Primere og prober designer vi vha. primer express, et dataprogram som finner sekvenser passende for prober og primere. Vi la vekt på at primerne overlappet exon/intron grenser. Dette var fordi vi var ute etter uttrykket av mRNA, og ved å overlapse exon/intron unngår vi falsk positive signaler fra pseudogener i DNA (17).

#### **1.4. FoxP3 og housekeeping genene RPL 30 og HPRT**

I en kvantitativ analyse som RT-PCR er det nødvendig å korrelere mengden RNA molekyler som koder for genet av interesse (FoxP3) ved å sammenligne med mengden av RNA molekyler som uttrykkes konstant i celletypen (HPRT og RPL 30). Housekeeping gener som skal uttrykkes med konstant mengde i hver celle. Dette er ikke absolutt, så ofte brukes det to eller flere av disse for å øke validiteten i de resultatene man finner.

Housekeeping genene normaliserer dermed for variablene mellom de ulike prøvene (19). Housekeeping gener regulerer ofte basale cellulære prosesser, noe som man kan tenkes seg holdes relativt konstant. HPRT er viktig i nukleotidmetabolismen, og er et mye brukt housekeeping gen (19). RPL 30 er et annet housekeeping gen som vi valgte å benytte oss av pga. gode resultater tidligere. Genet er en ribosomal enhet og er involvert i pre-RNA prosessering der det autoregulerer spleising av transkript (20).

Vha. av disse housekeeping genene og standardkurven, beregnet vi hvor mye FoxP3 som uttrykkes. FoxP3 var lenge sett på som et gen som kun ble uttrykt av naturlige Treg, og var dermed den perfekte markøren for kvantitering av disse cellene. Man vet nå at også induserbare Tregs uttrykker denne markøren (21). FoxP3 er imidlertid fortsatt et nødvendig gen for regulatoriske T-cellers funksjon da mutasjon kan føre til IPEX syndrom som medfører fatale autoimmune sykdommer (22).

### 1,5. Tabell med nuklotidsekvenser for primere og prober brukt i RT-PCR.

Navn	Sekvens 3'-5'	Antall basepar
FoxP3 forw primer	CATTTTCATGCACCAGCTCTCAA	22
FoxP3 rev primer	GTGGGTGGTGTGAGGCTGAT	20
FoxP3 probe	CACGCCCCGGACCCCTGTGC	19
HPRT forw primer	TTATGGACAGGACTGAACGTCTTG	24
HPRT rev primer	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT	21
HPRT probe	CCATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTC	28
RPL 30 forw primer	TTAGCGGCTGCTGTTGGTT	19
RPL 30 rev primer	GCGACTTTTTTCGTCTTCTTTGC	22
RPL probe	CCGTCCCGCTCCTAAGGCAGGA	22

Tabell 1: Tabellen viser baserekkefølgen av de ulike primerene og probene brukt i prosedyre. Probene har alle FAM 5' ende og TAMRA 3' ende.

### 1,6. Formål

Mye av kunnskapen om Tregs er hentet fra museforsøk og resultatene her indikerer at regulatoriske T-celler er viktig i svangerskap så vel som nesten alle immunresponser. Det er derfor interessant å lage en metode for kvantitering av disse cellene fra fullblod hos mennesker. For å gjøre dette så korrekt som mulig skal vi bruke kvantitativ PCR med måling av mRNA for den intracellulære markøren FoxP3. Man vet ikke om denne markøren uttrykkes konstant i regulatorisk T-celler eller om den varierer med aktivitet i cellen. Ved å lage standardkurver for FoxP3 og housekeepinggenene, håper man å kunne legge grunnlag for senere kvantitering av FoxP3 uttrykk og dermed regulatorisk aktivitet i T-celler bl.a. fra gravide. Metoden vil også bli testet ved å kvantitere mengden FoxP3 hos friske blodgivere, noe som kan indikere et normalområde for FoxP3.

## **2 Materiale og Metode**

### **2,1 Blodprøvemateriale**

Blodprøver fra friske givere er brukt som grunnlag for metoden. Blodgivere ble på forhånd forespurt om å gi mindre mengder blod til forskningsformål. Fra 9 blodgiverne ble det samlet ca 10-15 ml EDTA blod som deretter ble brukt videre som beskrevet under.

### **2,2. Mononukleære celler**

#### *Mononukleære celler*

Fullblod (EDTA blod) fra normale blodgivere ble brukt til å isolere mononukleære celler. Dette utføres vha. lymfoprep (AXIS-SHIELD PoC, Norway) i henhold til medfølgende prosedyre med buffer PBS 0,3 % EDTA 0,1 % DEPC. Lymfoprep er en løsning som gjør at de ulike type celler fordeles lag på bakgrunn av tetthet i cellene etter sentrifugering 30 min ved 1100rpm. Cellelaget i midten blir pipettert ut og sentrifugert i 5 min ved 2000 rpm. Når man da fjerner supernatanten sitter man igjen med mononucleære celler. Disse kvantifiseres vha en Sysmex K-1000 celledeteller.

#### *Ekstrahering av RNA*

Fra de mononukleære cellene ekstraherer vi RNA vha isolasjonskit (Qiagen Rneasy mini kit).

Som utgangspunkt bruker man opptil  $10^7$  mononukleære celler. Cellene blir først lysert vha. RLT-buffer blandet med beta-Mercaptoethanol, for så å bli vortexet kraftig. Man tilsetter så 70% etanol for å homogenisere materialet, før man overfører 700 microliter av materiale til en RNeasy kolonne og sentrifugerer i 30 sek ved 13000rpm. Man heller så ut bunnfallet og gjentar prosedyren. Så tilsettes 700 microliter RW1-buffer og kolonnene sentrifugeres i 15 sek ved 13000 rpm. RNeasy kolonnen blir så overført til ett nytt samlerør og 500 microliter RPE buffer tilsettes før sentrifugering i 15 sek ved 13000 rpm. Dette steget blir repetert, men denne gangen med sentrifugering i 2 min. Nå skal RNA'et være festet til membranen i kolonnen og alle væsker sentrifugert bort. For å eluere RNA'et pipetteres 50 microliter RNase-fritt vann gjennom membranen og vi sentrifugerer ved 13000 rpm i et minutt. Kvantitering av RNA ved bruk av nanodrop teknologi.

### *cDNA syntese og amplifisering*

Fra 1 microgram RNA syntetiserer vi cDNA vha. Superscript II RT (Invitrogen) i henhold til prosedyre. Man tilfører 2,5 microliter av henholdsvis dNTP(løse nukleotider) og Random hexamer primers (Promega) til RNA'et og fortynner løsningen til en total på 25 ml med ddH<sub>2</sub>O. Man inkuberer så i fem minutter i 65 °C for at de sekundære strukturene skal oppløses. Løsningen blir deretter overført til våt is. Man tilsetter så 5 microliter DTT, 10 microliter 5x First Strand Buffer og 2,5 microliter Ribonuklease inhibitor (hemmer RNaser i løsningen). Løsningen inkuberes så i 2 min i 25 °C. Vi tilsetter så 2,5 microliter revers transcriptase, Dette blir kjørt gjennom PCR med 10 min 25 °C, 50 min 42 °C og 15 min 70 °C, før det blir nedkjølt til 4 °C. For å kun få cDNA'et til genene vi er ute etter lages en protokoll der vi bruker primere til de ulike genene til amplifisering vha HotStarTaq (Quiagen) protokoll.

PCR betingelser:

10x PCR buffer	5 microliter
50mM dNTPs	1 microliter
cDNA	15 microliter
forw enzym	5 microliter
rev enzym	5 microliter
hotstartaq	0,5 microliter
H <sub>2</sub> O	18,5 microliter

PCR program:

94° C - 3 min

94° C - 30 sek

58° C - 30 sek 40 sykler

72° C - 30 sek

72 °C - 10 min

4 °C - ....

Resultatet appliseres på en 2,5 % agarosegel med Ethidium bromid (80 ng/ 100 ml gel)

(120V, 30 min). Ulike DNA sekvenser med kjent størrelse brukes som størrelsesmarkør. Gelen blir en kvalitativ analyse på at vi har fått oppkopierte de genene vi ønsker.

### **2,3 Kloning av gener i e.coli bakterier vha TOPO kloningsreaksjon**

PCR produktet skulle vi så klonere ved å lime det inn i en vektor, som igjen ble satt inn i e.coli bakterier. E. coli bakteriene fikk så kolonisere slik at antallet bakterier og dermed antallet henholdsvis FoxP3, HPRT og RPL30 skulle mangedobles. Dette ble gjort ved hjelp av TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) etter TOP10-protokoll fra leverandør.

#### *Kloningsreaksjon:*

Fresh PCR produkt	4 microliter
Saltløsning	1
Vektor	1

Løsningen inkuberte på is 5-30 minutter, før vi overførte det til 42 °C. Løsningen ble raskt overført tilbake til isen. Her tilsatt vi 250 microliter av et S.O.C. medium. Etter en times horisontal sentrifugering ved 37 °C skulle genene være limt inn i vektoren, og deretter inn i e.coli bakteriene.

Vi klargjorde ampicillin plater med X-gal og formvarmet disse til 37°C. X-gal er et stoff som blir blått når det spaltes, og en vektor uten innlimt gen vil ha et inntatt enzym som spalter X-gal. Motsatt vil en vellykket innliming av gen gi hvite kolonier. Siden dyrkningsmediet inneholdt ampicillin var bakteriene nødt til å være resistente for å vokse. Vektoren som genet ble limt inn hadde gener for ampicillinresistens. Vi visste dermed at oppvekst av hvite kolonier tydet på at vektor med gen var tatt opp i bakteriene.

30 microliter av løsningen med vektorer ble så spredd utover platene, som så fikk inkubere over natten ved 37 °C.



For å forsikre oss om at vektoren var tatt opp i bakteriene og at vektorene inneholdt genene, kjørte vi realtime PCR på 3 hvite kolonier fra FoxP3, HPRT og RPL30, med negative kontroller (vann):

forward primer	5 microliter
revers primer	5
probe	2,5
mastermix (enzym og bakr.farge)	12,5

Etter å ha sjekket at alle genene nådde treshold verdi, overførte vi kolonier til en vekstbuffer og satt det i et risteskap over natta ved 37 °C

#### **2,4. Eluering av plasmid fra E.coli**

Vi sentrifugerte så ned bakteriene ved 3000 rpm i åtte minutter og helte av supernatanten. Bakteriene ble resuspendert 0,3 ml buffer (P1). Vi skulle nå eluere DNA plasmidene fra e.coli bakteriene vha. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) i henhold til prosedyre fra leverandør:

Tilsatt 0,3 ml P2 buffer og blandet ved å vende løsningen 4-6 ganger

Tilsatt 0,3 ml kald P3 løsning og blandet på samme måte. Vi overførte løsningen direkte til is og lot det inkubere i 5 minutter

Vi sentrifugerte så ved 13000 rpm i 10 minutter og fjernet supernatanten.

Vi klargjorde så QIAGEN-tip kolonner ved å tilsette 1 ml QBT buffer og lot den tømmes vha. tyngdekraften. Etter dette ble supernatanten fra sentrifugeringen tilsatt QIAGEN-tipen til tyngdekraften tømte den. DNAet skal festes til filteret i QIAGEN tipen. For å vaske bort kontaminerende materiale ble vaskebuffer QC tilsatt kolonnen som 4\*1ml. For å få eluert DNA'et fra filteret tilsatte vi 0,8 ml QF buffer og samla opp DNA'et i eppendorfrør. Vi tilsatte så 0,56 ml isopropanol og sentrifugerte i 30 minutter ved 10000 rpm. Isopropanolen hindrer saltforurensing av DNA'et. Supernatanten ble så forsiktig fjernet og 1 ml etanol ble tilsatt og ny sentrifugering utført. Etanolen fjerner også salter og er mer flyktig enn isopropanolen og dermed lettere å fjerne. Supernatanten ble pipettert opp, og DNA'et fikk lufttørke i fem minutter for å fjerne all etanolen. Vi resuspenderte så

DNA'et i TE buffer.

Resultatet av denne prosessen ble testet ved å måle mengde DNA innholdet spektrofotometrisk.

### **2,5. Sekvensering av plasmid-insert**

For nok en gang å sjekke materiale vi sto igjen med ble det utført en sekvensering av det innlimte plasmidet. Dette skjer vha. primere som er komplementær til plasmidsekvenser. Disse leser fra hver sin side av insertet og man får dermed sekvensert opp basene insertet består av. Baserekkefølgen sjekkes opp mot henholdsvis FoxP3, HPRT og RPL 30.

### **2,6. Kutting og rensing av plasmid**

Ved hjelp av den spektrofotometriske målingen regnet vi oss fram til hvor mye løsning som tilsvarte 2 microgram cDNA.

Dette cDNA'et skulle nå kuttes til lineært DNA vha Hind3, da dette er enklere å jobbe med.

Reaksjon for kutting:

Reaktant 2 buffer	5 microliter
Hind 3	2,5 microliter
dsDNA	2 microgram (må regnes om til ml)
H2O	slik at samlet volum blir 50 microliter

En time inkubering i 37 °C vannbad.

### **2,7. Produktene ble raskt rensset vha etanolfelling.**

50 microliter kuttet plasmid ble tilsatt 5 microliter 3M NaAc og 150 microliter 96 ETOH. Dette inkuberte ved -70 °C i 30 minutter. Deretter ble løsningen sentrifugert ved 4 °C med 13000rpm. Supernatanten ble fjernet før 500 microliter 70% ETOH ble tilsatt og vortexet. Vi sentrifugerte på ny i 5 min ved 13000 rpm. Supernatanten ble fjernet og pelleten lufttørket i 30 min. Materialet ble så resuspendert i 30 microliter TE-buffer. Materialet oppbevares i -20 °C.

Materialet ble så kvantitert vha nanodrop teknologi. Nanodrop gir konsentrasjoner i ng/ul, og vha avogadros konstant og kjent antall basepar kan man dermed beregne antall

kopier:

$$\text{Antall kopier} = (X \text{ ng/}\mu\text{l} * 6,023 * 10^{14}) / (\text{ant. Bp} * 658)$$

## 2,8. RT-PCRstandardkurve

Fra det kuttete DNA'et skulle vi lage løsninger med ulike konsentrasjoner. For hver av fortyningene skulle vi finne en Ct verdi. Ct verdien skulle så plottes mot den kjente konsentrasjonen slik at en graf kunne bli laget. Grafene kan vha. RT-PCR senere brukes til å måle konsentrasjonen av henholdsvis FoxP3, HPRT og RPL30 fra cDNA fra mononukleære celler.

Vi lagde først løsninger med  $10^8$  kopier/microliter i TE buffer og brukte tifold fortyning for å lage standardkurven.

*RT-PCR betingelser:*

Taqman mix	12,5 microliter
Probe	2,5 microliter
forw prim	4 microliter
rev prim	4 microliter
DNA (ulike fortyninger)	2 microliter

Hver fortyning ble kjørt som to paralleller i RT-PCR på ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems), i tillegg til negative vannkontroller.

PCR program:

95 °C      20 sek

60 °C      20 sek

Det ble kjørt 40 sykler

Ut fra når hver fortyning nådde terskelverdi ble standardkurven plottet.

## 2,9. Kvantitering av FoxP3 fra fullblod hos friske blodgivere

Fra dette blodet isolerte vi MNC og laget cDNA slik som beskrevet over. cDNA'et ble så kjørt direkte i RT-PCR for kvantitering av FoxP3 vha. PCR programmet som er beskrevet over. Vha av standardkurven ble Ct verdien omregnet til antall kopier i prøven.

## 3. Resultater

### 3,1 cDNA syntese.

Agarosegelen under gir oss et kvalitativt bilde av cDNA syntesen.

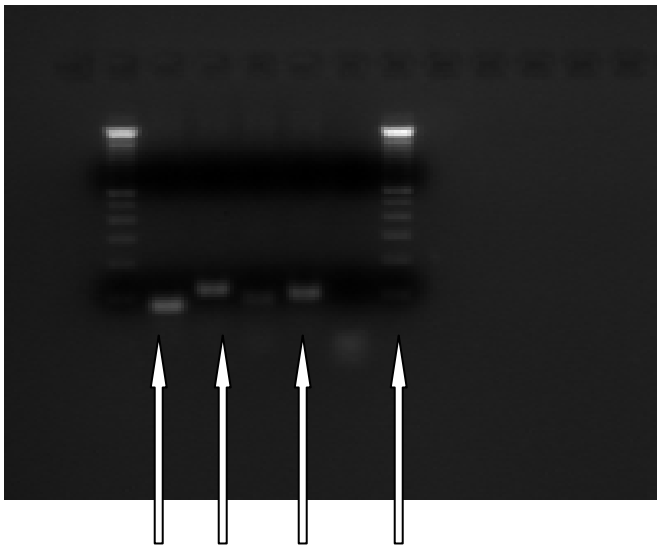


Fig 3: Fra venstre til høyre ser vi at RPL 30 kommer opp ved 78bp (basepar), HPRT ved 114 bp og FoxP3 ved 104 som forventet. Pilen til høyre angir kjente konsentrasjoner som er grunnlaget for bestemmelsen av antall basepar. Båndene er sterke, noe som tyder på god metode og resultat.

### 3.2. Screening av transformanter etter dyrkning av e.coli.

*FoxP3*:

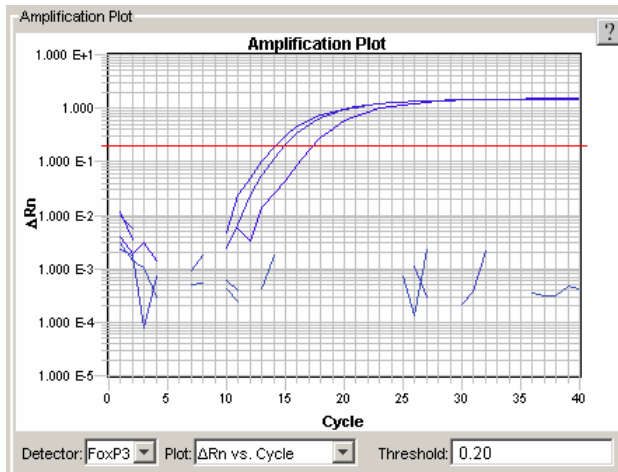


Fig 4: Vi ser at alle tre transformantene nådde terskelverdi, og kan dermed konkludere med at de inneholdt *FoxP3* genet. Begge vannkontroller var negative.

*HPRT*:

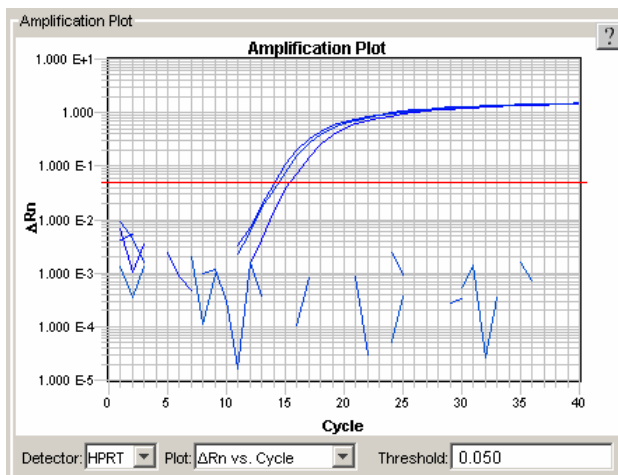


Fig 5: Vi ser at alle tre transformantene nådde terskelverdi. Vi kan dermed konkludere med at de inneholdt *HPRT* genet. Vannkontroller var negative.

RPL30:

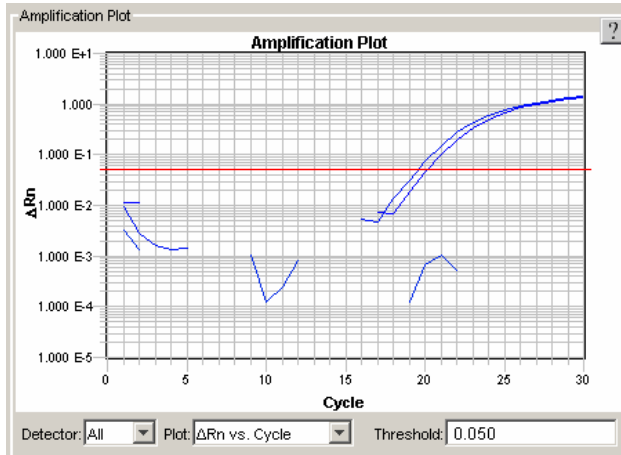


Fig 6: Begge transformantene nådde terskelverdi. Vi kan dermed konkludere med at de inneholdt RPL 30 genen.

Vi ser at alle transformanter kommer opp, mens alle vannkontrollene (NTC) er negative. Den vannrette linjen som ligger midt i grafene er den definerte terskelverdien, der utslag over denne regnes som positivt resultat. Hver prøve får også en Ct verdi, men denne er ikke viktig i denne fasen, da ukjent mengde av transformantene ble analysert. Alle transformanter inneholdt dermed amplifisert gen, som for forventet og ønsket.

### 3,3) Agarosegel med kuttet og ukuttet plasmid.

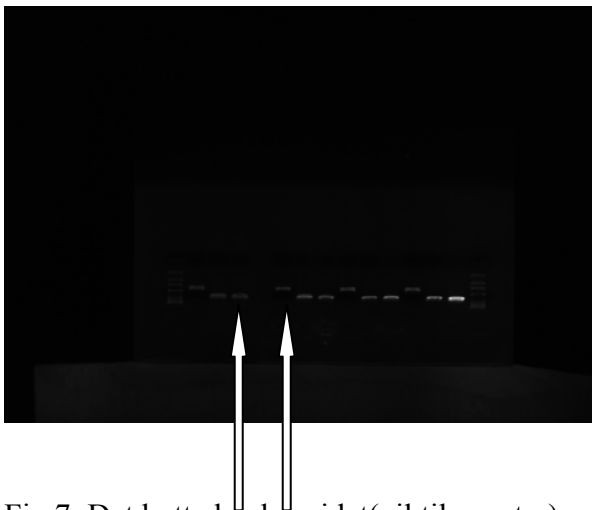


Fig 7: Det kuttete plasmidet (pil til venstre) migrerer i gelen i henhold til sin størrelse (4431bp). Ukuttet plasmid (pil til høyre) migrerer raskere på grunn av supercoiling.

### 3.4. Standardkurver.

*FoxP3:*

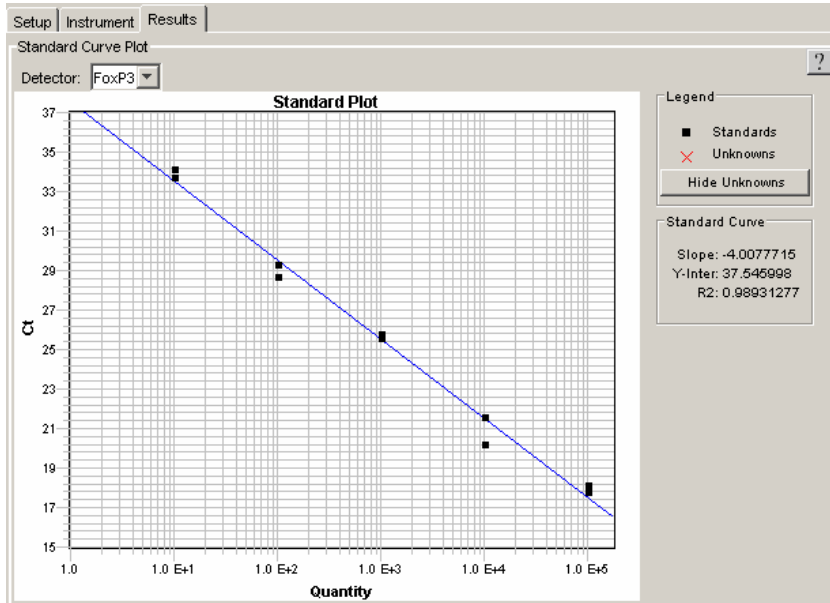


Fig 8: Figuren viser standardkurve for Fox P3. Stigningstallet på grafen er -4,0 med y-intersept på 37,5.

*HPRT:*

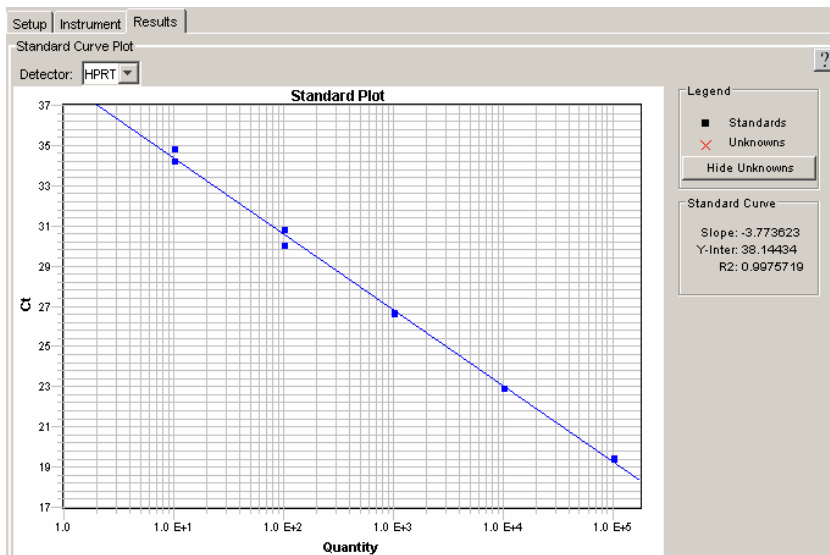


Fig 9: Figuren viser standardkurve for HPRT. Stigningstallet til grafen er -3,7 og y-interseptet er 38,1.

## RPL30:

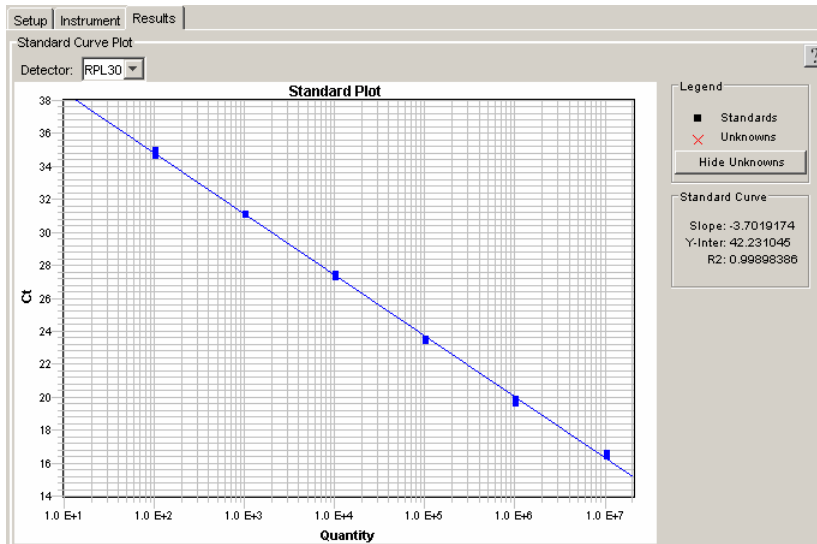


Fig 10: Figuren viser standardkurve for RPL 30. Stigningstallet til grafen er -3,7 og y-interseptet 42,2.

Grafene viser Ct verdier som er plottet opp mot antall kopier for henholdsvis FoxP3, HPRT og RPL 30. To parallelle prøver ble analysert for hver konsentrasjon og standardkurven plottes som ett gjennomsnitt mellom analysene. En godkjent standardkurve har stigningstall 3,3-3,9, men det ideelle stigningstallet er 3,3.

Stigningstall:

FoxP3: 4,0

HPRT: 3,8

RPL 30: 3,7

Ut fra standardkurvene kan man brukeformelen for rette linjer;  $y=ax+b$ .

Y: Ct verdien

A: stigningstall (slope)

B: y-interseptet

X: antall kopier.

Ved å vite Ct verdien kan man enkelt regne ut antall kopier fra en ukjent prøve.



### 3.5. Eksempel på bruk av standardkurve.

Beregning av antall kopier FoxP3 pr 100 kopier HPRT hos friske blodgivere.

RÅMATERIALE FRA RT-PCR AV cDNA FRA FRISKE GIVERE(Ct verdier)						
cDNA giver nr	FOXP3		HPRT		RPL30	
1	27,967655	27,931776	25,110012	25,085804	18.30011	Undet.
2	30,526417	30,427488	25,892006	26,121803	19.217705	19.188324
3	29,483253	29,393984	24,954674	24,929026	18.600208	18.492075
4	30,69839	30,992992	26,110533	Undet.	19.643599	Undet.
5	28,217966	28,420162	24,229984	24,574953	17.768303	17.80011
6	27,652374	27,929457	24,229555	24,48157	17.390936	17.565844
7	26,917782	26,988276	23,927406	24,013897	16.414206	15.808084
8	28,912594	28,776312	24,15806	23,906225	17.500992	17.842407
9	27,979294	28,056545	23,781681	23,666685	17.78859	Undet.

Tabell 2: I tabellen over er cDNA fra ni givere analysert med RT-PC i to parallelle analyser. Hver prøve har fått en Ct verdi for innholdet av henholdsvis FoxP3, HPRT og RPL 30. Noen prøver er merket ”undet” som betyr at prøven ikke nådde terskelverdi (ikke ga noe utslag). Disse prøvene ble sett bort fra da årsaken var feil utført prosedyre.

Bruk av råmateriale til beregning:

cDNA giver nr.	$\Delta$ FOXP3	Kopier foxp3	$\Delta$ HPRT	kopier HPRT	<b>Kopier FOXP3/100 kopier HPRT</b>
1	27,9497155	249,8	25,097908	2865,5	8,71750131
2	30,4769525	58,3	26,0069045	1645,6	3,54278075
3	29,4386185	106	24,94185	3151,8	3,36315756
4	30,845691	47,2	26,110533	1544,7	3,0556095
5	28,319064	201,9	24,4024685	4380,2	4,60937857
6	27,7909155	273,7	24,3555625	4507,4	6,07223677
7	26,953029	443,3	23,9706515	5700,6	7,77637442
8	28,844453	149,2	24,0321425	5490,7	2,71732202
9	28,0179195	240,2	23,724183	6625,8	3,62522261

Tabell 3: I tabellen over er det beregnet et gjennomsnitt mellom de parallelle analysene for FoxP3 og HPRT, og disse Ct verdiene er omregnet til antall kopier av henholdsvis FoxP3 og HPRT vha. formelen beskrevet tidligere.

Fra utregningene i tabellene over ser vi at uttrykket FoxP3 pr. 100 kopier HPRT varierer fra 2,7 til 8,7. HPRT skal i utgangspunktet uttrykkes relativt konstant, så dette vil si at FoxP3 uttrykket varierer selv hos friske blodgivere.

## **4. Diskusjon/Konklusjon**

### **4,1 Metodeoptimalisering.**

Metoder som innebærer bruk av PCR vil det alltid være variabler i reaksjonen som kan forandres for å bedre produktet. Man jobber hele tiden med en mengde RNA/DNA, primere og prober. Selv om dette er mye brukte metoder vil alltid små justeringer i konsentrasjon av disse ulike variablene føre til endringer i resultat. Resultatet vil under hele prosessen kunne testes kvalitativt/kvantitativt vha. ulike metoder.

Ved RNA isolering er det viktig at man kan utelukke kontaminerende stoffer. Dette gjøres vha nanodrop der absorbans blir målt. Rent RNA vil ha ratioen A260/A280 mellom 1,9 og 2,1. A260 og A280 er absorbans målt ved henholdsvis 260 nm og 280 nm. Prøver der dette ikke var tilfellet ble forkastet.

I dannelsen av cDNA ble prosessen vurdert vha. gelektroforese, der ulike temperaturer i PCR reaksjon ble prøvd for å få best mulig gelresultat. Under dannelsen av cDNA ble det også forsøkt med Q løsning i PCR reaksjonen. Q er en PCR hemmer som skal hindre reaksjonen i å starte for tidlig. Dette ga ingen bedring av resultat.

Optimalisering av annealingstemperatur er også nødvendig. Under annealing vil primer og probe binde til DNA, så annealingstemperaturen er viktig for å få god binding. Antall sykluser man kjører vil også spille inn. Det er viktig at man kjører nok sykler til at det all probe for anledning til å binde til DNA'et, for jo mer probe bundet desto mer emitert lys kan bli oppfattet.

Det ble også forsøkt ulike rensemetoder for plasmidet i protokollen. Plasmidet ble rensed vha. agarosegel og vha. etanolfelling. Etanolfelling ga bedre utbytte og ble derfor benyttet. Metoden over er optimalisert med tanke på variablene beskrevet.

## 4,2 Standardkurver

Stigningstallet knyttet til standardkurvene var litt for høye, spesielt for FoxP3.

Stigningstallet forteller oss hvor mange sykler det er mellom hver log fortykning. Flere forsøk utført med samme metode gjort i senere tid viser at metoden beskrevet over gir mer ideelle stigningstall. Grunnen til høye stigningstall her kan være unøyaktighet og dermed små avvik fra prosedyren beskrevet tidligere.

## 4,3 Generell diskusjon

Selve metoden for kvantitering av FoxP3 ble laget, men kvaliteten av denne er fortsatt usikker. Usikkerhetsmomentet består i hvor selektivt uttrykket av FoxP3 i Tregs egentlig er. Den senere tiden er det kommet artikler der man ser at enkelte CD4+CD25- celler også kan uttrykke FoxP3 selv om de ikke har regulatorisk aktivitet (21). Det ser imidlertid ut til at uttrykket er forbigående i motsetning til CD4+CD25+ celler som konstant uttrykker denne markøren (21). Selv om CD4+CD25+ regulatoriske celler konstant uttrykker FoxP3, vet vi ikke om graden av uttrykk er konstant. Vil aktivisering av en celle føre til en mangedobling i uttrykk, eller er økning av FoxP3 uttrykk forårsaket av økning i antall regulatoriske celler? Selv om housekeeping gener justerer relativt godt for mengde celler analysert(19), vet man fortsatt ikke om evt. ulik fordeling av uttrykk mellom Tregs. Man vet heller ikke om FoxP3 uttrykket stammer fra CD4+CD25+ celler eller om også andre celler bidrar til å øke uttrykket. Det er derfor interessant hvis man kunne kjøre parallelle prøver med flowcytometri der man kan vurdere uttrykket av FoxP3 i CD4+CD25+ sorterte celler. Anriking vha. en cell-sorter og RT-PCR vil også kunne ta høyde for en del av usikkerhetsmomentene ved at man i større grad vet hvilke celler man analyserer. Hvis man f.eks. kunne sortert ut CD4+CD25+ celler vha en cell-sorter og deretter kjørt RT-PCR på dette materialet, vil man kunne sammenligne FoxP3 uttrykket i celler som i stor del består av regulatoriske T-celler og dermed få svar på om uttrykket FoxP3 er konstant i en kjent mengde regulatoriske celler. Det er mulig at løsningen er å bruke de ulike metodene parallelt på så mange prøver at man lage et normalområde for uttrykket FoxP3 og dermed forhåpentligvis regulatorisk aktivitet. Resultater fra analyser på ni friske blodgivere tilsier at FoxP3 uttrykket varierer fra person til person hos friske. Det er ingen tvil om at regulatoriske T-celler er svært viktig i flere og flere sykdommer,

og en metode for kvantitering vil være en nyttig indikator hvis man klare å definere normale verdier. Med tanke på graviditet trengs det prøver av fullblod fra gravide for å se om det generelle uttrykket er av FoxP3 er økt her. Helst burde disse prøvene anrikes vha en cell-sorter for å vite hvor det eventuelle økningen av uttrykket stammer fra. Vel så nyttig vil det også være å se på prøver fra placenta. Muligens vil det kun være her man finner signifikant økning av FoxP3. Mye gjenstår for å konkludere med tanke på regulatoriske T-celler. Metoden må forsøkes i forbindelse med anrikning og evt. i parallelle kjøring med flowcytometri før den kan vurderes. Vi håper imidlertid at den vil kunne bli nyttig i videre forsøk på området, og da spesielt med tanke på vurdering av gravide kvinners risikoprofil.

## 5. Referanser.

- 1: Zhou Y, Fischer SJ, Janatpour M et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? - J Clin Invest 1997; 99: 2139-2131 – Ashley Moffet King, Nature Reviews Immunology 2002; 2:656-662.
- 2: Bergsjø, Maltau, Molne, Nesheim. Obstetrikk og Gynekologi. Gyldendal Norsk Forlag 2004: kap 5: 74-80.
- 3: Moffet, Loke. The Immunological Paradox of Pregnancy: A Reappraisal. Placenta 2004; 25: 1-8.
- 4: Kliman. Uteroplacental Blood Flow, The story of decidualization, Menstruation, and Trophoblast Invasion. American Journal of Pathology dec 2000; 157(6): 1759-1768.
- 5: Kjeldsen-Kragh, Skogen, Husebekk et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. Blood, 1 August 2007; 110(3): 833-839.
- 6: Kasahara, Suzuki, Du Pasquier. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. Trends Immunol. 2004; 25: 105-111.
- 7: Ji, Yuan, Zhang. The earliest known eutherian mammal. Nature 2002; 416: 816-822.
- 8: Weil. Mammalian evolution: onwards and upwards. Nature 2002; 416: 798-799.
- 9: Mestas, Hughes. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J. Immunol. 2004; 172: 2731-2738.
- 10: Aluvihare, Kallikourdis, Betz. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nature of Immunol. March 2004; 5(3): 266-271..
- 11: Kingston, Mills. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nature Immunol, nov 2004; 4(11): 841-855.
- 12: Parham. The immune system. Garland Publishing/Elsevier Science Ltd. 2000; kap 6: 134-135.

13: Munn, D.H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191-1193.

14: Kitana, Chua, Nakamura, Strober. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T-regulatory cells 1 T cells. *J.Immunol.* 2000; 165: 1499-1505.

15: Tilburgs et al. Differential distribution of CD4+CD25 (bright) and Cd8+CD28- T-cells in decidua and maternal blood during pregnancy. *Placenta* apr 2006; suppl A: 47-53.

16: Sasaki. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T-cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10(5): 347-353.

17: Department of Biology, Davidson College, Davidson, NC 28035: Real time PCR: The TaqManMethod.

[www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003/Pierce/realtime](http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003/Pierce/realtime)

(10.09.07)

18: Lynghaug GM, Husebekk A. Utvikling av metode for påvisning av sirkulerende brystkreftceller i perifert blod. 5. års oppgave - medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø.

19: de Kok, Roelofs, Span et al. Normalisation of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory investigation* 2005; 85: 154-159.

20: NCBI Entrez Gene. RPL30 protein component of the large (60S) ribosomal subunit, has similarity to rat L30 ribosomal protein; involved in pre-rRNA processing in the nucleolus; autoregulates splicing of its transcript. [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov) (10.09.07).

21: Wang, Huizinga, Toes et al. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD+ T cells. *Eur J Immunol*, jan 2007; 37(1): 21-3.

22: Marinic, Gagro, Rabatic. Regulatory T cells. *Acta Med Croatica* dec 2006; 60(5): 447-56.

