

## **Isolering av villøse cytotrofoblaster fra humane, friske og fullgatte placenta**

5. årsoppgave i Stadium IV,  
Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø.  
Bodø 15.09.11

Student:  
Gøril Heide, MK-06.  
Immunologisk forskningsgruppe, IMB, Det Helsevitenskapelige fakultet.  
Goril.heide@uit.no.

Veileder:  
Tor Stuge. Førsteamanuensis.  
Immunologisk forskningsgruppe, IMB, Det Helsevitenskapelige fakultet,  
UiT.  
Kontoradresse: UNN A1.802B.  
Tlf 77626308/ 97713935  
Mail: tor.stuge@uit.no

## Sammendrag

Det er et paradoks at fosteret, som representerer fremmed vev, ikke avstøtes av morens immunsystem ved implantasjon. Stedsspesifikk suppressjon av den maternelle immunresponsen er foreslått som forklaring, og flere mekanismer for dette er kjent. Føtal og neonatal trombocytopeni (NAIT) er et av tilfellene hvor maternell immunisering kan føre til ødeleggelse av fosterets celler, i dette tilfellet ødeleggelse av fosterets blodplater. Den vanligste årsaken til NAIT er føtomaternell inkompatibilitet i human platelet antigen (HPA) 1 systemet, hvor antigenet er lokalisert på beta 3 integerinet, som finnes på plater, men også på trofoblaster som del av vitronektinreseptor. Det føtale antigenet kan derfor være synlig for maternelt immunsystem gjennom hele graviditeten. Lite er gjort når det kommer til HPA-1a immunisering og placenta, selv om det vil være naturlig at noe av forklaringen på immuniseringen ligger nettopp i dette organet. Mye viten om placenta er utilnærmelig in utero in vivo, og en av tilnæringsmåtene til placenta som organ er å starte med enkeltcellenes funksjon. Målet med denne oppgaven er å prøve ut 5 ulike protokoller for isolering av villøse cytotrofoblastceller fra normale, fullgåte placenta, og komme fram til en metode for isolering av trofoblaster som gir optimal yield og renhet, for bruk i senere prosjekter. I dette arbeidet lykkes det å isolere villøse cytotrofoblaster ved hjelp av en protokoll som består av deler fra alle de 5 utprøvde protokollene, med yield omtrent like god som i andre publiserte protokoller, men med færre viable celler. De isolerte cellene var cytokeratin 7 positive, HLA-G negative/positive, HLA klasse I negative og HLA klasse II negative. Tatt i betraktning det store antallet villøse cytotrofoblaster som finnes i det intervilløse rommet er det imidlertid underlig at isoleringen ikke gir større utbytte. Det vil kreve ytterligere optimalisering av protokollen for å utnytte det tilgjengelige vevet fullt ut.

# Innholdsfortegnelse

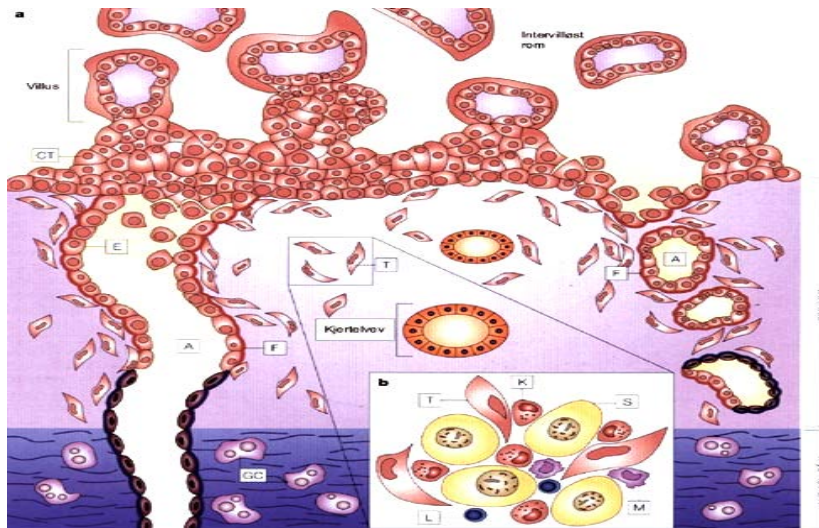
<b>SAMMENDRAG</b>	<b>2</b>
<b>INNHOLDSFORTEGNELSE</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUKSJON</b>	<b>4</b>
PLACENTA	4
FØTOMATERNELL TOLERANSE	6
FØTAL OG NEONATAL ALLOIMMUN TROMBOCYTOPENI (NAIT)	9
SHEDDING	10
DETTE ARBEIDET	11
<b>MATERIALE OG METODE</b>	<b>12</b>
VEV	12
UTPRØVING AV PROTOKOLLER	13
NEGATIV IMMUNOMAGNETISK SELEKSJON PÅ MACS KOLONNE	14
KARAKTERISERING AV TROFOBLASTER I FLOW CYTOMETRI	15
MIN PROTOKOLL	15
<b>RESULTATER</b>	<b>16</b>
ETABLERING AV PROTOKOLL FOR ANRIKING AV VILLØSE CYTOTROFOBLASTER FRA PLACENTAVEV.	16
MIN PROTOKOLL	16
YIELD	17
FENOTYPISK KARAKTERISERING AV ISOLERTE CELLER	17
<i>Omtrent halvparten av de isolerte cellene er døde</i>	17
<i>Omtrent halvparten av isolerte celler etter behandling med percoll/lymfoprep er cytokeratin 7 positive</i>	18
<i>Cytokeratin 7 positive celler er HLA-klasse II- og HLA-klasse I negative, og HLA-G negative/positive</i>	19
<i>85-90 % av alle isolerte celler etter negativ seleksjon på MACS kolonne er cytokeratin 7 positive</i>	22
<b>DISKUSJON</b>	<b>23</b>
<b>REFERANSER</b>	<b>27</b>
<b>TABELLER</b>	<b>29</b>

# Introduksjon

## Placenta

Dannelsen av placenta, også kalt implantasjonen, er en essensiell del av graviditeten hos mennesket. Placenta, et midlertidig og høyt spesialisert organ, dannes når føtalt deriverte placentaceller (trofoblast) invaderer et modifisert lag av maternell uterus (decidua) (figur 1)[1]. Det spesialiserte organet er ansvarlig for fysiologisk nærings- og gassutveksling mellom det utviklende fosteret og mor, men virker samtidig som en barriere mellom de to individene [2].

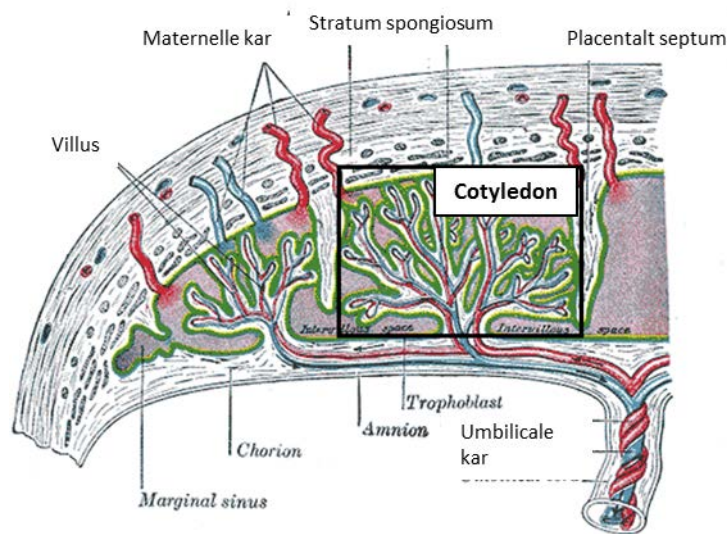
Fostercellene, i form av cytotrofoblaster, graver seg ikke bare inn i endometriet, men også videre inn i myometriet (ekstravilløse trofoblaster = EVT), og til spiralarteriene (endovaskulære trofoblaster) hvor de erstatter endotelceller og glatte muskelceller (figur 1). Trofoblastcellene består derfor av to ulike populasjoner; villøs trofoblast og ekstravilløs trofoblast. Villøs trofoblast dekker villi og består av et indre lag av cytotrofoblast og et ytre lag av syncytiotrofoblast (ST). Dette ytre laget av syncytiotrofoblast dannes ved at cytotrofoblastene proliferer, differensierer og til slutt mister sine cellegrenser; danner et syncytium [3].



**Figur 1. Trofoblastinvasjon i overgangssonen mellom føtalt og maternelt vev. a) Villøse cytotrofoblaster (CT) danner forankringssøyler til maternelt vev. Ekstravilløse trofoblaster (T) invaderer decidua og bryter ned muskellaget i spiralarteriene, som erstattes av fibrinoid materiale (F). Endovaskulære trofoblaster (E) på innsiden av kar erstatter endotelcellene. Trofoblastene vandrer dypt inn i myometriet, der de smelter sammen til kjempeceller (GC). b) Skjematisk fremstilling av deciduallt stroma i forbindelse med implantasjon. Interstitielle trofoblaster (T) ses mellom stromaceller (S), maternelle drepeceller (K), makrofager (M) og spredte T-celler (L). (Figuren er hentet fra Austgulen et al [1]).**

Gass- og næringsutvekslingen mellom mor og foster skjer i det intervilløse rommet hvor de terminale villi kun består av en indre kjerne føtalt mesoderm og kar, et enkelt lag av cytotrofoblast og et lag av syncytiotrofoblast. Det er altså syncytiotrofoblastlaget i de terminale villi som er i kontakt med det maternelle blodet fra spiralarteriene i det intervilløse rommet [2], og den korteste avstanden mellom maternelt og føtalt blod er et endotellag og et lag av syncytiotrofoblast.

Makroskopisk er den modne placenta ved termin omtrent 20 cm i diameter og 5-600 gram. På maternell side ses 15-20 cotyledoner begrenset av septa fra maternelt vev. Hver cotyledon er en samling av 3-4 stavvilli med deres grener, og er forsynt av hver sin spiralarterie (figur 2). Den maternelle overflaten kan også ha rester av decidua basalis som ser mer grålig ut enn vevet i cotyledonene. På føtal side er overflaten dekket av en glatt og glinsende amnion med navlesnoren festet nært midten. Grener fra navlesnoren radierer fra festet og kan følges under amnion [2] (figur 2).



**Figur 2:** Forenklet oversikt over placentas struktur, med en cotyledon markert i rektangel

([http://en.wikipedia.org/wiki/File:Placental\\_cotyledon.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Placental_cotyledon.png)).

### **Føtomaternelle toleranse**

Spørsmålet om allogenitet, ulikheter mellom individer av samme art, i menneskets reproduksjon har forundret forskere i lang tid. Fosteret arver halvparten av sitt genomiske materiale fra sin far, og fosterets celler, i form av syncytiotrofoblast, er i kontakt med maternelt blod i det intervilløse rom under hele graviditeten. Transplantert allogenetisk vev avstøtes av mottakerens immunsystem uten immunosupprimerende behandling. Det er derfor et paradoks at fosteret, som representerer fremmed vev, ikke avstøtes av morens immunsystem. Et vellykket svangerskap er nødt til å være et resultat av maternell toleranse for det allogene fosteret.

Allerede i 1953 postulerte Peter Medawar tre generelle mekanismer som gjør uterus til et immunpriviligert sted under graviditet; induksjon av toleranse hos mor for føtale antigener, dannelsen av en anatomisk og fysiologisk barriere mellom mor og foster, og redusert uttrykk av alloantigener hos fostercellene [4]. Dette forklarer imidlertid ikke hvordan mors immunsystem ikke reagerer på fosterceller, men fortsatt gir en adekvat reaksjon på patogener. Det er derfor foreslått at dette er en stedsspesifikk

suppresjon av den maternelle immunresponsen [4]. Flere mekanismer for denne suppresjonen er nå kjent både i decidua og hos trofoblastcellene:

Villøse cyto- og syncytiotrofoblaster, og ekstravilløse trofoblaster uttrykker Fas ligand (Fas-L). Dette induserer Fas-mediert apoptose av maternelle T celler som potensielt kan være reaktive mot føtale celler [5].

Alle humane trofoblastceller mangler HLA klasse II antigener, som gir redusert risiko for dannelse av anti-HLA klasse II- antistoffer mot fosterets HLA-antigener. De fleste trofoblastceller mangler også HLA klasse I antigener, bortsett fra de ekstravilløse trofoblastene [6]. Et av HLA klasse I antigenene som finnes på ekstravilløse trofoblaster er det ikke-klassiske klasse I HLA-G. Det lave antallet HLA-G alleler gjør muligheten for en allogen reaksjon fra maternelle cytotoksiske T-celler mot trofoblastene liten. Det er også foreslått at inhibitoriske reseptorer på NK- og T-celler binder HLA-G og dermed hindrer den cytotoksiske effekten NK-celler i decidua kan ha på trofoblaster[7]. HLA-G er også funnet uttrykt på stromale celler i decidua[7]. Et annet HLA klasse I antigen vi finner hos trofoblaster er HLA C [8]. HLA C er en viktig ligand for KIR familien av NK celle reseptorer, og tilstedeværelsen av dette antigenet er derfor foreslått å kunne påvirke implantasjonen. Direkte bevis på at maternelle NK celler kan gjenkjenne HLA C mangler imidlertid [8].

Uttrykk av immunosuppressive molekyler, som IL-10, TGF-beta, PGE2 ogIDO kan også være en del av forklaringen. Enzymet IDO uttrykkes for eksempel av syncytiotrofoblaster og makrofager, og hemmer T celleaktiviteten gjennom å bryte ned tryptofan[5].

Ut fra dendrittiske cellers rolle i immunsystemet, vil det være naturlig at disse cellene også i decidua vil ha en avgjørende rolle når det kommer til opptak, prosessering og presentasjon av føtalt deriverte trofoblastantigener for det maternelle immunsystemet[9]. De dendrittiske cellenes fenotype, morfologi, og funksjon varierer avhengig av vevskolalisasjon, modningsgrad og ontogenisitet. Dendrittiske celler i vev skal på den ene

siden kunne oppdage patogener for videre å kunne prime T celler, og på den andre siden skal de unngå å aktivere celler som er spesifikke for “uskyldige” antigener. Dette blir spesielt tydelig under graviditet. Collins et al (2009) viser at decidua på en eller annen måte danner et miljø som hindrer migrasjon av dendritiske celler fra vev til lymfeknute, og dermed fremmer immunologisk toleranse [10]. Det virker også som om antigen kan flytte seg på en ikke-celle-assosiert måte via regionalt lymfesystem [10].

Dendritiske celler finnes i første trimester decidua i like store mengder som beskrevet i andre mukosale vev, men dendritiske cellers funksjon i decidua er altså ukjent. På andre epiteliale overflater, for eksempel i tarm, kan disse cellene være avgjørende i form av at de enten induserer toleranse til matantigener eller initierer immunrespons mot patogene bakterier. Den kontinuerlige migrasjonen fra tarm, lunger, og hud resulterer i bare en delvis modning av DCs med oppregulering av MHC, men ingen induksjon av høye nivåer av kostimulatoriske molekyler. I disse tilfellene skiller de dendritiske cellene ut IL-10 eller TGF beta, noe som resulterer i induksjon av regulatoriske T-celler. Mange av de faktorene som er beskrevet å indusere tolerogene dendritiske celler finnes i store mengder i decidua; prostaglandin E2, vitamin D, TGF beta og IL-10 [9].

Relativt lite er også kjent når det gjelder uterint lymfesystem [11], og dette er omdiskutert. Red-Horse et al viser for eksempel at humant ikke-gravid endometrium mangler lymfekar, men at graviditet induserer lymfangiogenese i deciduale deler av uterus [12]. Dette konfronteres imidlertid av Volchek et al [6] som finner at lymfekar nesten forsvinner helt fra områder i endometriet hvor decidualisering har skjedd. Volchek et al forsøker å forklare disse motstridende funnene med at Red-Horse bruker en bredere definisjon av decidua, og at lymfangiogenesen de ser i sitt arbeid finner sted i ikke-decidualisert hypersekretorisk sone, men at selve deciduavevet mangler lymfesystem. De finner også at lymfekar mangler rundt spiralarteriene dersom stromacellene er decidualisert uavhengig av om spiralarteriene gjennomgår remodellering eller om EVT-celler er til stede eller ikke. Celler som introduseres til myometriet transporteres til lokal



lymfeknute, mens introduksjon av de samme cellene til endometrielumen forblir i uterus.

Gjennom graviditeten, først og fremst i 3. trimester, skjer det en passiv immunisering av foster ved at maternelle antistoffer av IgG-type kan krysse placenta [13]. Dette skjer via hFcRn (human neonatal Fcγ-reseptor) som finnes på syncytiotrofoblastene. IgG, som finnes i høye konsentrasjoner i maternell sirkulasjon, tas opp ved endocytose, og binder hFcRn i det sure miljøet i endosomet, hvor det videre kan transporteres til basal (føtal) side og frigjøres i det basiske miljøet der. Denne passive transporten av IgG antistoffer gir en nyttig beskyttelse for det nyfødte barnet inntil det selv danner stor nok mengde egne antistoffer[13]. Det er også en slags beskyttelse i at det kun er antistoffer av en viss type som transporteres over. Dersom mor danner en immunreaksjon som potensielt er skadelig for fosteret, og disse antistoffene enten var av IgM type eller av en IgG subtype som ikke binder hFcRn vil ikke disse antistoffene kunne krysse placenta og skade fosterets celler.

På tross av disse ulike mekanismene som forhindrer immunisering i svangerskapet, finnes det tilfeller hvor maternell immunisering kan føre til ødeleggelse av fosterets celler og dermed gi komplikasjoner i svangerskapet eller etter fødsel for barnet. En av tilstandene som kan oppstå er neonatal alloimmun trombocytopeni.

### **Føtal og neonatal alloimmun trombocytopeni (NAIT)**

Føtal og neonatal trombocytopeni (NAIT) kan forårsake alvorlige komplikasjoner som intrakraniell blødning hos foster eller nyfødte barn, som følge av maternelle antistoffer mot føtale plater under graviditet. Den vanligste årsaken til NAIT er en føto-maternell inkompatibilitet i human platelet antigen (HPA) 1 systemet, hvor mor er HPA-1a negativ og bærer et HPA-1a positivt barn. Mor immuniseres og danner HPA-1a – spesifikke antistoffer av IgG type som går over placenta, binder føtale plater, og fører

til reduksjon i fosterets plattetall, og dermed risiko for blødning. Den alvorligste følgen av NAIT er intrakraniell blødning som blant annet kan gi store nevrologiske sekveler og, i verste fall, død[14, 15].

2,1 % (1 av 50) av gravide norske kvinner er funnet å være homozygote for HPA-1bb – og dermed under risiko for immunisering under graviditet med et HPA-1ab barn. Kun 10,6 % av disse kvinnene (1 av 450 gravide kvinner) danner imidlertid anti-HPA-1a antistoffer, og omtrent 30 % av kvinnene (1 av 1500 gravide kvinner) som produserer antistoffer får barn med NAIT [16]. HPA-1a-immunisering er assosiert med HLA klasse II molekylet HLA-DRB3\*0101, hvor 94 % av immuniserte kvinner bærer dette allelet (egne tall). Den sterke assosiasjonen med et HLA klasse II molekyl indikerer at en T cellerespons er involvert, og T celler isolert fra en HPA 1a-immunisert kvinne som har født barn med NAIT, er vist å være CD4+, HPA 1a spesifikke og restriktert av HLA-DRB3\*0101 [17].

NAIT sammenlignes ofte med HDN (= hemolytisc disease of the newborn). I motsetning til HDN oppstår imidlertid NAIT i noen tilfeller allerede i løpet av første svangerskap. Prospektive studier har funnet ulik insidens av immunisering hos førstegangs gravide[14, 16, 18-20] . Plater er sannsynligvis ikke antigenkilden i dette tilfellet. HPA-1 antigenet er lokalisert på  $\alpha 3$  integrinet, og i tillegg til å finne det på trombocytter – finner man også  $\beta 3$  integrinet på syncytiotrofoblaster (ST) som del av vitronektinreseptor gjennom hele graviditeten [21]. Det betyr at antigenet ved en eventuell uforlikelighet i HPA-1 systemet, via ST, kan være i kontakt med maternelt blod gjennom hele graviditeten.

### **Shedding**

Apoptose har blitt beskrevet hos alle typer trofoblaster. Store deler av apoptotisk trofoblastrester deporteres kontinuerlig inn i maternell sirkulasjon ved shedding av “syncytial knots”, som er partikler av syncytium[22, 23]. Schmidt et al detekterte trofoblastpartikler i maternelt

perifert blod, og viste at graviditeter med preeklampsi som komplikasjon viste økt antall trofoblastpartikler som kunne finnes igjen i maternelt perifert blod[22]. I tillegg til subcellulære ST-partikler og DNA fra ST kjerner kan også, i noen tilfeller, føtalt blod detekteres i maternalt perifert blod. Noe av trofoblastmaterialet som deporteres inn i maternelt blod gjennom graviditeten kan sirkulere gjennom maternell milt hvor immunresponsen mot blodbårne antigener dannes. Dette kan føre til alloimmunisering [21, 24].

Vi vet en del om hva som skal til for at HPA-1a immunisering skal finne sted hos gravide HPA-1bb kvinner. Kun 1/3 av de kvinnene som er disponert for HPA-1a immunisering, det vil si kvinner som er HPA-1bb, bærer et HPA-1a barn og er HLA-DRB3\*0101 positive, immuniseres i forbindelse med svangerskapet. Puslespillet er med andre ord langt fra ferdiglagt enda. Når det gjelder HPA-1a immunisering er det lite som er gjort når det kommer til placenta, og det vil være nærliggende å tro at noe av forklaringen på hvem som immuniseres og hvem som føder barn med NAIT ligger nettopp i dette organet!

### **Dette arbeidet**

Mye viten om menneskets placenta er, naturlig nok, utilnærmelig in utero in vivo. Det er også vanskelig å direkte overføre kunnskap fra dyremodeller som følge av human placentas unike strukturelle og funksjonelle egenskaper. En av tilnæringsmåtene til placenta som organ kan være å starte med cellenes funksjon. Målet med dette arbeidet har derfor vært å prøve ut ulike protokoller for isolering av villøse cytotrofoblastceller fra normale fullgatte placenta, for å komme fram til en protokoll som kan brukes i det videre prosjektarbeidet. Cytotrofoblastcellene er karakterisert ved hjelp av flowcytometri.

Trofoblastcellene omgis av stroma med føtale blodkar, makrofager og mesenkymale celler, og villi bader i maternelt blod. Det er altså sannsynlig

at mange av disse cellene vil finnes sammen med trofoblastene etter isoleringen. Villøse trofoblastceller har blitt isolert med ulike protokoller, og det er utviklet flere ulike teknikker for å kunne fjerne stromale celler og ende opp med en så ren villøs trofoblastpopulasjon som mulig. Bruk av diskontinuerlig percollgradient for å separere celler med ulik tetthet ble introdusert av Kliman et al i 1986 [25]. Percollgradient har senere blitt brukt av flere [26]. I tillegg til dette har flere grupper tatt i bruk positiv- eller negativ immunoseleksjon for å fjerne ikke-trofoblastceller ved hjelp av blant annet magnetiske beads [27]. Dette siste trinnet anses nødvendig siden celleduspensjonen etter trypsin/percoll isolering inneholder omtrent 50 % kontaminerende ikke-trofoblaster [28]

Renheten av cellepopulasjonen etter isolering av villøse trofoblaster har tradisjonelt blitt testet ved hjelp av antistoffer mot cytokeratin eller placentalkalkalisk fosfatase (PLAP) [26], mens identifisering av ikke-trofoblastceller blant annet har bestått av binding av antistoffer mot vimentin, HLA klasse I, HLA klasse II, CD45 og CD9 [26] (for spesifisitet, se tabell 2). Maldonada-Estrada et al (2004) viser at cytokeratin 7 kan brukes som en spesifikk intracellulær markør for å bestemme renheten av isolerte villøse trofoblastceller i flow cytometri [29].

## **Materiale og metode**

### **Vev**

Placenta fra tilfeldige og friske kvinner som fødte vaginalt ble hentet på fødeavdelingen ved Universitetssykehuset i Nord Norge, Tromsø, rett etter fødsel og lagt i kald 0,9 % NaCl. Isoleringsprotokollen ble alltid startet innen 1 time etter fødsel.

## Utprøving av protokoller

5 ulike protokoller fra litteraturen for isolering av villøse trofoblaster fra placenta hos 5 tilfeldige kvinner ble prøvd (tabell 1) [9, 26, 29-31].

Protokoll 1-4 består av enzymatisk isolering med trypsin, men er ulike når det gjelder % av enzym, tillegg eller ikke tillegg av DNase, inkuberingstid og –intervaller, samt hvilken seleksjon som er brukt etter den enzymatiske isoleringen, for å sikre ren populasjon av villøse cytotrofoblaster. For alle protokoller med enzymatisk isolering gjelder at placenta bla skylt i NaCl, biter av 2-5 cm<sup>3</sup> ble klippet fra cotyledoner i flere regioner av samme organ, bitene ble skylt og hatt over i petriskåler med Hanks balanced salt solution (HBSS), hvor de ble skåret og skrapet i mindre biter (0,2-1,0 cm<sup>3</sup>) (rester av decidua og bindevev ble fjernet), lagt i sil og skylt i HBSS, og hatt over i en Erlenmeyerkolbe, som var veid på forhånd. Kolben med placentavev ble så veid på nytt for å beregne mengde vev. Enzym og prevarmet buffer til 37<sup>0</sup>C ble så tilsatt. All inkubering med enzym ble gjort på 37<sup>0</sup>C med lett risting i inkubator. Protokoll 5 består av mekanisk isolering etterfulgt av seleksjon med diskontinuerlig percollgradient og negativ seleksjon på MACS kolonne. Alle buffere, løsninger og medium er samlet i tabell 3

**Tabell 1: Isoleringsprotokoller**

Protokoll	Metode	Seleksjon	Yield	Ref
1	Trypsin 0,25 % + DNase 300U/ml Vev/buffer: 1g/3 ml Inkubering: 3 x 15-20 min	Percoll 5-70 % (5%) MACS kolonne negativ seleksjon HLA-klasse I	1,5-3x10 <sup>8</sup> celler per 40 g vev	[30]
2	Trypsin 0,20 % Vev/buffer: 1 g/4 ml Inkubering: 1,5-2 timer	Percoll 5-70 % (5 %) MACS kolonne	15-30x10 <sup>6</sup> celler per 30 g vev	[26]
3	Trypsin 0,5-5mg/ml + DNaseI 10 µg/ml. Vev/buffer: 1 g/3 ml Inkubering: 3x 15 min	Lyseringsbuffer. Filter 40 µm. MACS kolonne.	2,2-2,5x10 <sup>6</sup> celler per 33 g vev	[31]
4	Trypsin 0,125 % + DNase 100 µg/ml(1. runde) Vev/buffer: 1g /3 ml Inkubering: 4x15 min	Percoll 10-60 % (5 %) MACS kolonne negativ seleksjon (CD3, CD9, CD31, CD14, CD45RA)	0,5x10 <sup>6</sup> celler per 1,38 g vev	[29]

5	Mekanisk isolering. Skraper av fra villi. Filtrerer 100µ m + 40 µm.	Percoll 5-70% (5 %) MACS kolonne		[9]
---	---	-------------------------------------	--	-----

Etter isolering ble cellene enten farget direkte for bruk på MACS kolonne, eller de ble vasket, resuspendert i frysemedium og frosset på  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cellesuspensjonen som var kjørt gjennom kolonnen ble også enten farget direkte for karakterisering i flow cytometer, eller de ble vasket, resuspendert i frysemedium og frosset.

### **Negativ immunomagnetisk seleksjon på MACS kolonne**

Frosne celler ble tinet under  $37^{\circ}\text{C}$  rennende vann, overført til et 15 mL rør med kaldt medium og spunnet ned på 200g i 10 min ved  $4^{\circ}\text{C}$ , resuspendert i kald CSB og talt i mikroskop. Cellene ble så spunnet ned på nytt og resuspendert i 1 mL CSB, tilsatt CD45RO-PE, CD45RA-PE, CD9-PE og CD14-PE, inkubert på  $4^{\circ}\text{C}$  i 30 min, vasket, resuspendert i 80 µL buffer og 20 µL MACS anti-PE beads, inkubert på  $4^{\circ}\text{C}$  i 20 min, vasket og resuspendert i 3 mL buffer.

Kolonnen (LS) ble først avkjølt og prefuktet med 3 mL buffer før cellesuspensjonen ble kjørt gjennom. Kolonnen ble så skylt med 2x3 mL buffer. Cellene som hadde bundet seg til kolonnen ble til slutt samlet i et nytt rør ved at kolonnen ble fjernet fra magneten, 2x3 mL buffer ble tilsatt kolonnen, og stempelet ble brukt til å presse siste rest av buffer gjennom. Cellene fra dette trinnet ble enten vasket, resuspendert i frysemedium og frosset til senere bruk, eller vasket og resuspendert i PBSA for farging og karakterisering i flow cytometer.

## **Karakterisering av trofoblaster i flow cytometri**

Cellene fra MACS kolonnen, resuspendert i 40  $\mu$ L PBSA, ble inkubert med antistoff mot overflatemarkører i 30 min på is, videre fiksert i 100  $\mu$ L 4 % paraformaldehyd i 15 min, permeabilisert i 100  $\mu$ L saponinbuffer i 30 min, og inkubert med antistoff mot intracellulære markører i 30 minutter, før de ble kjørt på FACS Canto Flow Cytometer. Villøse cytotrofoblaster ble identifisert som CK7 positive, HLA klasse I-, HLA-klasse II-, CD3- og HLA-G negative.

## **Min protokoll**

Placenta ble skyllet i NaCl, kuttet i biter og hatt over på sterile petriskåler med HBSS. Her ble vevet kuttet i enda mindre biter, lagt i sil og vasket flere ganger med 1x HBSS. Omtrent 60 gram vev ble overført til en Erlenmeyerkolbe. Trypsin (0,25 %)(Invitrogen, cat.no 15090-046) og DNaseI (300U/ml)(Sigma, cat.no D-5025) ble så tilsatt prevarmet enzymbuffer til 37<sup>0</sup>C og inkubert i 15 minutter på 37<sup>0</sup>C med lett risting. Dette ble gjentatt i tre runder med ulikt volum enzymløsning hver gang (180 ml, 100 ml og 75 ml), og hvor DNaseI bare var med i den første inkuberingen. Etter hver inkubering fikk vevet legge seg og suspensjonen ble pipettert av før ny løsning ble tilsatt. Den avpipetterte suspensjonen ble spunnet ned på 1000g i 5 min, resuspendert i medium med 10 % FBS for å inaktivere trypsin, spunnet ned, og resuspendert i 10 ml medium. Cellesuspensjonen ble videre lagt over en percoll (Sigma, cat.no P-4937)/lymfoprep (Axis Shield, Norge) gradient (12 ml lymfoprep + 12 ml percoll 25 %), og spunnet på 900 g i 15 min uten aksellerasjon og brems. Debris på toppen (over 25 %) ble fjernet. Laget fra 24-12 ml ble pipettert av, fortynnet ¼ i medium og spunnet ned (1000g, 5 min). I de fleste tilfeller ble cellene resuspendert i frysemedium og frosset etter dette trinnet. I noen tilfeller ble de derimot videre behandlet på MACS kolonne direkte, med negativ seleksjon av CD9, CD45RO, CD45RA og CD14. De isolerte

trofoblastcellene fra dette trinnet ble enten brukt direkte til flowcytometri, eller de ble resuspendert i frysemedium og frosset på  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **Resultater**

### **Etablering av protokoll for anriking av villøse cytotrofoblaster fra placentavev**

For å komme frem til en metode for isolering av trofoblaster som gav optimal yield og renhet ble altså 5 ulike protokoller prøvd ut.

Min protokoll er satt sammen av deler fra flere av disse protokollene, men hovedtyngden er tatt fra protokoll 1 i tabell 1. En del av trinnene i de andre protokollene, og i et par tilfeller hele protokollen, ble forkastet på grunn av lav yield eller lav viabilitet (data ikke vist). Protokoll 3 innebærer bruk av lyseringsbuffer for å fjerne alle de røde blodcellene. Ved utprøving av denne protokollen var det veldig få levende celler igjen ved kjøring i flowcytometeret. Det kan være at trofoblastene ikke tålte behandlingen med lyseringsbufferen. Mengden av arbeidsinnsats ble også tatt med i betraktingen når det gjaldt å komme fram til en protokoll. Protokoll 5, mekanisk isolering, er tidkrevende og ble først og fremst forkastet på grunn av dette.

### **Min Protokoll**

Den nye protokollen for isolering av trofoblaster, med detaljert beskrivelse i ”Materiale og metode” delen innebærer følgende steg:

1. Mekanisk og enzymatisk oppløsning av placentavev til individuelle celler.
2. Anriking av trofoblaster ved sentrifugering over en tetthetsgradient.
3. Fjerning av irrelevante celler med konjugerte antistoffer som binder ikke-trofoblast celler og sortering over magnetisk kolonne.



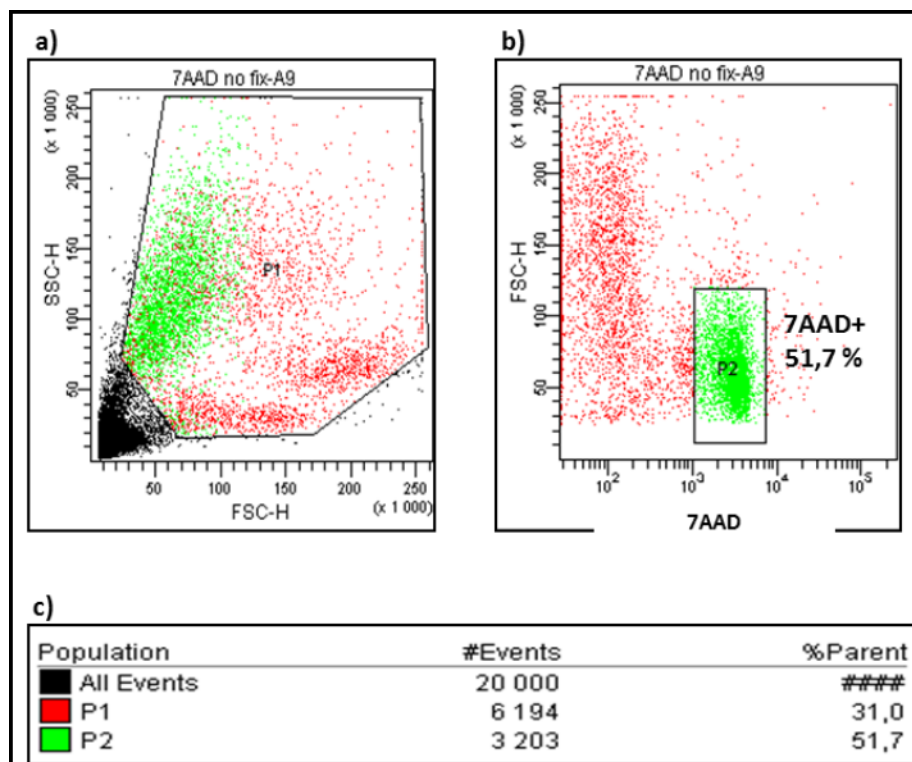
## Yield

Yield etter behandling med percoll/lymfoprep var omtrent  $20 \times 10^6$  celler per 30 gram vev. Etter negativ seleksjon på MACS kolonne forsvant omtrent halvparten av cellene (talt i lysmikroskop ved hjelp av tellekammer).

## Fenotypisk karakterisering av isolerte celler

Omtrent halvparten av de isolerte cellene er døende

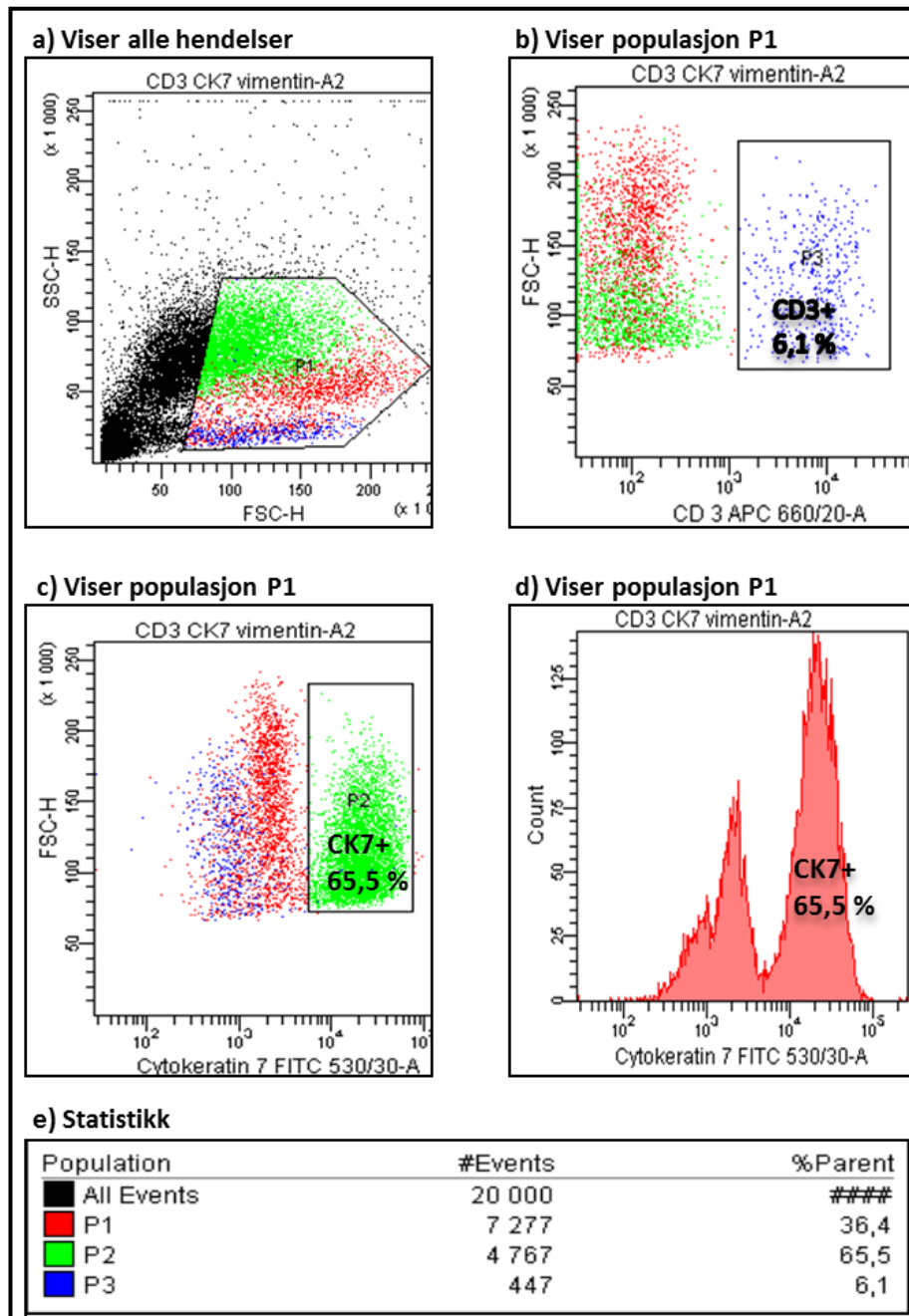
Før negativ seleksjon på MACS kolonne var omtrent halvparten av de isolerte cellene døende, og farget for 7AAD.



Figur 3. Flow cytometri analyse av placentaceller isolert ved sentrifugering over percoll/lymfoprep gradient før negativ seleksjon på MACS kolonne. Isolerte celler ble farget med 7AAD for å skille levende fra døende celler. a) Populasjon P1 viser alle antatte hele celler. b) Hendelser av populasjon P1 i a) som er 7AAD positive (døende).

**Omtrent halvparten av isolerte celler etter behandling med percoll/lymfoprep er cytokeratin 7 positive**

Av alle isolerte celler før negativ seleksjon på MACS kolonne var 40-65 % positive for cytokeratin 7 (figur 4, P2). Størsteparten av de resterende cellene var enten positive for overflatemarkøren CD3 (figur 4, P3) eller CD14 (ikke vist).



**Figur 4.** Flow cytometri analyse av placentaceller isolert ved sentrifugering over percoll/lymfoprep gradient (før negativ seleksjon på MACS kolonne). Isolerte celler ble farget med fluorokorom-konjugerte antistoffer for å skille trofoblaster fra andre

celletyper ved flow cytometri: CD3-APC, CK7-FITC. Viser resultater fra en isolering.

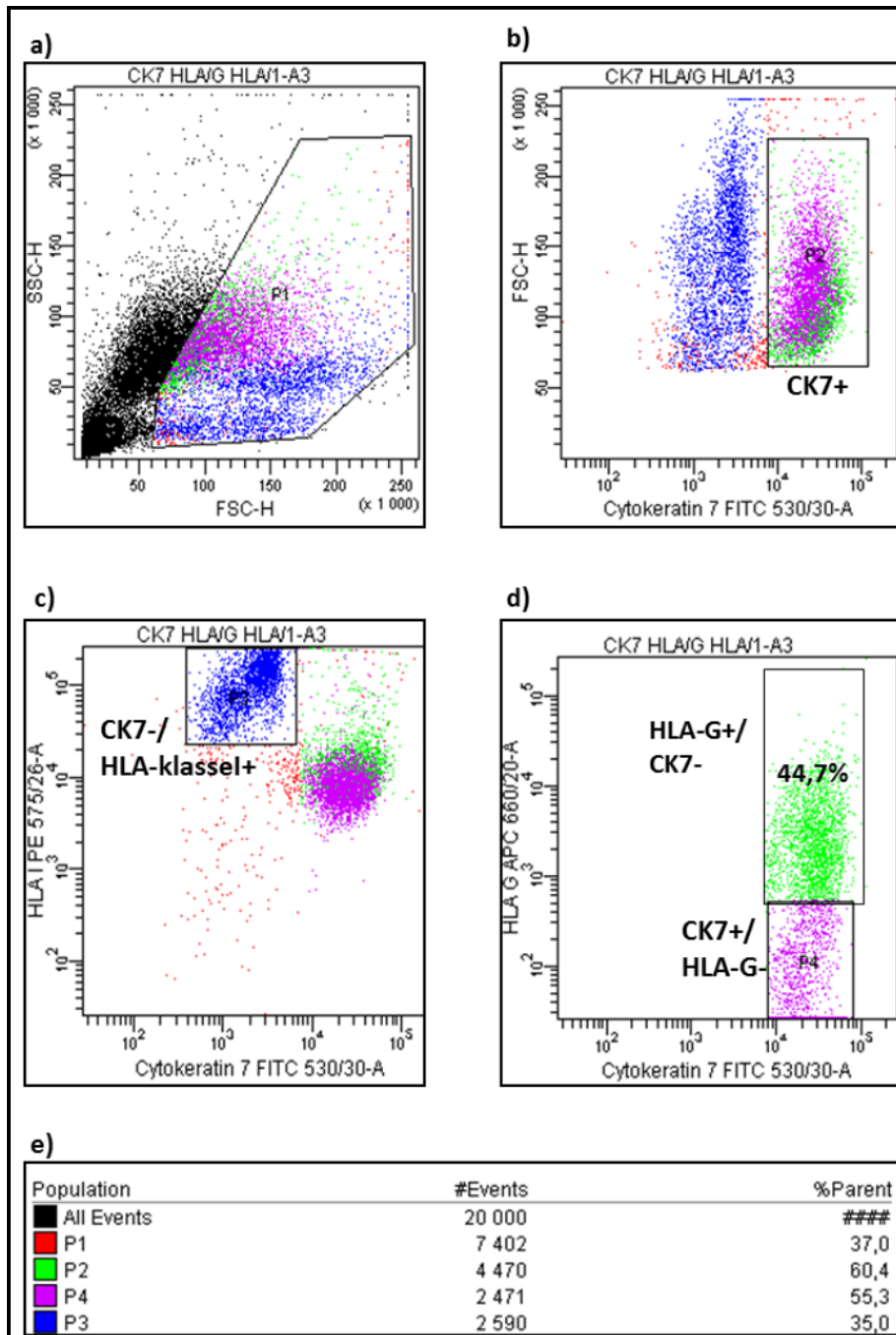
a) Populasjonen definert av rammen P1 identifiserer levende celler (se Figur 3).

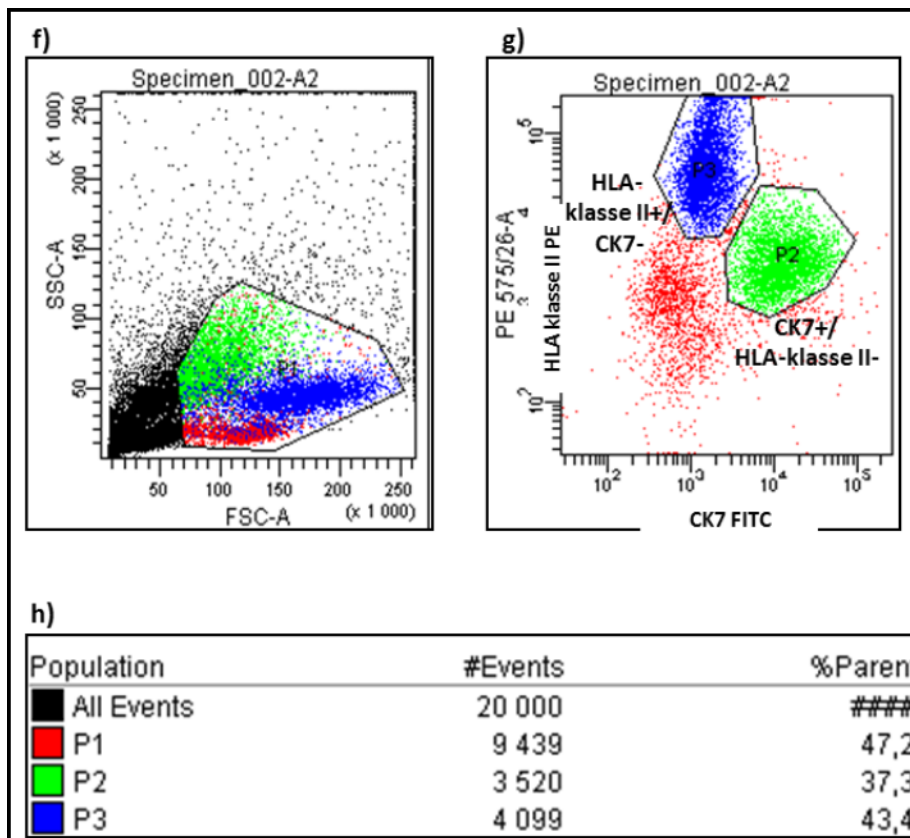
b) Hendelser i populasjon P1 i a) som er CD3-positive (dvs T celler). c) og d)

Hendelser i P1 i a) som er CK7-positive (dvs trofoblaster).

**Cytokeratin 7 positive celler er HLA-klasse II- og HLA-klasse I negative, og HLA-G negative/positive**

Isolerte celler som farget positivt for cytotkeratin 7, farget ikke samtidig positivt for HLA-klasse II-PE eller HLA-klasse I-PE (figur 5). Omtrent halvparten av cytotkeratin 7 positive celler farget imidlertid for HLA-G-APC (figur 5). De cytotkeratin 7 positive cellene var altså ikke antigenpresenterende celler, men halvparten av de så ut til å være ekstravilløse trofoblaster.



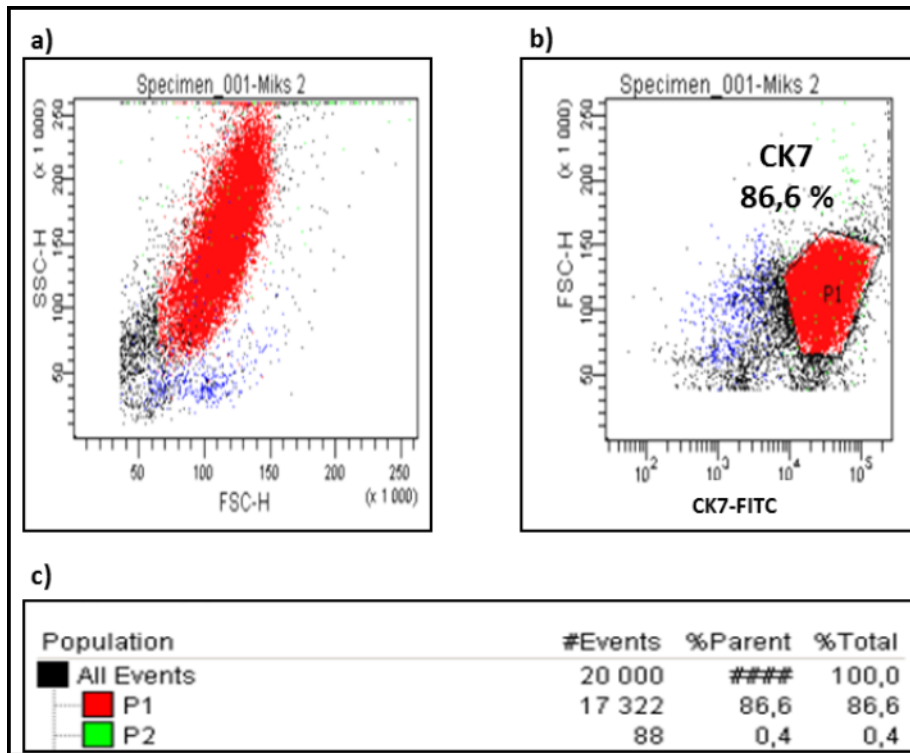


**Figur 5:** Flow cytometri analyse av placentaceller før negativ seleksjon på MACS kolonne. Isolerte celler ble farget med fluorokorom-konjugerte antistoffer for å skille villøse trofoblaster fra ekstravilløse trofoblaster og antigenpresenterende celler.

a) Populasjon P1 identifiserer levende celler (se figur 6). b) Hendelser i populasjon P1 i a) som er CK7-positive. c) Av populasjonen P1 i a) skilles to populasjoner basert på ulikt uttrykk av CK7 og HLA klasse I ("HLA I"). Den ene populasjonen (P3) uttrykker HLA I intenst og CK7 moderat, den andre populasjonen uttrykker HLA I moderat og CK7 intenst. d) Omtrent halvparten av CK7 positive celler i populasjon P2 i b) er HLA G positive (45 %). e) Statistikk for populasjoner vist i a). f) Populasjon P1 identifiserer levende celler. g) Av populasjon P1 i f) skilles to populasjoner basert på uttrykk av HLA klasse II og CK7. Den ene populasjonen (P3) uttrykker HLA klasse II intenst og CK7 moderat, den andre populasjonen uttrykker HLA klasse II moderat og CK7 intenst. h) Statistikk for populasjoner vist i f).

**85-90 % av alle isolerte celler etter negativ seleksjon på MACS kolonne er cytokeratin 7 positive**

Etter negativ seleksjon på MACS kolonne var nesten alle ikke-trofoblastceller fjernet. 85-90 % av de isolerte cellene farget nå for cytokeratin 7 (resultat vist for 1 isolering, figur 6).



**Figur 6.** Flow cytometri analyse av placentaceller isolert ved sentrifugering over percoll/lymfoprep gradient etter negativ seleksjon på MACS kolonne. Isolerte celler ble farget med fluorokrom-konjugerte antistoffer for å skjelne trofoblaster fra leukocytter: CK7-FITC, CD3-APC (gate kun vist for CK7-FITC positive celler). a) Viser alle hendelser, også døde celler. b) Populasjon P1 viser hendelser i a) som er CK7 positive.

## Diskusjon

Isolering av humane villøse trofoblastceller er en nødvendighet for fenotypiske, molekylære og funksjonelle studier in vitro. Dette krever gode isoleringsteknikker. Målet er å sitte igjen med så stor yield som mulig, at populasjonen av celler er så ren som mulig, at cellene fortsatt er viable, og at de har beholdt sin morfologi [32] Målet for dette arbeidet var å utarbeide en protokoll for optimal isolering av trofoblaster til bruk i senere prosjekter. I dette arbeidet lyktes det å isolere villøse cytotrofoblastceller. Yield fra isoleringen var omtrent like god som med de publiserte protokollene. En større del av de isolerte trofoblastene ved bruk av denne protokollen farget imidlertid for 7AAD sammenlignet med det som er rapportert ved bruk av de andre protokollene. Ved bruk av MACS kolonne ble omtrent 50 % av cellepopulasjonen fjernet, her i blant leukocytter, stromale celler og noen trofoblaster. Populasjonen etter endt protokoll bestod av 85-90 % cytotrofoblastceller. For videre bruk av denne protokollen i laboratoriet kreves imidlertid fortsatt optimalisering, herunder gjennomgang og utprøving på hvert enkelt trinn i protokollen, for større yield, renere populasjon og, ikke minst, høyere overlevelse. Tatt i betraktning den store mengden villøse cytotrofoblaster som finnes i det intervilløse rommet, er det nesten litt underlig at isoleringen ikke gir større utbytte. Det vil altså kreve ytterligere mye arbeid for å utnytte det tilgjengelige vevet full ut.

Bruken av flow cytometri analyser for dokumentasjon av renhet og viabilitet i dette prosjektet ble valgt med bakgrunn i at dette er en velkjent objektiv metode [33], det gir mulighet til analyse av flere parametre samtidig, og det er en allerede godt kjent og mye brukt metode i laboratoriet. Andre alternative metoder for det samme formålet er bruk av cytospin for mål på viabilitet [33], og immunofluorescence staining direkte i kulturplaten med bruk av lysmikroskop for dokumentasjon av renhet [33].

Hvorfor er det nyttig å kunne isolere villøse cytotrofoblastceller i det videre arbeidet med neonatal alloimmun trombocytopeni? Det er, som sagt i introduksjonen, fortsatt mye uvisst når det gjelder immuniseringen mot

HPA-1a hos HPA-1a negative kvinner. En forutsetning for immunisering er at kvinnene er HPA-1a negative, bærer et HPA-1a positivt barn, og selv bærer HLA klasse II allelet DRB3\*0101. Som vi har sett, er det bare 1/3 av kvinnene med disse forutsetningene som immuniseres, og av alle de som immuniseres er det ikke alle som føder barn med trombocytopeni. En del av den gjenværende forklaringen på denne sykdommen kan ligge i placenta. Kanskje er antigenet, som del av vitronectinreseptor uttrykt ulikt hos de som immuniseres og de som ikke immuniseres? Kanskje er overflateuttrykket på cytotrofoblastcellene ulikt på andre måter hos de to gruppene? Kanskje reagerer de villøse cytotrofoblastene ulikt på ulike stimuli, noe som igjen kan påvirke miljøet i placenta, og dermed også forutsetningen for immunisering? Vi vet at syncytiotrofoblaster og syncytial knots løsner til maternell sirkulasjon, og Chen et al [34] har vist at økt konsentrasjon av ulike cytokiner, der i blant TNF alpha, gir økt shedding av trofoblastceller og –debris fra placenta, og at disse cellene gir økt aktivering av endotel. Kan et inflammatorisk miljø, som gir økt shedding av trofoblastmateriale og dermed økt mengde HPA-1a antigen i sirkulasjonen gi økt risiko for immunisering?

Vi vet heller ikke hvor immuniseringen i dette tilfellet finner sted; I regional lymfeknute? I milten? Funnene til Collins et al [10] viser at dendrittske celler i decidua fanges i vevet og dermed ikke når drenerende lymfekar eller nærmeste lymfeknute, men at det foregår en cellefri transport i lymfekar fra decidua. Er dette forskjellig hos de som immuniseres og de som ikke immuniseres? Er de dendrittske cellene ulike på noen måte hos disse gruppene? Reagerer de ulikt på ulike miljø? Et av de videre skrittene i arbeidet med NAIT kan altså være å isolere dendrittske celler fra decidua basalis hos immuniserte og ikke-immuniserte kvinner. Kan man vise at disse dendrittske cellene binder antigenet på overflaten, i gropen til et HLA klasse II molekyl? Kan vi videre vise at en slik antigenpresenterende celle aktiverer T cellekloner fra immuniserte kvinner? Kan vi videre spore disse dendrittske cellene i sirkulasjonen på noe vis?



Cellestudier in vitro har naturligvis sin begrensning i at cellene tas ut fra sitt naturlige miljø; de er ikke lenger under påvirkning fra stromavevet rundt, og påvirkes ikke lenger av de samme cytokiner og vevsfaktorer som de normalt virker i samspill med. I tillegg vil behandlingen av vevet under isoleringsprosessen og den videre behandlingen av de isolerte trofoblastcellene i prosessen kunne påvirke cellene på mange måter. Det vil være naturlig å tenke seg at overflateuttrykket at ulike proteiner vil kunne endre seg, i retning økt – eller redusert uttrykk, eller kanskje i form av endret konformitet. Dette vil kunne gi resultater som er misvisende med tanke på hvordan dette ser ut in vivo. Et endret overflateuttrykk hos cellene og endring av miljøet de finnes i vil derfor også kunne gi reaksjonsmønstre hos disse cellene som er forskjellige fra de mønstrene man hadde funnet dersom man hadde kunnet studert dette i cellenes rette miljø in vivo.

Hvordan oppfører de isolerte villøse cytotrofoblastene seg i cellekultur? Hva skal til for at de overlever i kultur og danner et syncytium? Hvor lang tid tar det før de danner et syncytium? Hvordan kan man utvide deres levetid? Protokollen som er brukt i dette arbeidet kan videreutvikles, og de villøse cytotrofoblastene som isoleres kan brukes i primærkultur, først for å besvare de ovennevnte spørsmålene og bli kjent med disse cellenes oppførsel i kultur, for deretter å kunne brukes til videre spørsmål direkte knyttet til HPA-1a-immunisering.

Villøse cytotrofoblaster fra 1. trimester placenta er også tilgjengelig for isolering fra selvvalgte aborter før uke 12. Hvordan er disse trofoblastene ulike fra siste trimester trofoblaster hos HPA-1a-immuniserte? Kan disse oppføre seg ulikt, se ulike ut i form av overflateuttrykk, eller reagere ulikt på ulike stimuli i forhold til trofoblaster fra ikke-immuniserte og tilfeldige normale?

Høyt anti-HPA-1a antistofftiter er vist å ha sammenheng med lav fødselsvekt hos guttebarn [35]. Redusert utvikling og funksjon i placenta gir dårligere vekst av foster i mors liv som følge av mindre tilgjengelige næringsstoffer. Er det i dette tilfellet det høye antistofftiteret som påvirker

placenta med påfølgende redusert funksjon og liten vekst av fosteret, eller er det endret placentafunksjon eller placentamiljø som på en eller annen måte gir større antistoffproduksjon, og samtidig hemmer fostervekst? Kan det for eksempel være et inflammatorisk miljø som gir redusert vekst i tillegg til lettere immunisering?

Den store screeningsstudien gjennomført av vår gruppe med samarbeidspartnere fra 1995 til 2001, med tanke på HPA-1a-immunisering og NAIT i Norge [16] ga blant annet mye innsamlet biologisk materiale i form av DNA, RNA, plasma og PBMC (perifert blod mononukleære celler) fra HPA-1a-immuniserte kvinner. Dette har vært et uvurderlig materiale og har gitt nye svar angående HPA-1a-immunisering [14, 17, 36, 37]. I etterkant av en sånn screening, og sett i lys av alle nevnte ubesvarte spørsmål, er det naturlig å ønske at screeningen hadde inkludert mer i form av både kliniske opplysninger og biologisk materiale enn den gjorde. For å kunne finne nye svar, da med utgangspunkt i placenta og decidua, som synes som noe glemte eller oversette områder i patogenesen for HPA-1a-immunisering, ønsker jeg meg en placentabank med innsamlet placentamateriale fra normale svangerskap i 1. og siste trimester, svangerskap med HPA-1a negative kvinner som ikke immuniseres, og svangerskap med HPA-1a negative kvinner som immuniseres! I tillegg til innsamling av biologisk materiale kunne også videre kliniske opplysninger, blant annet i form av informasjon som røykeanamnese, infeksjoner i svangerskapet og lignende være av interesse. Innsamling av slike kliniske opplysninger og placentamateriale krever naturlig nok mye planlegging, og vil være lettest gjennomførbart med en ny screening. Før en slik eventuell innsamling av materiale startes er det avgjørende å ha en plan for hva man ønsker å finne svar på i det innsamlete materialet. Neste skritt på veien er å ta fatt i hvert enkelt spørsmål: Hva lurer jeg på? Hvilke metoder kjenner jeg for å finne svar på spørsmålet? Hva trenger jeg av materiale for å finne svaret? Hvordan samler jeg inn materialet, og hvordan må det behandles?

## Referanser

1. Austgulen, R., et al., *Pre-eclampsia: associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age*. Journal of Reproductive Immunology, 2004. **61**(1): p. 39-50.
2. Arulkumaran, S., I.M. Symonds, and A. Fowlie, *Oxford Handbook of Obstetrics and Gynaecology*. 2004.
3. TW, S., *Langman's Medical Embryology*. 2004.
4. Chakraborty, R. and B. Pulendran, *Restraining order for dendritic cells: all quiet on the fetal front*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(7): p. 1854-7.
5. Kanellopoulos-Langevin, C., et al., *Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface*. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 2003. **1**: p. 121.
6. Volchek, M., et al., *Lymphatics in the human endometrium disappear during decidualization*. Hum Reprod. **25**(10): p. 2455-64.
7. Blanco, O., et al., *Human decidual stromal cells express HLA-G: Effects of cytokines and decidualization*. Human reproduction, 2008. **23**(1): p. 144-52.
8. King, A., et al., *Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast*. Placenta, 2000. **21**(4): p. 376-87.
9. Gardner, L. and A. Moffett, *Dendritic cells in the human decidua*. Biol Reprod, 2003. **69**(4): p. 1438-46.
10. Collins, M.K., C.S. Tay, and A. Erlebacher, *Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 2062-73.
11. Red-Horse, K., *Lymphatic vessel dynamics in the uterine wall*. Placenta, 2008. **29 Suppl A**: p. S55-9.
12. Red-Horse, K., et al., *Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2643-52.
13. Szlauer, R., et al., *Functional expression of the human neonatal Fc-receptor, hFcRn, in isolated cultured human syncytiotrophoblasts*. Placenta, 2009. **30**(6): p. 507-15.
14. Williamson, L.M., et al., *The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PLA1, Zwa) as determined by antenatal screening*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2280-7.
15. Ghevaert, C., et al., *Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia*. Transfusion, 2007. **47**(5): p. 901-10.

16. Kjeldsen-Kragh, J., et al., *A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia*. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 833-9.
17. Ahlen, M.T., et al., *T-cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: isolation of HPA-1a-specific, HLA-DRB3\*0101-restricted CD4+ T cells*. *Blood*, 2009. **113**(16): p. 3838-44.
18. Turner, M.L., et al., *Prospective epidemiologic study of the outcome and cost-effectiveness of antenatal screening to detect neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a*. *Transfusion*, 2005. **45**(12): p. 1945-56.
19. Maslanka, K., K. Guz, and B. Zupanska, *Antenatal screening of unselected pregnant women for HPA-1a antigen, antibody and alloimmune thrombocytopenia*. *Vox Sang*, 2003. **85**(4): p. 326-7.
20. Mueller-Eckhardt, C., et al., *348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia*. *Lancet*, 1989. **1**(8634): p. 363-6.
21. Kumpel, B.M., et al., *Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, beta 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy*. *Transfusion*, 2008. **48**(10): p. 2077-86.
22. Schmidt, M., et al., *Detection of circulating trophoblast particles in peripheral maternal blood in preeclampsia complicated pregnancies*. *Hypertens Pregnancy*, 2008. **27**(2): p. 131-42.
23. Burton, G.J. and C.J. Jones, *Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta*. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2009. **48**(1): p. 28-37.
24. Kumpel, B., et al., *Phenotype and mRNA expression of syncytiotrophoblast microparticles isolated from human placenta*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008. **1137**: p. 144-7.
25. Kliman, H.J., et al., *Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae*. *Endocrinology*, 1986. **118**(4): p. 1567-82.
26. Manoussaka, M.S., et al., *Flow cytometric characterisation of cells of differing densities isolated from human term placentae and enrichment of villous trophoblast cells*. *Placenta*, 2005. **26**(4): p. 308-18.
27. Douglas, G.C. and B.F. King, *Isolation of pure villous cytotrophoblast from term human placenta using immunomagnetic microspheres*. *J Immunol Methods*, 1989. **119**(2): p. 259-68.
28. Blaschitz, A., et al., *Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening*. *Placenta*, 2000. **21**(7): p. 733-41.
29. Maldonado-Estrada, J., et al., *Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 2004. **286**(1-2): p. 21-34.

30. Petroff, M.G., et al., *Isolation and culture of term human trophoblast cells*. *Methods Mol Med*, 2006. **121**: p. 203-17.
31. Pötgens, A.J.G., et al., *A Positive Immunoselection Method to Isolate Villous Cytotrophoblast Cells from First Trimester and Term Placenta to High Purity*. *Placenta*, 2003. **24**(4): p. 412-423.
32. Stenqvist, A.C., et al., *An efficient optimized method for isolation of villous trophoblast cells from human early pregnancy placenta suitable for functional and molecular studies*. *Am J Reprod Immunol*, 2008. **60**(1): p. 33-42.
33. Shiverick KT, K.A., Frank H-G, Whitley GStJ, Cartwright JE, Schneider., *Cell Culture Models of Human Trophoblast II: Trophoblast Cell Lines - A Workshop Report*. *Placenta*, 2001. **22**(15): p. S104-S106.
34. Chen, L.M., et al., *IL-6, TNFalpha and TGFbeta promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation*. *Placenta*, 2010. **31**(1): p. 75-80.
35. Tiller, H., *Platelet antibodies and fetal growth: maternal antibodies against fetal platelet antigen 1a are strongly associated with reduced birthweight in boys*. *Acta Obstetrics et Gynecologica Scandinavica*, 2011(August 2011).
36. Kjeldsen-Kragh, J., et al., *In HPA 1a-immunized women the decrease in anti-HPA 1a antibody level during pregnancy is not associated with anti-idiotypic antibodies*. *Haematologica*, 2009. **94**(3): p. 441-3.
37. Bessos, H., et al., *The relationship of anti-HPA-1a amount to severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia - Where does it stand?* *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 2009. **40**(2): p. 75-8.

## Tabeller

**Tabell 2: Overflate- og intracellulære markører**

Markør	Fluorokrom	Celletype	Cellelokalisasjon	Antistoff
Cytokeratin 7	FITC	Epiteliale celler	Intracellulært	Abcam, ab9285-500
CD45	PerCp PE/Cy7	Pan leukocyt	Celleoverflate	Abcam, ab46729
CD14	PE	Monocytter, Dc	Celleoverflate	BD 555398

CD9	PE	Bc, EVT, monocytter, eosinofile, basofile, makrofager, fibroblaster.....	Celleoverflate	BD, 341647
CD3	APC	Tc	Celleoverflate	BD 555335
HLA-klasse II	PE	APC	Celleoverflate	Abcam, ab23901
HLA-klasse I	PE APC	Alle celler med kjerne, EVT	Celleoverflate	Abcam, ab58998 Invitrogen MHBC05
HLA-G	APC	EVT	Celleoverflate	Abcam, ab40915
7AAD		Binder DNA, celler uten intakt cellemembran	Intracellulært	BD, 559925
CD45RA	PE	Naïve Tc	Celleoverflate	BD, 555489
CD45RO	PE	Memory Tc	Celleoverflate	

**Tabell 3: Enzymer, buffere, medium og løsninger**

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	5,36 mM KCl 4,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,37 M NaCl 3,37 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 55,5 mM D-glukose Deionisert H <sub>2</sub> O
Trofoblastmedium	IMDM 10 % iFBS (fetal bovine serum) 2mM L-glutamin 1x penicillin/streptomycin

Enzymbuffer	1x HBSS 25 mM HEPES 0,035 % NaHCO <sub>3</sub>
Enzymløsning	1x HBSS 25 mM HEPES 0,25 % Trypsin 300 U/mL DNase I
Cell Separation Buffer (CSB)	PBS 0,5 % BSA (bovine serum albumin) 2 mM EDTA
Frysemedium	FBS 10 % DMSO
Fikseringsbuffer	4 % paraformaldehyd
Permeabiliseringsbuffer	Saponinbuffer