

# A madár thymus dendritikus sejtjeinek in vivo identifikálása és a thymus velőállományának kompartmentalizációja

Doktori értekezés

**Bódi Ildikó**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Oláh Imre, MTA doktora, professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár  
Dr. Németh Péter, PhD, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, MTA doktora, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Balogh Péter, PhD, egyetemi docens  
Dr. Székely Andrea, PhD, egyetemi docens

Budapest  
2016

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 A DENDRITIKUS SEJTEK .....</b>	<b>7</b>
2.1.1. A lymphoid dendritikus sejtek felfedezésének előzményei .....	7
2.1.2 A lymphoid dendritikus sejtek .....	8
2.1.3. A dendritikus sejtek definíciója, sejtfelszíni markerei .....	10
2.1.4. A dendritikus sejtek alosztályai .....	11
2.1.5. A dendritikus sejtek és a makrofágok fejlődésének útvonalai .....	13
2.1.6. A thymus dendritikus sejtek funkciója és szerepük a centrális tolerancia kialakításában .....	17
2.1.7. A thymus dendritikus sejtek prekursorai és azok fejlődési útvonalai .....	19
<b>2.2. A THYMUS ORGANOGENEZISE .....</b>	<b>21</b>
2.2.1. A thymus hámsejtek és progenitoraik jellemzése .....	23
2.2.2. Cysták .....	28
2.2.3. Hassall testek .....	29
2.2.4. Myoid sejtek .....	30
2.2.5. Az extracelluláris mátrix szerepe a thymusban .....	31
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>33</b>
<b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>34</b>
4.1. Anyagok .....	34
4.2. Kísérleti állatok .....	34
4.3. Immunhisztokémia .....	35
4.4. Félvékony technika, elektronmikroszkópia .....	36
4.5. A dendritikus sejtek kimutatása pre-embedding immunhisztokémia technikával .....	36
4.6. Dexametazon kezelés .....	36
4.7. Proliferáció vizsgálata bromo-deoxyuridinnel .....	37
4.8. Morfometriás mérés .....	37
4.9. Fűrj-csirke testüreg kiméra .....	38
4.10. Fűrj-csirke chorioallantois membrán kiméra .....	38
4.11. Csirke-fűrj testüreg kiméra .....	38
4.12. Ezüst impregnáció .....	39
<b>5. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. A CSIRKE THYMUS DENDRITIKUS SEJTJEINEK NYOMÁBAN .....</b>	<b>41</b>
5.1.1. A csirke thymus dendritikus sejtjeinek in vivo immunmorfológiai identifikálása és karakterizálása .....	41
5.1.2. A 74.3 pozitív sejtek eredete a thymus kéreg- és velőállományában .....	48
<b>5.3. A KÉRGI HÁMSEJTEK VARIÁBILITÁSÁNAK JELLEMZÉSE .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2. A MADÁR THYMUS VELŐÁLLOMÁNYÁNAK KOMPARTMENTALIZÁCIÓJA .....</b>	<b>59</b>
5.2.1. A KPN és a KNA megjelenése .....	59
5.2.2. A KPN és az abból kialakult struktúrák: a Hassall test és a cysta .....	65
5.2.3. A keratin negatív területek morfológiai karakterizálása .....	70
5.2.4. A hemopoetikus sejtek kolonizációja a velőállományban .....	74
<b>6. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>76</b>
<b>6.1. A THYMUS DENDRITIKUS SEJTEK JELLEMZÉSE .....</b>	<b>77</b>
6.1.1. A thymus dendritikus sejtek lokalizációja .....	77
6.1.2. A thymus dendritikus sejtek fenotípusa .....	78

6.1.3. A thymus dendritikus sejtek eredete .....	79
6.1.4. A thymus dendritikus sejtek cytológiája és a makrofágok kizárása .....	80
6.2.1. A KPN és KNA kialakulása.....	81
6.2.2. Avelő hámsejtek differenciálódási lehetőségei: a KPN széli sejtjei, cysta és a Hassall test.....	84
6.2.3. Vér-thymus barrier.....	87
6.2.4. A KNA eredete és kapcsolata a PS-ekkel .....	88
6.2.5. A dendritikus sejtek és lymphoid sejtek topográfiai viszonya a KNA-ban.....	89
<b>KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>91</b>
<b>ÖSSZEFOGLALÓ .....</b>	<b>93</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>94</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>95</b>
<b>PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>124</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>125</b>
<b>AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK</b>	
<b>KÜLÖNLENYOMATAI.....</b>	<b>126</b>

**1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AIRE	autoimmune regulátor
APC	antigénprezentáló sejt (antigen presenting cells)
ABC	Avidin-biotin-peroxidáz komplex
Bmp	bone morphogenic protein
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin
BSA	bovine serum albumine
BSDC	bursai szekréciós dendritikus sejtek (bursal secretory dendritic cell)
BTB	vér-thymus barrier (blood-thymus barrier)
CAM	chorioallantois membrán
chDC-LAMP	csirke dendritikus sejt membránhoz asszociált lysoszomális preotein (chicken dendritic cell-lysosomal associated membrane protein)
CDP	közös dendritikus sejt progenitor (Common Dendritic cell Progenitor)
CMP	közös myeloid progenitor (Common Myeloid Progenitor)
CLP	közös lymphoid progenitor (Common Lymphoid Progenitor)
CLR	C-típusú lektin receptor
CSF	colonia-stimuláló-faktor
CSF-1R	colonia-stimuláló-faktor-1 receptor
cDC	konvencionális dendritikus sejt (conventional dendritic cell)
cMoP	közös monocyta progenitor (common monocyte progenitor)
cTEC	thymus kérgi hámsejt (cortical thymic epithelial cell)
cTEP	thymus kérgi hámsejt progenitor (cortical thymic epithelial progenitor)
DAB	3,3-diamino-benzidin
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	dendritikus sejt (dendritic cell)
DC-SIGN	dendritikus sejt specifikus intercelluláris adhéziós molekula (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin)
DER	durvafelszínű endoplazmás retikulum
DM	dexametazon
DN	dupla negatív
DP	dupla pozitív

ECM	extracelluláris matrix
EPC	endogénperoxidáz pozitív sejt (endogenous-peroxidase positive cell)
EpCAM	hámsejt adhéziós molekula (epithelial cell adhesion molecule)
FDC	follikuláris dendritikus sejt (follicular dendritic cell)
Fgf	fibroblast growth factor
Flt	Fms-szerű tirozin kináz (Fms-like tyrosine kinase)
Flt3L	Fms-szerű tirozin kináz receptor 3 ligandja
FoxP3	forkhead box P3
GA	glutáraldehid
GM-CSF	granulocyta-makrofág colónia-stimuláló faktor
HB	Hassall testek (Hassall's bodies)
HIV	humán immundeficiencia vírus (human immunodeficiency virus)
HSA	humán szérum albumin
HSC	hemopoetikus őssejtek
IDC	interdigitáló reticulum sejt (interdigitating reticular cell)
IFN	interferon
IL	interleukin
K	cytokeratin filamentum
KIF	cytokeratin intermediér filamentum
KNA	keratin negatív területek
KPN	keratin pozitív hálózat
LPS	lyopolyszacharid
LMPP	lymphoid multipotens progenitor (lymphoid primed multipotent progenitor)
M-CSF	makrofág-colónia-stimuláló faktor
mDC	migráló dendritikus sejt (migratory dendritic cell)
MDP	közös makrofág és dendritikus sejt progenitor (macrophage and dendritic cell progenitor)
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrix metalloproteáz
MPS	mononukleáris phagocita rendszer (mononuclear phagocyte system)
mTEC	thymus velőhámsejt (medullary thymic epithelial cell)

mTEP	thymus velőhámsejt progenitor (medullary thymic epithelial progenitor)
MØ	makrofág
NC	ganglionléc (neural crest)
NCC	ganglionléc eredetű sejt (neural crest cell)
NK-sejt	természetes ölósejt (natural killer cell)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
pDC	plasmacytoid dendritikus sejt (plasmacytoid dendritic cell)
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFA	paraformaldehid
PS	primer septum
Sirp $\alpha$	Signal regulator protein $\alpha$
Shh	sonic hedgehog
SP	surfactant protein
SS	secunder septum
Tc-sejt	cytotoxikus T-sejt
TDC	thymus dendritikus sejt (thymic dendritic cell)
TEC	thymus hámsejt (thymic epithelial cell)
TEP (TEPC)	thymus hámsejt progenitor sejt (thymic epithelial progenitor cell)
TF	transzkripciós faktor
TLR	Toll-like receptor
TLR1LA	Toll-like receptor 1-like A
TMC	myoid sejtek (thymic myoid cell)
TNF	tumor nekrozis faktor
TRA	szövetspecifikus antigén (tissue restricted antigen)
Treg	regulátoros T-sejt
TSLP	Thymus Stromal LymphoPoietin
UEA-1	Ulex Europaeus Agglutinin-1
Wnt	wingless-int

## **2. BEVEZETÉS**

### ***2.1 A DENDRITIKUS SEJTEK***

#### **2.1.1. A lymphoid dendritikus sejtek felfedezésének előzményei**

A dendritikus sejtek (DC) felfedezésének úttörője Paul Langerhans, aki még orvostanhallgatóként, 1868-ban figyelt meg egy olyan nyúlványokkal rendelkező sejtet a humán epidermiszben, amiről azt hitte, hogy e sejtek az idegrendszer részét képezik. Mára már kiderült, hogy funkcióját tekintve tévedett, és az immunrendszer egyik alapvető tagjaként, mint a bőr immunválaszának elindítóját ismerjük az általa felfedezett sejtet. Mintegy 100 évvel később White és mtsai (1963) elsőként ismerték fel az antigénprezentáló sejteket, melyeket már akkor DC-eknek neveztek, habár jöllehet a “makrofágok egy típusának” tekintették. Csirkéket injektáltak humán szérum albuminnal (HSA) intravénásan. Az injektálást követően HSA-t detektáltak a lép fehér pulpájában lévő ecsetkapillárisok körüli sejtekben, majd néhány nappal később az antigént (HSA) hordozó sejteket a csíracentrumokban lehetett kimutatni. Néhány évvel később Oláh és mtsai a patkány thymusban Birbeck granulomokat tartalmazó sejtekről publikáltak (Oláh és mtsai 1968). Későbbi kutatások bizonyították, hogy a Langerhans sejtek a bőrből a thymusba vándorolhatnak (Thorbecke és mtsai 1980; Kashihara és mtsai 1986). Thorbecke munkacsoportja szerint a thymusban és a nyirokcsomókban lévő interdigitáló sejtek - melyek citoplazmájában “tipikus Birbeck granulomok”-at találtak és morfológiailag sem különböznek a Langerhans sejtektől- ugyanazon csoportba tartoznak és a “makrofágok egy alpopulációjaként” jelennek meg (Thorbecke és mtsai 1980). A patkány thymusban megfigyelt sejtek a thymus velőállományában helyezkedtek el és az egyik legjellegzetesebb sajátosságuk a sejtmembrán invaginációja. Szokatlan megjelenésük miatt a szerzők (Oláh és mtsai 1968) speciális sejteknek nevezték el. A nyúl nyirokcsomó paracortexében egy ismeretlen sejtet talált Veldman, amit interdigitáló reticuláris sejtnek (IDC) nevezett el (Veldman 1970). A sejtek különös alakkal, szabálytalan sejtmaggal rendelkeztek és citoplazmájukban “bonyolult tubulovesiculáris rendszert” figyelt meg. Újabb három év elteltével jött az áttörés, mely Steinman és Cohn (1973) nevéhez fűződik, a lymphoid dendritikus sejtnek, mint önálló sejttypusnak az identifikálása, amiért 2012-ben Nobel díjat kapott.

### **2.1.2 A lymphoid dendritikus sejtek**

A Steinman és Cohn által identifikált és karakterizált egér lép dendritikus sejtek lymphoid eredetűek, melyek meghatározása során a morfológiai kritériumokra hagyatkoztak (Steinman és Cohn 1973). Közleményükben leírják, hogy e sejtek megkülönböztető jegyeként szolgál a nagy, jellegzetes formájú sejtmag, a hosszú citoplazma nyúlvány, és a számos mitokondrium. Citoplazmájukban nem találtak endocitózisa utaló pinocitotikus vezikulákat vagy fagocitált sejtörmeléket. Később bizonyították, hogy a DC-ek nem fagocitálnak és Ia (MHCII) antigént expresszálnak (Steinman és mtsai 1979). Ezt Farr és Nakane (1983) eredményei is alátámasztják, miszerint a thymus kéreg-velő határán olyan Ia<sup>+</sup> sejteket találtak, melyek a perivascularis térben, az erek körül lokalizálódnak. Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a sejtekben nem mutattak ki fagocitózisa utaló morfológiai jegyeket.

Humán nyirokcsomó paracortexében IDC-eket talált Kaiserling és Lennert (1974), melyek létezéséről korábban a nyúl nyirokcsomóban is beszámoltak (Veldman 1970). Ezzel egyidőben Heusermann és mtsai (1974) a lép fehér pulpájában ATPáz enzim hisztokémiával IDC-eket detektáltak, melyek nem tartalmaztak fagocitált sejtörmeléket.

A humán thymus IDC-ek identifikálása Brita von Gaudecker és Müller-Hermelink (1980) nevéhez fűződik. A velőállomány “mélyebb” területein szabálytalan sejttaggal rendelkező nagyméretű sejteket találtak, melyeket “nem epithelialis” IDC-eknek neveztek el. További eredmények bizonyítják, hogy a thymus dendritikus sejtek (TDC) Ia<sup>+</sup> (MHCII<sup>+</sup>) és T4<sup>+</sup> (CD4) sejtek, melyek hasonló fenotípussal rendelkeznek, mint a Langerhans sejtek és feltehetőleg ugyanazon sejtvonalhoz tartoznak (Barthélémy és mtsai 1986). A T4 antigén a humán immundeficiencia vírus (HIV) receptor molekulája, amit a Langerhans sejtek is expresszálnak (Patterson és Knight 1987). A Pelletier és mtsai (1986) által izolált TDC-ek citoplazmájában számos szabad riboszómát, jól fejlett endoplazmatikus retikulumot, Golgi komplexet, tubuloalveoláris rendszert és membránnal határolt “sötét, homogén” granulumokat detektáltak. Az ultrastrukturális vizsgálatok során nem találtak phagolysoszómát, tonofibrillumot és desmoszómát a sejtekben. Immuncytokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a TDC-ek



Ia<sup>+</sup>, ATPáz<sup>+</sup>, S100 proteint és vimentin intermedier filamentumot expresszálnak. A makrofágokkal szemben, a TDC-ek észteráz és lysosim negatívak.

Az elmúlt két évtizedben a csirke különböző nyirokszerveiben (bursa, lép, cecalis tonsilla) identifikálták a DC-eket. A bursai DC-eket, melyek citoplazmatikus szerkezete szekrécións jellegre utal, bursai szekrécións DC-eknek (BSDC) nevezték el (Oláh és Glick 1978). Elektronmikroszkópos felvételekkel igazolták, hogy a cecalis tonsilla folliculáris dendritikus sejtek (FDC) elektronsűrű granulumaik alkalmasint lamellált szerkezetet mutatnak (Oláh és Glick 1979).

A LC-ek elkülönítését az epidermiszben lévő sejtektől különböző intermedier filamentumok kimutatása tette lehetővé (DeWaal és mtsai 1984; Löning és mtsai 1982; Mahrle és mtsai 1983). Löning munkacsoportja kimutatta, hogy az epidermiszben található lymphocyták, melanocyták és Langerhans sejtek is vimentint expresszálnak (Löning és mtsai 1982). Ezen tanulmány keltette fel Oláh és mtsai-nak figyelmét arra, hogy hasonlóan a Langerhans sejtekhez a BSDC-ek is hám környezetben találhatóak, ezért feltételezték, hogy a BSDC-ek is expresszálhatnak vimentin intermedier filamentumot (Oláh és mtsai 1992). Későbbi tanulmányaikban bebizonyították, hogy a lép DC-jei (Oláh és Glick 1994) és a cecalis tonsilla FDC-jei (Oláh és mtsai 1995) is vimentin pozitívak.

A madár DC-ek szélesebb jellemzését tesz lehetővé az a csirkespecifikus monoklonális antitest (CVI-ChNL-74.3), amit Jeurissen munkacsoportja állított elő (Jeurissen és mtsai 1992). A 74.3 marker nem csak a lép FDC-jeinek, de a BSDC-ek és a cecalis tonsilla FDC-jeinek karakterizálására is alkalmas (Nagy és mtsai 2004; Nagy és Oláh 2007). A madár lép, cecalis tonsilla és bursa DC-jeit mára már jórészt karakterizálták (Oláh és mtsai 2014), azonban a TDC-ekről egészen máig csak in vitro adat áll rendelkezésünkre. 1984-ben Oliver és Le Douarin izoláltak csirke és fűj thymusból olyan sejteket, melyeket in vitro körülmények között tartva nyúlványos, nem fagocitáló, Ia<sup>+</sup> (MHCII<sup>+</sup>) sejtekként írtak le. Citoplazmájukban Birbeck granulom-szerű struktúrát is kimutattak. In vivo azonban semmilyen adat nem áll rendelkezésünkre a csirke TDC-ekről.

### **2.1.3. A dendritikus sejtek definíciója, sejtfelszíni markerei**

A DC-ek olyan hemopoetikus eredetű antigénprezentáló sejtek (APC), melyek összekötik a veleszületett és a szerzett immunitást. Órszemként végzik feladatukat: kiszűrik a kórokozókat a szervezetből, a naív T sejteket aktiválják, míg az autoreaktív T lymphocytákat ártalmatlanítják, vagyis a negatív szelekció aktív tagjaként állnak helyt. Funkciójukat és fenotípusukat tekintve megkülönböztetünk érett és éretlen DC-eket. Az antigénprezentáció előtt nagyfokú endocitózis és kevés felszíni MHCI és MHCII molekulák expressziója jellemzi a sejtet. A DC-ek érését a baktériumokkal, illetve a virális patogénekkal való találkozás indukálja. Gyulladásos ingerektől az éretlen DC-ek érett DC-ekké alakulnak át, melyeket kezdetben még az alacsony antigénfelvétel jellemez, de ebben az állapotban már képesek stimulálni a T-sejteket. Ezt a folyamatot nagyfokú citoplazmatikus átrendeződés jellemzi, illetve az intracelluláris MHC molekulák antigénnel feltöltődve kikerülnek a sejt felszínére, melyekkel párhuzamosan megjelennek a kostimulációs molekulák (CD80, CD83, CD86) is (Caux és mtsai 1994; Fujimoto és mtsai 2002;). Három laboratóriumnak is sikerült csirke ellenes anti-CD83 ellenanyagot előállítani (Hansell és mtsai 2007; Lee és mtsai 2012; Staines és mtsai 2013). A CD83 mRNS koncentrációját a thymusban, bursában, lépben és cecalis tonsillában találták a legmagasabbnak (Hansell és mtsai 2007), de immunhisztokémiai eljárással is igazolták a CD83<sup>+</sup> sejtek jelenlétét a nyirokszervekben (Hansell és mtsai 2007; Lee és mtsai 2012; Staines és mtsai 2013).

A DC-ek felszínén számos mintázatfelismerő receptor található. Ezek közül az egyik legismertebb a sejtfelszíni Toll-like receptorok (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10), melyek lipopolyszacharidokat (LPS) ismernek fel. Az endoszómális TLR3, 7, 8, 9 leginkább a nukleinsavak felismerésére specializálódtak. Emlősben a TLR7- és 9-nek fontos szerepe van a DC-ek interferon I szekréciójában, illetve a TLR9 szükséges ahhoz, hogy gyulladásos citokineket termelhessenek (Lousberg és mtsai 2011). Csirke csontvelő eredetű éretlen DC-eken is megfigyelték a TLR4 expressziójának növekedését, amennyiben az in vitro kultúrához LPS-t vagy CD40-et adtak, illetve az érett DC-ekben a Toll-like receptor 1-like A (TLR1LA) és TLR15 up-regulációját Wu és Kaiser (2011). A TLR-ok olyan szignalizációs kaszkádot indítanak be, melyek eredményeként gyulladásos citokinek és receptorok (CCR és CXCR) termelődnek, kostimulációs molekulák és chemokinek expresszálódnak (Janeway és Medzhitov 2002; Wu és Kaiser

2011), vagyis elindul az érési folyamat. A humán érett DC-ek legspecifikusabb markere a CD83 (Zhou és Tedder 1996) mellett a DC-lysoszómához asszociált membrán protein (DC-LAMP vagy CD208) (de Saint-Vis és mtsai 1998). Kaiser munkacsoportja a csirke ortológ DC-LAMP-ot (chDC-LAMP) is identifikálta. A lép, bursa és cecalis tonsilla mellett a thymusban is kimutatták a chDC-LAMP mRNS expresszióját (Wu és mtsai 2010a). A DC-ek érése során antigénfelvevő receptorok jelennek meg. Ide tartoznak a membránhoz asszociált C-típusú lektin receptorok (CLRs) (Langerin, DC-SIGN, DEC205 mannóz receptor, Dectin-1) (van Vliet és mtsai 2007). A DEC205 a TDC-ek és a thymus kérgi hámsejtek (cTEC) olyan endocytotikus receptora, melynek szerepe van a szénhidrátok megkötésében is (Jiang és mtsai 1995; Swiggard és mtsai 1995). Staines és mtsai (2013) munkájának köszönhetően a DEC205 csirkében is elérhető marker. A DC-ek végső differenciálódásuk során a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, ahol antigént prezentálnak a naív T-sejtek számára, mellyel beindítják a természetes ölő sejtek (NK) és T-sejtek aktivációját, kialakítják azok toleranciájának küszöbértékét. A Tc-sejtek ölőképessége fokozódik, melyek cytokin termeléssel reagálnak a fertőzésre, míg a B-sejtek ellenanyag termeléssel reagálnak rá. A DC-ek képesek lesznek beindítani az adaptív immunválaszt, éppúgy vezénylői lesznek az antigénspecifikus T-sejt válasznak, mint a humorális immunválasznak is.

#### **2.1.4. A dendritikus sejtek alosztályai**

Az 1990-es években nagy port kavart a különböző szövetekben megjelenő DC-ek osztályba sorolása, ami máig nem rendeződött. A kutatók két részre szakadtak: az egyik tábor a funkciójuk alapján osztályozza a DC-eket, szemben a másik csoporttal, akik a DC-ek plaszticitása alapján sorolja be őket. Bár még ma is meg akarják feleltetni a DC-eket ezeknek a kritériumoknak, azonban a kutatók látóköre szélesebbé vált és a hierarchikus rendszerbe való sorolás elmélete helyett inkább arra koncentrálnak, hogyan fejlődik az adaptív immunitás, az immunológiai memória és ebben milyen szerepe van a DC-eknek. Az újabb eredmények azt mutatják, hogy nem a hovatarozás a fontos, hanem az, hogy hogyan viselkednek a DC-ek az adott szövetben termelt faktorok hatására, vagyis hogyan és mire specializálódik például egy nyirokcsomóba vándorolt DC vagy a thymusban található DC.

Az antigénprezentáló DC-eket a hemopoetikus rendszer tagjaiként tartják

számon. A sejtfelszíni fenotípusuk és funkciójuk variabilitása abban rejlik, hogy milyen szöveti milióban válnak aktív, érett DC-ekké. (Shortman és Caux 1997; Pulendran és mtsai 1999). A legelterjedtebb nézet szerint a DC-eknek a következő nagy populációit különböztetjük meg: a **konvencionális** DC-eket (cDC), **plasmacytoid** DC-eket (pDC), **migráló** DC-eket (mDC) és a **Langerhans** sejteket (Moore és mtsai 2013). Az itt említett csoportok közül a **cDC-ek** és **pDC-ek** lokalizálódnak a primer és a secunder lymphoid szervekben. Az irodalmi adatok szerint a DC-ek vagy lymphoid (Common Lymphoid Progenitor - CLP) vagy myeloid (Common Myeloid Progenitor - CMP) progenitorokból fejlődnek (Wu és mtsai 2001; Kondo és mtsai 2001; Manz és mtsai 2001a, b). A DC-ek **lymphoid**, illetve **myeloid** vonalba való besorolása anatómiai lokalizációjuk, sejtfelszíni fenotípusuk és fejlődési útvonaluk alapján történik (Banchereau és mtsai 1998; Ardavin 1997; Steinman és mtsai 1997, Shortman és mtsai 1998.) A **cDC-ek** csoportjába tartoznak a **lymphoid** és a **myeloid** DC-ek (Moore és mtsai 2013). A **myeloid** DC előalakok a csontvelőből a különböző szervekbe kerülnek, ahol érett DC-ekké fejlődnek. Inaba és mtsai-nak (1993) sikerült kimutatniuk, hogy egér csontvelő eredetű monocytából képes volt differenciálódni makrofág, granulocyta, illetve DC-ek is, amennyiben jelen volt a granulocyta-makrofág colonia-stimuláló faktor (GM-CSF) is. Hasonló eredményeket találtak más kutatók is, akik CD34<sup>+</sup> humán csontvelő prekurzorból olyan CD1a<sup>-</sup> monocyta populáció, granulocyta-prekurzor populáció és olyan bipotens prekurzor populáció képződött, amiből GM-CSF és tumor nekrozis faktor (TNF)  $\alpha$  hozzáadásával érett DC-ek fejlődtek. Amennyiben makrofág-colonia-stimuláló faktort (M-CSF) tartalmazott a tenyészet, makrofágok képződtek (Reid és mtsai 1992; Szabolcs és mtsai 1996; Caux és mtsai 1996). A DC-ek myeloid eredetére további bizonyíték áll rendelkezésünkre, miszerint in vitro körülmények között GM-CSF és interleukin (IL) 4 jelenlétében a monocyták képesek DC-ekké alakulni (Romani és mtsai 1994; Sallusto és mtsai 1994; Akagawa és mtsai 1996; Kiertscher és mtsai 1996; Pickl és mtsai 1996). Wu és mtsai (2010b) áttörést értek el a csirke DCek tenyésztése során. Vöröscsontvelő sejteket izoláltak, majd GM-CSF és IL4 jelenlétében tenyésztették tovább. Az így kifejlődött sejtek MHCII<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD1.1<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD205<sup>-</sup> voltak. Az érést LPS-dal vagy CD40L-el indukálták, melynek során a CD40, CD1.1, CD86, CD83 és DEC205 molekulák expressziója fokozottá vált. A sejtek nem csak fenotípusuk alapján sorolhatóak be a DC-ek osztályába, de

funkcionálisan is megfelelnek az előírt kritériumoknak.

Az 1990-es évek elején Ardavin laboratóriumának sikerült először fényt derítenie a DC-ek **lymphoid** mivoltára. Besugarazott egerekbe tarszplántáltak intrathymikus lymphoid vonal sajátosságaival rendelkező  $CD4^{low}$  prekursorokat, melyekből a recipiens állatban T sejtek és  $CD8^{+}$  TDC-ek is differenciálódtak (Ardavin és mtsai 1993; Wu és mtsai 1995). Pár évvel később újabb eredmények kerültek napvilágra, miszerint ha ugyanezen lymphoid prekursorokat intravénásan injektáltak egereknek a lépben  $CD8^{+}$  és  $CD8^{-}$  DC-ek is megjelentek (Martín és mtsai 2000; Wu és mtsai 2001). Habár a  $CD8\alpha$  jelenléte a DC-eken lymphoid eredetre utal, ennek ellenére Traver munkacsoportja bebizonyította, hogy a  $CD8\alpha^{+}$  és  $CD8\alpha^{-}$  DC-ek is fejlődhetnek CMP-ből mind a thymusban, mind pedig a lépben (Traver és mtsai 2000; Wu és mtsai 2001). Vagyis alátámasztotta a progenitor sejtek plaszticitását.

Mindezen eredményeket összevetve kijelenthetjük, hogy valamennyi DC alpopuláció differenciálódhat CLP-ből és CMP-ből is (Liu és Nussenzweig 2010; Manz és mtsai 2001b), ami azok fejlődési flexibilitását tükrözi.

A **pDC**-eket korábban plazmacytoid T-sejteknek, illetve plazmacytoid monocytáknak nevezték. Citoplazmájuk nagy részét jól fejlett durvafelszínű endoplazmás retikulum (DER) jellemzi. A pDC-ek a vírusok detektálásában kapnak fontos szerepet a TLR7 vagy TLR9 által (Eckert és Schmid 1989; Siegal és mtsai 1999). Ezt bizonyítja az is, hogy I. típusú interferont (IFN) termelnek (Shortman és Liu 2002).

### **2.1.5. A dendritikus sejtek és a makrofágok fejlődésének útvonalai**

A DC-ek az immunrendszer azon sejtjei, melyek antigenprezentációra specializálódtak. A kutatók közül sokan úgy gondolják, hogy e sejtek fejlődési útvonala, differenciálódása és funkciója teljes mértékben eltér a makrofágok populációjától, ellentétben azokkal a kutatókkal, akik szerint a két sejt eredete nem áll oly távol egymástól. Amikor Steinman és Cohn felfedezték a DC-eket, olyan sejteket írtak le, melyek nyirokszövetben lokalizálódnak, feladatuk az antigénprezentáció a naív T-sejtek számára és azok nem fagocitálnak (Steinman és Cohn 1973; Banchereau és Steinman 1998; Steinman és mtsai 1999). Ugyanakkor a makrofágok olyan sejtek, melyek nem migrálnak, szövetspecifikusak és alapvetően nem prezentálnak antigént. Proteolitikus és

katabolikus aktivitásuknak köszönhetően eltakarítják a sejtes törmelékeket és megemésztik a patogéneket (Murray és Wynn 2011). Mára már sokak számára egyértelmű, hogy az embrionális korban kialakult makrofágok a szikzacskóból származnak (Hashimoto és mtsai 2013), azonban azoknak a makrofágoknak az eredete és kapcsolata a DCs-ekkel, melyek a csontvelői hemopoetikus őssejtekből (HSC) indulnak fejlődésnek, máig sem tisztázott. Mind a DC-ek, mind pedig a makrofágok képződését különböző növekedési faktorok indukálják. A mononukleáris phagocita rendszer (MPS) tagjaként számon tartott makrofágok kialakulásához elengedhetetlen a colonia stimuláló faktor-1 (CSF-1) (Hume 2008a, b). Más kutatók eredményei hasonló adatokról számolnak be, miszerint a makrofágok fejlődéséhez nélkülözhetetlen a GM-CSF, míg az érett DCs kialakulásához ez a faktor nem szükséges (Witmer-Pack és mtsai 1993; Saunders és mtsai 1996). A DC-ek eredetéről, prekursorairól eddig alkotott dogmát azonban megdőnteni látszott, amikor Inaba laboratóriumának sikerült vöröscsontvelői sejtekből GM-CSF hatására DC-eket tenyészteni (Inaba és mtsai 1993). A CSF-1 és a CSF-1 receptor (CSF-1R) mutációja következtében a DC-ek és azok prekursorainak képződése szignifikánsan lecsökken, illetve mind az éretlen, mind pedig az érett DC-ek is expresszálják a CSF-1R-t (Garcia-Morales 2014; Geissmann és mtsai 2008; MacDonald és mtsai 2005). A DC-ek működéséhez esszenciális követelmény az Flt-3 tirozin kináz receptor ligandja (Flt-3L), szemben a makrofágokkal (D'Amico és Wu 2003; McKenna 2001).

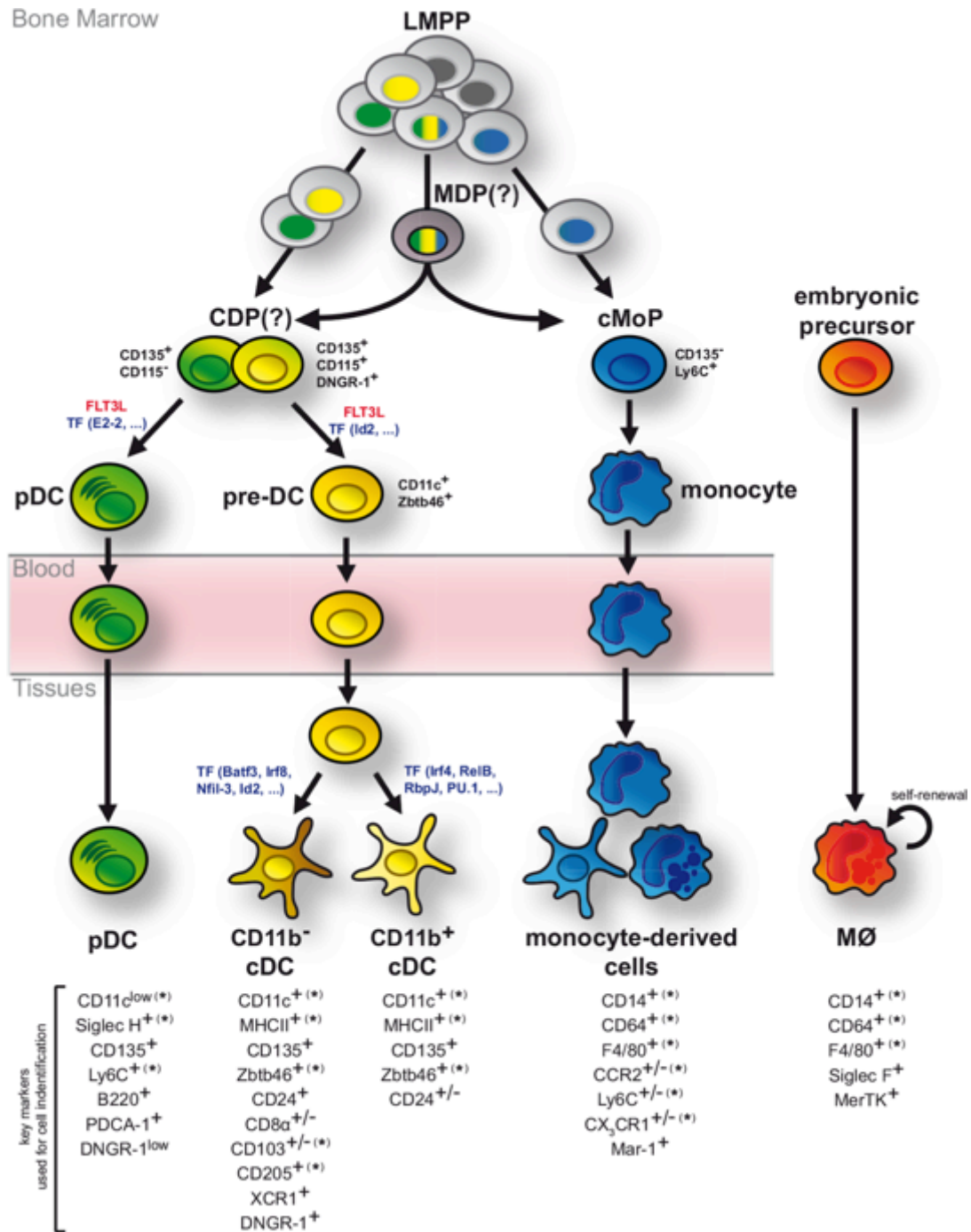
Egy másik hipotézis szerint a CMP-ből olyan bipotens progenitor képződik, melyből csak makrofágok és DC-ek alakulhatnak ki (MDP) (Fogg és mtsai 2006). Ezt követően a két sejtpopuláció (DC-ek és makrofágok) fejlődése egymástól függetlenül zajlik. Kialakul a közös DC-ek progenitora (CDP), amiből majd a későbbi pDC-ek és cDC-ek differenciálódnak (Naik és mtsai 2007; Onai és mtsai 2007). A másik ágon, közvetlenül a MDP-ből monocyták képződnek, melyekből a szövetekben úgynevezett monocyta eredetű vagy DC- vagy makrofágszerű sejtek formájában öltenek végleges alakot (Poltorak és Schraml 2015) (1. ábra).

Amennyiben azokat a sejteket tartjuk DC-eknek, melyek antigént prezentálnak, akkor az alábbi eredmények alapján meg kell fontolnunk, hogy mely sejteket sorolhatjuk e csoportba. Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy a humán monocyta eredetű APC-ek megőrizték azon képességüket, miszerint CSF-1 hatására képesek

magukat visszaprogramozni makrofágokká, illetve a monocyta eredetű makrofágok is tudnak antigént prezentálni (Häusser és mtsai 1997; Lo és mtsai 2007; Palucka és mtsai 1998; Robinson és mtsai 1999).

Az antigénprezentáció kimutatásánál azonban sokkal egyszerűbbnek tűnt a sejtek identifikálása a különböző markerek segítségével. Az egér rendszerben működő egyik ilyen népszerű marker a CD11c integrin (Metlay és mtsai 1990), melyről úgy gondolták, hogy egyértelmű indikátora a DC-eknek, illetve szerepe van a T-sejt aktivációban. Ennek ellenére egy tíz évvel későbbi publikációban olvashatjuk, hogy a CD11c-t, mint endocytotikus receptort számos sejt felszínén megfigyeltek: makrofágok, DC-ek, granulocyták és T-sejtek. Funkcionálisan nincs közvetlen szerepe a T-sejt aktivációban (Hume 2008a; 2008b).

Tézisemnek nem témája a nem lymphoid eredetű DC típusok elkülönítése, illetve az egyes DC-alpopulációk eredetének és funkciójának ismertetése. Munkám a madár thymus DC-jeinek identifikálására és karakterizálására koncentrál.



**1.ábra.** A DC-ek és makrofágok fejlődési útvonala. A vöröscsontvelőben lévő lymphoid multipotens progenitorok (LMPP) sejtjeiből egymástól független útvonalon kialakul a közös monocyta progenitor (cMoP) és a közös DC progenitor (CDP). A LMPP-ok közül létrejöhet egy bipotens makrofág és DC progenitor (macrophage and dendritic cell progenitor-MDP), mely képes lehet differenciálódni CDP-rá és cMoP-rá is. A CDP-ből kialakuló pDC-ek már a vörös csontvelőben kifejlődnek, ellenben a CD11b<sup>-</sup> vagy CD11b<sup>+</sup> cDC-ekkel, melyek majd csak a célszervekben érik el terminális differenciációjukat. Fejlődésüket különböző transzkripciós faktorok (TF) irányítják (kék színnel jelölve). A cMoP-ből kialakuló monocyta a szövetekben tovább differenciálódhatnak DCs-ké vagy makrofágokká. A legtöbb szöveti makrofág képes az ún. embrionális prekursorból kialakulni, melyek önmegújító programmal rendelkeznek. A CDP és cMoP fejlődési ágak nyomkövetését, illetve az egyes alpopulációk elkülönítését a sejt felszíni markerek (CD135, DNGR-1, Ly6c stb.) teszik lehetővé. MØ- makrofág. *Poltorak és Schraml 2015 nyomán.*



### **2.1.6. A thymus dendritikus sejtek funkciója és szerepük a centrális tolerancia kialakításában**

A TDC-ek dinamikus hálózatként szövik be a thymus velőállományát, ahol központi szerepet töltenek be a naív T-sejtek érési folyamatában. A T-sejtek - DC-ek szoros kapcsolata révén, rozettákat alakítanak ki, egy-egy TDC-hez akár 10-15 T-sejt is kapcsolódhat (Kyewski és mtsai 1982; Shortman és mtsai 1991). A véráramban található DC-ekkel szemben képesek a saját antigén prezentálására is, így potenciális képviselőivé válnak az autoreaktív T-sejtek negatív szelekciójának (Brocker és mtsai 1997; Vandenabeele és mtsai 2001). Azt azonban, hogy mekkora szerepet töltenek be e folyamatban igen nehéz monitorozni, hiszen a DC-eken kívül a velőhámsejtek (mTEC), B-sejtek és a makrofágok is képesek bemutatni a saját MHC-t és ezáltal indukálni a negatív szelekciót (Webb és Sprent 1990; Farr és Rudensky 1998; Klein és mtsai 1998; Kleindienst 2000; Perera és Huang 2015; Yamano és mtsai 2015a, b).

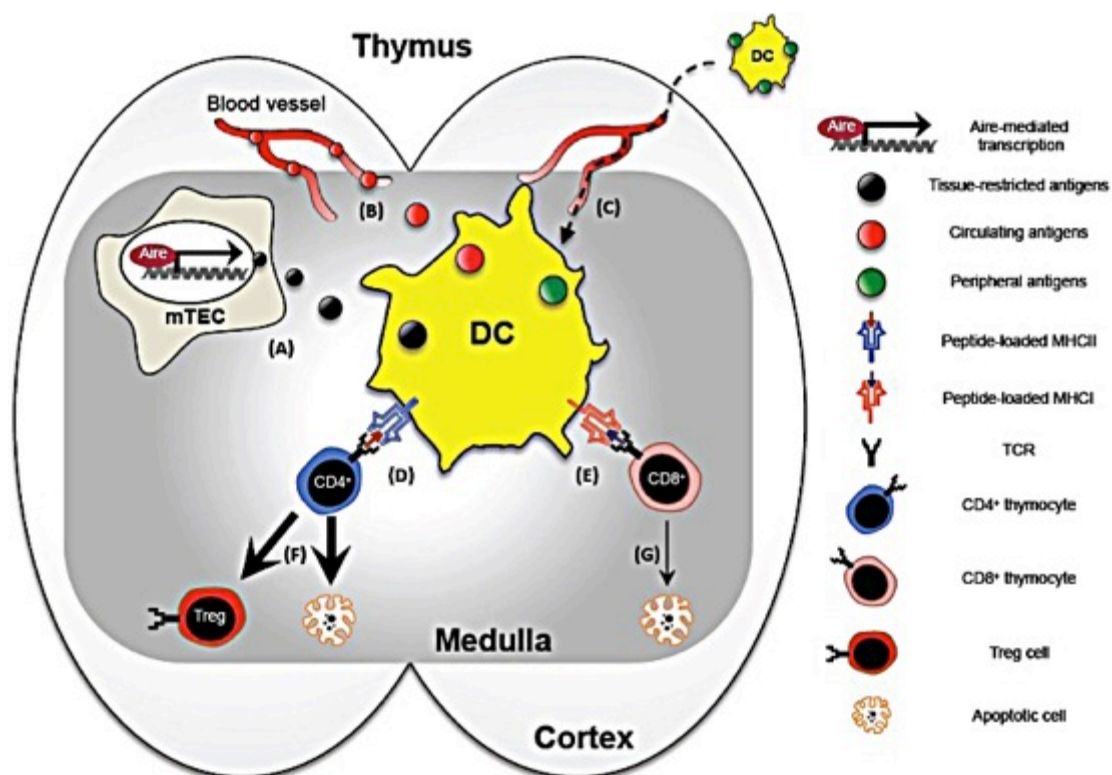
A DC-ek, mint hivatásos APC-ek többféle módon is megszerezhetik az antigéneket, melyeket a velőállományba érkező T-sejteknek mutatnak be (2. ábra):

1. antigént kaphatnak a mTEC-ektől. A mTEC-ekben más szervekre jellemző szövetspecifikus antigéneket (TRA) is kifejeződésre kerülhetnek az úgynevezett **AutoImmune REgulator** (AIRE) kontrollja alatt. Az AIRE azon túl, hogy részt vesz a mTEC-ek differenciálódásában, irányítja a különféle szervek génexpresszióját, majd a TRA-ek bemutatását a mTEC-ek MHCII molekulája révén. Az antigénprezentáció végbemehet makroautofágiával (Münz 2008; Nedjic és mtsai 2008) is vagy akár a mTEC-ek és DC-ek között végbemenő antigéntranszfer közvetítésével is (Oh és Shin 2015; Koble és Kyewski 2009). A TRA-eket vagy olyan T-sejteknek prezentálják, melyek autoreaktív TCR-rel rendelkeznek, vagy exoszómákba csomagolva (Skogberg és mtsai 2013), MHCII komplexen keresztül mutatják be az egyszerűen pozitív T-sejteknek, vagy pedig a DC-eknek továbbítják (Sheridan és Gray 2015). Azok a T-sejtek, melyek felismerik a bemutatott fehérjéket elpusztulnak vagy regulátoros T-sejtté (Treg) érnek, melyek szerepet kapnak a perifériás immunszuppresszióban (Aichinger és mtsai 2013; Aschenbrenner és mtsai 2007; Koble és Kyewski 2009). A CD4 és CD25 sejtfelületi molekulákat kifejező Treg-sejtek képződésében és szuppresszív funkciójuk fenntartásában szerepe van a forkhead box P3 (FoxP3) transzkripciós faktornak (Chai és mtsai 2005). A Hassall testek (HT) Thymus Stromal Lymphopoietin (TSLP) citokint

termelnek, ami a DC-ekben CD80/86 expressziót, a Treg-sejtekben pedig a FoxP3 transzkripciós faktor expressziót indukál (Hanabuchi és mtsai 2010; Watanabe és mtsai 2005). Vagyis a HB-eknek közvetett szerepe van a Treg sejtek képződésében.

2. Szabadon áramló vér eredetű antigént is képesek bemutatni (Atibalentja és mtsai 2009; 2011). Signal regulator protein  $\alpha$  (Sirp  $\alpha$ ) pozitív DC-ek a kéreg-velő határon lokalizálódnak, a perivasculáris térben, kisebb erek körül (Baba és mtsai 2009).

3. A periférián lévő, felderítést végző Sirp  $\alpha^+$  DC-ek és pDC-ek a thymusba érve antigént prezentálnak a T-sejteknek. Amennyiben olyan “gyöngyöket” injektáltak intravénásan, illetve subcutan egerekbe, melyek túl nagyok voltak ahhoz, hogy a thymust ellátó erekben keresztül penetráljanak, a Sirp  $\alpha^+$  DC-ekben és a pDC-ekben is kimutathatóak voltak a “gyöngyök”, vagyis a periférián lévő DC-ek a thymusba vándoroltak (Hadeiba és mtsai 2012).



**2.ábra.** A DC-ek antigén felvétele és bemutatása. (A) A mTEC-ek az AIRE mediálta TRA-eket mutatnak be a DC-eknek. (B) A vérárammal a thymusba jutó keringő és a (C) a periférián megszerzett antigéneket a DCs képesek direkt módon felvenni. (D) Az antigének bemutatása az MHCII molekulán keresztül történik a CD4<sup>+</sup> T-sejteknek, míg (E) a CD8<sup>+</sup> T-sejteknek az MHCI molekula közvetítésével prezentálják. (G-F) A bemutatott fehérjéket felismerni képes T-sejtek vagy elpusztulnak apoptózissal, vagy Treg-sejtté alakulnak. Oh és Shin 2015 nyomán.

### **2.1.7. A thymus dendritikus sejtek prekursorai és azok fejlődési útvonalai**

Az egér thymusban található DC-ek legnagyobb részét a **cDC**-ek képezik és a sejtek csak egy kicsiny hányadát jelenti a **pDC**-ek (Ardavin és mtsai 1993; Luche és mtsai 2011; Moore és mtsai 2013, Schlenner és Rodewald 2010). A **cDC**-eket a CD8 molekula expressziója alapján további két csoportot identifikáltak: 1; a nagyobb számban előforduló **lymphoid**  $CD8 \alpha^+$  **cDC**-ek és 2; a **myeloid**  $CD8 \alpha^{-low}$  **cDC**-ek. Az utóbbi alosztály felszínén azonosították a SIRP  $\alpha$ -t, illetve kimutatták a CD11b mérsékelt expresszióját is (Proietto és mtsai 2009), ami megfeleltethető az egér lépben található SIRP  $\alpha^+$  DC alpopulációval. Azonban az még máig sem tisztázott, hogy a  $CD8^-$  SIRP  $\alpha^+$  TDC altípus, vajon egy speciális a thymuson belül fejlődő csoport, avagy a perifériáról érkező DC-ek tagjaként jegyezhető. Az egér thymus pDC-ek inkább kerekesebb, a plazma sejtekre emlékeztető morfológiával rendelkeznek. Aktiváció hatására érési folyamaton mennek keresztül, DC-alakot öltenek (Okada és mtsai 2003).

Humán thymusban három TDC populációt írtak le: 1; a legnagyobb számban előforduló **pDC**-ek ( $HLA-DR^{int}CD123^-CD11c^-$ ) 2; **myeloid éretlen DC**-ek ( $HLA-DR^{int}CD123^-CD11c^+$ ) 3; **myeloid érett DC**-ek ( $HLA-DR^{int}CD123^-CD11c^{high}$ ), melynek további két alcsoportja ismert a CD11b pozitivitás alapján (Evans és mtsai 2008; Papoudou-Bai és mtsai 2012). A **pDC**-ek mind a kéregállományban, mind pedig a velőállományban előfordulnak (Vandenabeele és mtsai 2001). Funkciójukat tekintve csak feltételezéseket lehet találni az irodalomban, de valószínűsíthetően szerepet kapnak a virális fertőzések elleni védekezésben, amit a kutatók az IFN- $\alpha$  termelésükkel hoznak összefüggésbe. Egy másik elképzelés szerint a pozitív szelekció háttér-vezénylői lehetnek, ami a strómális sejtek felszínén lévő MHC I molekulák mennyiségének IFN kiváltotta megnövekedésével hozható kapcsolatba (Keir és mtsai 2002). Egy olyan alternatív elmélet is létezik, ami azt vallja, hogy a thymust elhagyva a perifériára kerülnek, belépnek a másodlagos nyirokszövetekbe és részeseivé válnak a szerzett immunválasznak (Fohrer és mtsai 2004). A **myeloid éretlen DC**-ek a velőállományban és a kéreg-velő határon lokalizálódnak (Lafontaine és mtsai 1997; Res és mtsai 1999; Vandenabeele és mtsai 2001; Schmitt és mtsai 2007), illetve analógiát mutatnak a periférián lévő  $CD11c^+$  érett DC-ekkel (Bendriess-Vermare és mtsai 2001). Feladatuk az auto-reaktív T-sejtek eliminációja (Brocker és mtsai 1997). A TSLP-nel stimulált

éretlen DC-ek in vitro körülmények között érett DC-ekké differenciálódtak (TSLP-DC-ek) (Vandenabeele és mtsai 2001; Watanabe és mtsai 2005). In vivo a TSLP-t a HB-ek termelik (Watanabe és mtsai 2005). A TSLP-DC-ek a velőállomány centrális részében találhatóak, közel a HB-ekhez. Ez a topográfiai viszony arra enged következtetni, hogy a TSLP-DC-ek közreműködnek a DC-ek által mediált központi toleranciában, illetve szerepet kaphatnak a pozitív szelekcióban is (Watanabe és mtsai 2005). **A myeloid érett DC-ek** olyan chemokineket termelnek a velőállományban, melyekkel a T-sejtek “homing”-ját koordinálják (Soumelis és mtsai 2002; Vicari és mtsai 1997).

A szöveti és vérben lévő DC-ekkel szemben a humán TDC-ek prekurzorai fejlődhetnek **extra- és intrathymikusan** is (Weijer és mtsai 2002). Ardavin laboratóriumának sikerült kimutatnia (1993), hogy az egér TDC-ek és a T-sejtek **közös prekurzorból** differenciálódnak a thymus állományán belül, amit később több munkacsoport is igazolt (Bell és Bhandoola 2008; Corcoran és mtsai 2003; Wada és mtsai 2008). Azonban számos olyan humán eredmény is rendelkezésünkre áll, miszerint a még **nem elkötelezett prekurzorokból** T-sejtek, B-sejtek, NK-sejtek és végül DC-ek is differenciálódtak (Wu és mtsai 2005; Res és mtsai 1996). In vitro humán tenyészetben CD34<sup>+</sup> prekurzorból DC-ek fejlődtek, habár a pDC-ek jelenlétét nem tudták igazolni (Dalloul és mtsai 1999; Kelly és mtsai 2001). Az úgynevezett thymus korai prekurzorok közül 4 csoport ismert egér rendszerben: 1; korai T-sejt prekurzor 2; dupla negatív (DN) 1c prekurzor 3; DN1d prekurzor és 4; DN1e prekurzor, melyek mindegyikéből fejlődhet TDC intrathymikusan, in vivo (Moore és mtsai 2013).

## 2.2. A THYMUS ORGANOGENEZISE

A madár thymus a nyak bőre alatt, két oldalt, a vena jugularist átfonó kötőszövetbe ágyazottan helyezkedik el (Kendall 1980). Ovális, lapos lebenyekből álló láncot alkot, amelyek a fejtől a mellkas bejáratáig egymás mögött helyezkednek el. A lebenyek száma tyúokban 6–8; kacsában és galambban 5–6 darab. A madarak thymusának hámtelpe a harmadik és negyedik garattasak ventrális részéből fejlődik (Dieterlen-Lièvre és Le Douarin 2004; Le Douarin 1967; Le Douarin és mtsai 1984; Neves és mtsai 2012).

Fejlődésének eredetéről különböző elméletek születtek. Hammond (1954) úgy gondolta, hogy a garattasak endodermájával érintkező ectoderma indukálja a thymus strómájának kialakulását. Ezt az elméletet (“dual origin”) követték Cordier és mtsai is, akik szerint a cTEC-ek az ectodermából származnak, míg a mTEC-ek az endodermából (Cordier és Heremans 1975; Cordier és Haumont 1980). Mára már általánosan elfogadottá vált az úgynevezett “single origin” modell, miszerint az ectoderma nem járul hozzá sem az emlős, sem pedig a madár thymus kialakulásához. (Le Douarin és Jotereau 1975; von Gaudecker és Müller Hermelink 1980; Röpke és mtsai 1995; Gordon és mtsai 2004). Az endoderma hámja a vena jugularis közelében, sarjadzó hámkötegeket képez, amelyek összeköttetése a garattasakkal a keltetés 5–6. napján megszűnik (Ackerman és Knouff 1964; Venzke 1952). Az endodermális hámtelep több részre tagolódik és a későbbiekben ezek a részek adják a nyak két oldalán elhelyezkedő lebenyek hámtetikulumát. A TEC-ek által kialakított három dimenziós hálózatot hemopoetikus eredetű lymphoid progenitor sejtek kolonizálják a fejlődés 6,5. napján (Le Douarin és Jotereau 1975).

A funkcióképes thymus kialakulásához az endoderma és a hemopoetikus sejtek mellett a mesenchyma elengedhetetlen szerepét már 1960-ban Auerbach egéren végzett megfigyelései is alátámasztották. Az epithelialis primordium csak mesenchymális sejtek co-kultúrájában fejlődött tovább. Ganglionléc eredetű sejtek (NCC) hiányában a thymus nem fejlődött ki vagy mérete zsugorodott (Jiang és mtsai 2000; Yamazaki és mtsai 2005). LeDouarin csirke-fürj in vivo garattasak kiméra kísérletei is bizonyították, hogy a funkcionálisan jól működő, hemopoetikus sejtek által kolonizálható thymus kialakulásához a mesenchyma interakciójára is szükség van (Le Douarin 1967; Le Douarin és Jotereau 1975). Le Douarin (1967) beszámol arról is, hogy csak abban az

esetben alakult ki funkcionálisan érett thymus, amennyiben a 3-4. garattasak endoderma további fejlődését somatopleura vagy splanchnopleura eredetű ún. “megengedő” mesenchyma indukálta. Vagyis a TEC-ek differenciálódásához elengedhetetlen feltétel a mesenchyma indukciója (Itoi és mtsai 2007; Jenkinson és mtsai 2007; Neves és mtsai 2012), mint ahogyan az is, hogy a TEC-ek későbbi fejlődéséhez a T-sejtektől származó szignálok szükségesek (Klug és mtsai 2002; Rossi és mtsai 2007). A platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)  $\alpha$  a craniális NCC-eken expresszálódik (Morrison-Graham és mtsai 1992), vagyis a thymus mesenchymális sejtein is kimutatható (Jiang és mtsai 2000). Jelenlétük feltétlenül szükséges a TEC-ek proliferációjához és a thymus körüli mesenchyma kialakulásához (Yamazaki és mtsai 2005; Jenkinson és mtsai 2007). A fibroblast growth factor (Fgf) 7 és 10 is befolyásolja a thymus epithelium morphogenezisét (Jenkinson és mtsai 2003). Patch mutáns (PDGFR  $\alpha$  mutációja) egerekben a mesenchymális sejtek defektusát mutatja a Fgf7 és a Fgf10 mRNS szint csökkenése és emellett thymus sem formálódik (Itoi és mtsai 2007). Madáron és emlősön végzett kísérletek eredményei is bizonyítják, hogy a tok, sövények, a pericyták és a simaizom sejtek az ectomesenchymális eredetű ganglionlécből (NC) formálódnak (Bockman és Kirby 1984; Foster és mtsai 2008; Jenkinson és mtsai 2003, 2007; Le Douarin és Jotereau 1975; Le Lièvre és Le Douarin 1975; Müller és mtsai 2008; Noden 1978, 1983). Bockman és Kirby (1984) voltak a ganglionlécirtás úttörői. Az abláció athymiát vagy a thymus méretének csökkenését idézte elő, ami a NC esszenciális szerepét bizonyítja (Bockman és Kirby 1984, 1985; 1989; Kuratani és Bockman 1990 a, b, 1991).

A thymus korai fejlődését különböző morfogén faktorok és szignalizációs molekulák befolyásolják. Ezek közül madár embrióban az egyik legkorábban (4. embrionális napon) megjelenő a forkhead box transzkripciós családba tartozó Foxn1 molekula, ami a harmadik garattasak ventrális részén expresszálódik (Neves és mtsai 2012; Darnell és mtsai 2014). Feladata a TEC-ek proliferációjának és differenciációjának irányítása (Gordon és mtsai 2001; Nowell és mtsai 2011). Működéséhez hozzájárulnak a bone morphogenic protein (Bmp), Fgf, sonic hedgehog (Shh), wingless-int (Wnt) szignalizációs molekulák. A mesenchymában expresszálódó Bmp4 molekulának fontos szerepe van az endoderma-mesenchyma interakcióban. Csirke-fürj kimérákon végzett kísérletekkel kimutatták, hogy amennyiben a 3-4.

garattasak endodermáját a Foxn1 expresszió kezdete előtt (3. embrionális nap előtt) transzplantálták “megengedő” mesenchyma környezetébe, fejlett és kolonizálható thymus képződött (Neves és mtsai 2012). Neves eredményei arra engednek következtetni, hogy a mesenchymában termelődő Bmp4 indukálja az endodermában a Foxn1 expresszióját, vagyis a két szövet szoros együttműködése teszi lehetővé a garattasakok további fejlődését. Nem csak egérben (Tsai és mtsai 2003), de madárban is sikerült monitorozni, hogy a thymus organogenezisét az Fgf10 is szabályozza, mely megjelenését a Bmp4 regulálja (Neves és mtsai 2012). A francia kutatócsoport arról is beszámol, hogy bár a Bmp4 és az Fgf10 először a mesenchymában detektálható, azonban a fejlődés későbbi szakaszában az endodermában is expresszálódnak (Neves és mtsai 2012). A Bmp4 antagonistája a Noggin szignalizációs molekula. In vitro szövetkultúrában a 2,5 napos fürj embrió 3-4 garattasak endodermát, olyan mesenchymával tenyésztettek tovább, amibe Noggin-nal átitatott bead-et tettek. Két nappal később nem lehetett kimutatni a Foxn1 expresszióját. Ha ugyanezt a kísérletet 3 napos fürj embrió szöveteivel végezték, a Foxn1 transzkriptum hiba nélkül átíródott (Neves és mtsai 2012). Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a Foxn1 megjelenéséhez szükséges a Bmp4, azonban a fejlődés későbbi stádiumában expressziója független a Bmp4 koncentrációtól.

Foxn1<sup>null</sup> és Foxn1<sup>Δ</sup> mutáns egerekben a TEC-ek differenciálódásában defektus volt kimutatható és a lymphocita progenitor sejtek sem kolonizálták a thymust. A kéreg-velő határt nem lehetett identifikálni és a TEC progenitor (TEPC) stádiumban megrekedt (Nehls és mtsai 1996; Su és mtsai 2015).

### **2.2.1. A thymus hámsejtek és progenitoraik jellemzése**

A TEC-ek identifikálására alkalmas módszer a cytokeratin (K) intermedier filamentumok (KIF) kimutatása. Az epithel sejtekre jellemző KIF proteinek közül megkülönböztetünk savas (I.típus: K9-K23) és bázikus (II.típus: K1-K8 és K71-K80) csoportot (Odaka és mtsai 2013). A KIF-ok megjelenési formái egy adott sejtvonal jellemző indikátorai lehetnek. A TEC-ek fenotípusát és funkcióját figyelembe véve megkülönböztetünk cTEC-eket és mTEC-eket. Az egér cTEC-ekben K8 és K18 expresszálódik, míg a velőállományban kétféle mTEC-ek populációról számoltak be:

1. a nagyobb számban előforduló **K5<sup>+</sup>K14<sup>+</sup> csillag** alakú sejtek csoportja, melyek **Ia<sup>+</sup>** (MHCII) és

2. **K8<sup>+</sup> kerek** morfológiájú populáció, melyek **Ia<sup>-</sup>** (Farr és Anderson 1985; Klug és mtsai 1998; Surh és mtsai 1992; Lee és mtsai 2011; Odaka és mtsai 2013).

Az immuncytokémiai karakterizálás mellett elektronmikroszkópos szinten is sikerült elkülöníteni a mTEC-ek további típusait:

1. nem differenciálódott, éretlen, blastoid típusú epithel sejtek

2. nagyméretű epithel sejtek, melyek citoplazmájában számos szerkréciós vakuolát figyeltek meg, illetve a velőállományban található cystákat alkotó sejtek között is megtalálhatóak és

3. kisméretű, orsó alakú epithel sejtek jól fejlett cytokeratin kötegekkel (Milićević és mtsai 2008).

A humán thymus hámsejtjeiben is megfigyelhető a K8 és a K18, de mellettük megjelenik a K19 is, amit a mTEC-ekben is detektáltak (Shezen és mtsai 1995). A KIF-ok már a TEPC-ekben is kimutathatóak az embryogenezis és a thymus esetleges regenerációjakor (Lee és mtsai 2011). Cyclophosphamid indukálta acut involúciót követően a thymus regenerációja során a kéreg-velő határon K5<sup>+</sup>K8<sup>+</sup> TEPC-ek jelennek meg, melyekből a K8<sup>+</sup>K5<sup>-</sup> cTEC-ek differenciálódnak (García-Ceca és mtsai 2009; Klug és mtsai 1998; 2002). Ugyanakkor a K8 deficiens egerekben a cTEC-ek és a mTEC-ek is aberráns fejlődést szenvedtek (Odaka és mtsai 2013). A T-sejtek érési, differenciálódási folyamataihoz szükséges mikro környezet kialakításában a makrofágok és DC-ek mellett releváns szerepet kapnak a TEC-ek. A TEC-ek fejlődéséhez nem csak a hámsejt-hámsejt, illetve hám-mesenchyma interakció szükséges, de a T-sejt-hámsejt szoros kapcsolata is lételem a TEC-ek differenciálódásának. Minden olyan esetben, ahol a thymocyták érése blokkolva van (Rodewald 2008), a TEPC-ek nem képesek befejezni differenciációs programjukat. A kéreg-velő kompartmentalizáció zavart szenved. Habár a korai TEC-mintázat kialakulása, a keratin expresszió megjelenése független a hemopoetikus sejtektől eredő szignáloktól, azonban a TEC alosztályok későbbi elkülönüléséhez a thymocyták által közvetített jelek nélkülözhetetlenek (Klug és mtsai 2002; Rossi és mtsai 2007; Shakib és mtsai 2009).

A csirke thymus hámretikulumát feltérképező kutatócsoportok olyan területeket határoztak meg a velőállományban, ahol nem lehetett kimutatni cytokeratin expressziót

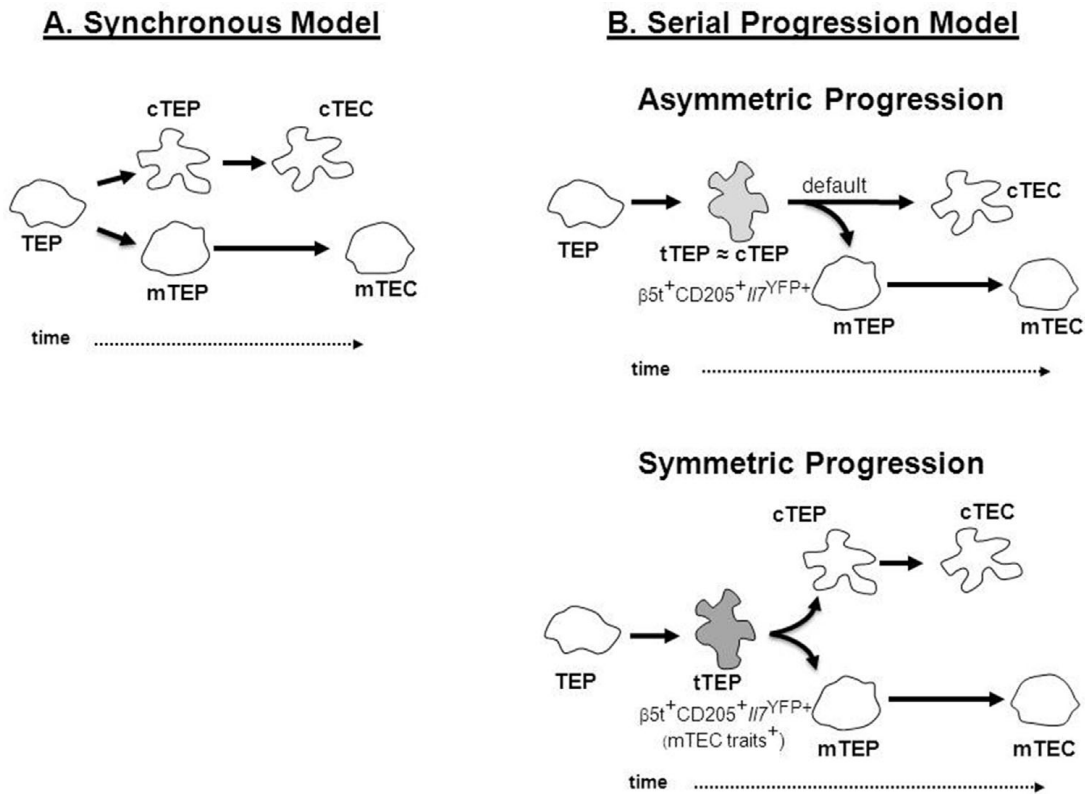


(Boyd és mtsai 1992; Guillemot és mtsai 1984; Minkó és Oláh 1996). Ezeket madárban keratin negatív területnek (KNA) nevezték el (Boyd és mtsai 1992). Vemhes egerek thymusában olyan “gyűrűt” (medullary epithelial rings) írtak le, ahol hiányoznak a hámsejtek és a gyűrű centrális részén egy központi ér lokalizálódik, amit fibroblastok és kötőszövet övez (Clarke és mtsai 1994). Az Eph és Ephrin szignalizáció is befolyásolja a thymus hámretikulumának fejlődését és organizációját. EphB és ephrin-B deficiens egerekben a thymus epithelium egy mesenchymális transzformáción megy keresztül (García-Ceca és mtsai 2015). Megnö a cysták száma, a hám “összeseik” és nagy, hámsejt mentes területek jelennek meg (Cejalvo és mtsai 2015). Habár a TEC-ek és a mesenchyma interakciója általánosan elfogadott tény, ennek ellenére az máig tisztázatlan maradt, hogy mi a KNA eredete és funkciója.

A TEC-ek eredetéről eltérő nézetek alakultak ki, hiszen sokáig úgy vélték, hogy a cTEC-ek egy ectodermális, míg a mTEC-ek egy endodermális őssejtből fejlődnek (Cordier és Haumont 1980; Cordier és Heremans 1975). Eredetüket visszavezetik az úgynevezett unipotens progenitorokra, miszerint a cTEC-ek és a mTEC-ek is külön útvonalon, egymástól függetlenül fejlődnek (Bleul és mtsai 2006). Ezzel szemben számos tanulmányon keresztül olvashatunk arról, hogy a két sejtpopuláció (cTEC-ek és mTEC-ek) az endodermából indul el a fejlődés útján (Wallin és mtsai 1996). A legelfogadottabb elmélet szerint a cTEC-ek és a mTEC-ek ugyanazon bipotens progenitorokból képződnek (Bleul és mtsai 2006; Rossi és mtsai 2007; Shakib és mtsai 2009; Zhang és mtsai 2007). Természetesen számtalan kísérleti tanulmány írodott a további lehetséges progenitor-elméletekről. Számos kutatócsoport beszámol az individuális cTEC-ek és mTEC-ek progenitorok létéről (Hamazaki és mtsai 2007; Rodewald és mtsai 2001). Az egér specifikus MTS24 monoklonális antitest a thymus mindkét hámsejt típusát felismeri (Blackburn és mtsai 1996; Rossi és mtsai 2007). Az Mts24<sup>+</sup> sejteket, TEPC-eknek tartják, hiszen ha ezeket az egér sejteket izolálták, majd a vese tokja alá transzplantálták, komplett thymus fejlődött (Bennett és mtsai 2002; Gill és mtsai 2002).

A szinkron elmélet szerint a közös progenitorból (TEP) egyszerre indul fejlődésnek a kérgi (cTEP) és a velő (mTEP) progenitor, kialakítva a cTEC-eket és a mTEC-eket (Alves és mtsai 2014). A legújabb, ún. “serial progression” irányzatot valló kutatók szerint további két modell is felmerülhet a TEC-ekkel kapcsolatban: az

asszimmetrikus és a szimmetrikus modell. A különbség csupán annyi, hogy első lépésben egy olyan átmeneti TEP alakul ki, ami az asszimmetrikus scenárió szerint közeli rokonságot mutat a cTEP-ral (Alves és mtsai 2014), (3.ábra).



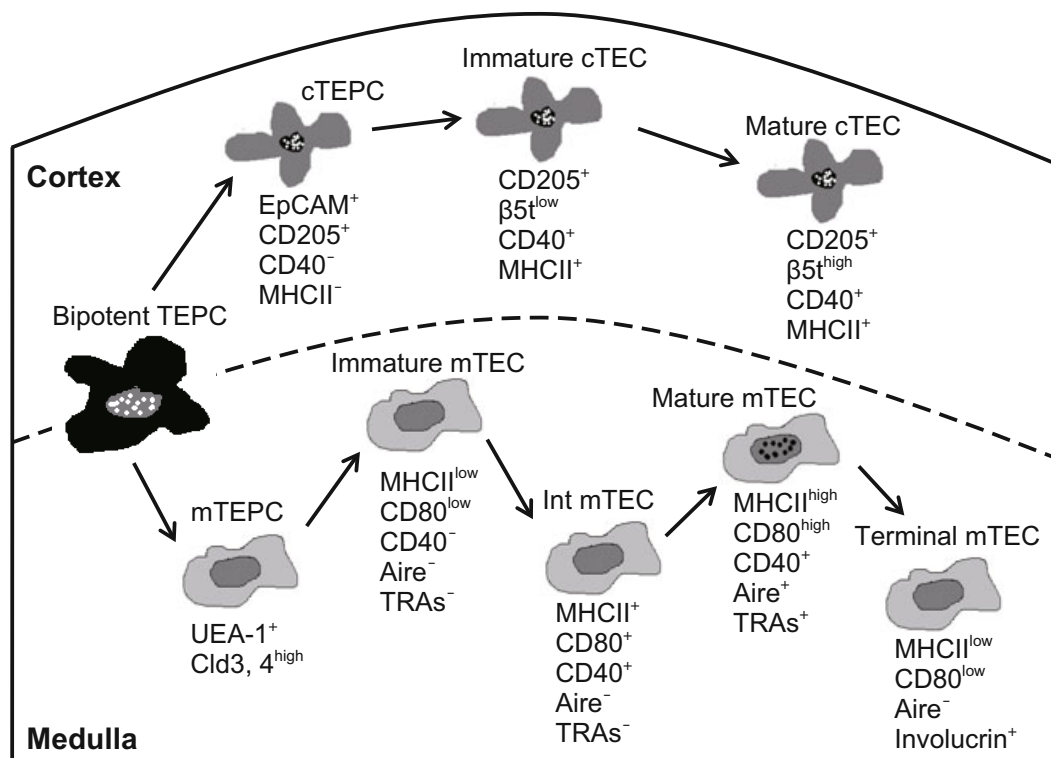
**3. ábra. Thymus hámsejtek fejlődési útvonalai I.** (A) A szinkron elmélet szerint a TEP-ből időben egyszerre differenciálódik a cTEC-ek és a mTEC-ek progenitora is, vagyis a cTEP és a mTEP is. (B) A “serial progression” fejlődési útvonal esetén a TEP-ből elsőként kialakul egy átmeneti közös progenitor (tTEP), mely továbbfejlődik az adott sejtvonalra jellemző progenitorokon (cTEP és mTEP) keresztül cTEC-ekké és mTEC-ekké. Az asszimmetrikus modellben szereplő tTEP fenotípusa sokkal közelebb áll a cTEP fenotípusához, azonban bipotenciájukat elveszítve, ezekből a progenitorokból csak mTEC-ek képződhetnek. A cTEC-ek kialakulása ez esetben valamilyen deformitás eredménye lehet. A szimmetrikus modellben szereplő tTEP a kérgi és a velő hámsejtek sejtvonalára jellemző molekulákat expresszálják. A fejlődés további lépései megegyeznek a szinkron elméletben leírtakkal, vagyis a cTEP-ből a cTEC-ek, míg a mTEP-ből a mTEC-ek alakulnak ki. Alves és mtsai 2014 nyomán.

A mTEC-ek érést 3 fázison keresztül lehet végigkövetni (Sun és mtsai 2013):

1. éretlen mTEC-ek, melyek alacsony intenzitással expresszálják az MHCII-t és a CD80/86 kostimulátor molekulákat (Sun és mtsai 2013),
2. olyan hámsejtek, amelyek már elkötelezett mTEC-ek, azonban azért, hogy az AIRE gén még nem került kifejeződésre, e sejtek még funkcionálisan éretlenek és

3. a TRA-ek bemutatására képes, így a T-sejtek negatív szelektálásáért felelős, érett MHCII<sup>high</sup> CD80/86<sup>high</sup> Aire<sup>+</sup> mTEC-ek (Alexandropoulos és Danzl 2012) (4.ábra).

A cTEC-ek fejlődési útját szintén végig lehet követni a különböző érési markerek jelenlétének függvényében (4.ábra). A bipotens TEPC-ből egy cTEPC specializálódik a cTEC-ek sejtvonalának irányába. A cTEPC-re az epithelialis sejtek közötti adhéziós molekula (EpCAM) és a DEC205 molekula jelenléte a jellemző, azonban MHCII negatív. Az érett cTEC-ekben katalitikus aktivitással bíró  $\beta$  5t proteoszóma detektálható, melynek hiányában a CD8<sup>+</sup> sejtek negatív szelekciójában hiba történik, számuk drasztikusan csökken (Murata és mtsai 2007).



4. ábra *Thymus hámszettek fejlődési útjai II.* A cTEC-ek és a mTEC-ek is a közös bipotens TEPC-ből indulnak el a fejlődés útján. A differenciálódás során kialakulnak a mindkét sejtvonalra jellemző progenitorok (cTEPC és mTEPC). A különböző érési stádiumban lévő sejteket a sejtfelszíni molekulák expressziója alapján lehet megkülönböztetni. A cTEC-ek fejlődésére az EpCAM, a CD205, a CD40, az MHCII és a  $\beta$  5t molekulák különböző mértékű expressziója jellemző. Ezek alapján megkülönböztetünk éretlen és érett cTEC-eket. A mTEC-ek érése több lépésen keresztül zajlik: az Ulex Europaeus Agglutinin-1 (UEA-1) és Claudin3, 4 pozitív mTEPC-ből az éretlen mTEC differenciálódik. Az MHCII, a CD80 és a CD40 molekulák expressziójának fokozódása következtében egy intermedier mTEC-en keresztül érett (mature) mTEC-ek alakulnak ki, melyek az AIRE mediálta TRA-eket termelik. Az érési folyamat végső fázisaként az érett mTEC-ek terminális állapotba lépnek, elveszítve az AIRE pozitivitásukat, illetve az MHCII és a CD80 molekulák expressziójának mértéke is csökken. A terminális mTEC-ek involucrint kezdenek el produkálni, ezzel is jelezve funkciójuk elvesztését. Alexandropoulos és Danzl 2012 nyomán.

### 2.2.2. Cysták

A cysták eredetével, valamint funkciójával kapcsolatban számos elmélet létezik, melyek egymással ellentmondó teóriát támasztanak alá. A mTEC-ek differenciálódási programjában olykor “hiba” léphet fel, aminek következtében cysták képződnek. A cystákat képező mTEC-ek **terminális differenciációjuk** során polarizált állapotban maradnak, apikális felszínükön mikrobolyhok, esetenként csillók figyelhetőek meg, hasonlóan, mint a légző- vagy emésztő rendszerben található csillós sejtekhez (Dooley és mtsai 2005a, b; Gillard és mtsai 2007; Khosla és Ovalle 1986). Egy másik elmélet szerint a thymus organogenezise során, még a hámsejtek végső differenciálódását megelőzve, a mTEC-ek egy része megreked fejlődésük egy korai stádiumában (Dooley és mtsai 2005a, b), melyek létrehozzák a cystákat. További hipotézisek szerint, amennyiben nem történik meg a T-sejt – TEC közötti “crosstalk”, a TEC-ek fejlődésében defektus lép fel, cysták alakulnak ki (Vroegindeweij és mtsai 2010). Emlősben egy sejtől, míg a madarak thymusában inkább a kettő vagy több sejtől összekapcsolódó cystákat figyeltek meg, melyek egymással desmoszómákon keresztül kerülnek összeköttetésbe (Frazier 1973; Isler 1976; Kendall és Frazier 1979). A kéregvelő határon lokalizálódó cysták lumenében lymphocytákat, granulocytákat, makrofágot is megfigyeltek, míg más esetben egy ismeretlen összetételű, homogén denz anyagot detektáltak (Gulati és mtsai 1995; Kendall és Fraizer 1979). A centrális tolerancia egyik alappilléreként működő sejtek a mTEC-ek, melyek TSA-eket mutatnak be a  $CD4^+$  vagy  $CD8^+$  T-sejteknek. A tüdő II. típusú pneumocytái surfactant proteinek (SP) termelnek (Crouch és Wright 2001). Az SP-A és SP-C expresszióját nem csak tüdőben, de nude és kontroll egerek thymusában is kimutatták RT-PCR technikával (Dooley és mtsai 2005a, b). Az érett mTEC-ek (Sun és mtsai 2013) és a cystákat alkotó mTEC-ek is  $MHCII^+$ , melyekről kimutatták, hogy  $SP-A^+$  (Dooley és mtsai 2005a) és  $Foxn1^+$  (Vroegindeweij és mtsai 2010). Ezen tulajdonságaik alapján feltételezik, hogy a cystáknak szerepe van a T-sejt szelekcióban is (Vroegindeweij és mtsai 2010).

### **2.2.3. Hassall testek**

Habár több, mint 150 éve tudunk a HB-ek létezéséről (Hassall 1846), azonban nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre morfológiájukról, funkciójukról. A TEC-ek degenerációjának eredményeként vannak számon tartva. A velőállomány jellegzetes, acidophil struktúrái, melyek centrális részében necrosisra, elszarusodásra vagy akár meszesedésre utaló morfológiai jegyeket lehet felfedezni. Éretlen és érett HB-eket is megkülönböztetnek, azonban egyikük sem expresszál vimentint, dezmint, CD3-at vagy CD4-et (Raica és mtsai 2006; Minkó és Oláh 1996). A pusztolófélben lévő hámsejtek között cystára emlékeztető szerkezetet is leírtak (Ors és mtsai 1999), illetve makrofágot, CD20<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> lymphocytákat is kimutattak a hámsejtek között (Raica és mtsai 2005). Ezen információra alapozták a kutatók azt a feltételezésüket, miszerint a HB-ek nem csak a hámsejtek turnoverének egy járulékos következménye, hanem szerepet kaphatnak a negatív szelekcióban, de hozzájárulhatnak egy T-sejt szubpopuláció kialakításához is (Raica és mtsai 2006). Más elmélet szerint fagocitáló tulajdonsággal rendelkeznek, így a T-sejtek “temetőjének” is nevezik őket (Farr és mtsai 2002). Jóllehet sokáig azt gondolták, hogy egy funkcióval nem rendelkező képződményről van szó, azonban Zaitseva és mtsai (2002) eredményei kimutatták, hogy a HB-t felépítő hámsejtek thymus stromális TSLP és IL-7-et termelnek. Míg az egér thymusban mind a TSLP-nek, mind pedig az IL-7-nek szerepe van a T- és B-sejtek differenciálódási folyamataiban, addig a humán TSLP a CD11c<sup>+</sup> éretlen myeloid DC-eket aktiválja (Raica és mtsai 2005). Watanabe és mtsai (2005) a TSLP<sup>+</sup> HB-ek sejtjei között CD11c<sup>+</sup> érett DC-eket detektáltak. Úgy gondolják, hogy a kéreg-velő határon elhelyezkedő DC-eknek a negatív szelekcióban van szerepük, a TSLP-re érzékeny DC-eknek pedig az autoreaktív T-sejtek pozitív szelekciójában, melyekből a CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg sejtek differenciálódnak (Raica és mtsai 2006). Amennyiben ezeket az adatokat vesszük alapul, akkor a HB-eknek kiemelkedő szerepük van a DC-ek mediálta centrális tolerancia kialakításában.

#### **2.2.4. Myoid sejtek**

A thymusban előforduló myoid sejtek (TMC) jelenlétét több, mint száz évvel ezelőtt feljegyezték (Mayer 1888). Mayer úgy gondolta, hogy ezek a struktúrák izomrostok degradálódott maradványai. Madárban Raviola és Raviola (1967) tanulmányában olvashatunk bővebben a myoid sejtekről, melyek száma a kor előrehaladtával csökken. Hüllőknél és kétélűeknél is megfigyelték, hogy az évszakok váltakozása során képesek újra és újra megújulni. Alakjuk változatos: elnyúlt, ovális, akár körte alakú is lehet. Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal alátámasztották, hogy magányosan fordulnak elő, mint a simaizom sejtek, azonban az aktin és myosin filamentumok sarcomérákba rendeződnek, harántcsíkolatot mutatnak. Különböző izomspecifikus proteinek expresszálnak, mint pl.: troponin T-t vagy dezmin (Tamiolakis és mtsai 2004).

A TMC-ek eredetéről számos elmélet létezik, többek között, hogy az embrionális fejlődés egy véletlen “balesetéből” származnak (Mandel 1968), vagy a keringésen keresztül érkeznek, mint járulékos sejtek progenitorai (Dustin 1909), azonban mindkét elmélet zsákutcába vezetett. A tudomány fejlődésével további nézetek alakultak ki valódi származásukról:

1. Raviola és Raviola (1967) megfigyelései alapján a TEC-ek transzdifferentiációjának eredményei a TMC-ek.

2. A modern kor embriómanipulációs technikáinak és a madár embrió adta előnyöknek köszönhetően Nakamura és Ayer-Le Lièvre (1986) eredményei igazolták azt a feltételezést, miszerint a TMC-ek a NCC-ekből származnak.

3. Ugyanakkor további transzplantációs kísérletek arról számolnak be, hogy a TMC-ek a prechordalis mesodermából fejlődnek (Seifert és Christ 1990).

### **2.2.5. Az extracelluláris mátrix szerepe a thymusban**

A thymus olyan mikrokörnyezetet biztosít a thymocyták számára, melyben a TEC-ek hálózatán keresztül érnek és differenciálódnak különböző cytokinek, chemokinek és extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék hatására. A csontvelő eredetű lymphocytá prekursorok (LP) a keringésen keresztül érkeznek a kéregállományba, ahol teljesen izolálva kezdenek el a thymuson belüli életüket. Ezt a vér-thymus barrier (BTB) teszi lehetővé, ami meggátolja az idegen antigének bejutását (Raviola és Karnovsky 1972). A BTB-t az endothel sejtek és lamina basalisuk, illetve a kéregállomány felszíni epithel sejtjei és azok lamina basalisuk alkotja (Törő és Oláh 1967). Gyakran találkozhatunk a “double-layerd” kapilláris elnevezéssel is, miszerint a LP-oknak két basalis laminán keresztül kell átjutniuk az erekből a thymus kérgi parenchymájába (Henry és mtsai 1992). Ugyanakkor ilyen vagy ehhez hasonló barriert nem lehet találni sem a kéreg- és velőállomány között, sem pedig a velőállományban. A fejlődési folyamatokon, szelekciókon átjutó érett T-sejtek a velőállományba vándorolnak, majd onnan az ereken keresztül jutnak a perifériára. A T-sejtek “közlekedését” az ECM molekulák irányítják. A TEC-ek fibronectint, laminint, kollagént termelnek, melyek segítik a lymphocyták vándorlását, differenciálódását (Savino és mtsai 2000; 2002; 2004). A laminin különböző izoformáinak (pl.: laminin-2, laminin-5) defektusa esetén a thymocyták fejlődésében zavart észleltek. A dupla negatív (DN) T-sejtek száma drasztikusan csökkent és az apoptotikus folyamatok is gyakrabban jelentkeztek. Feltételezhetően a laminin-2-nek szerepe van a DN stádiumból a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dupla pozitív (DP) állapotba való jutásban (Gameiro és mtsai 2010; Magner és mtsai 2000). Az integrinek szerepe sem elhanyagolható a thymocyták érési fázisaiban. Az integrinek működése a guanin nukleotid kötő fehérje, az Rho kontrollja alatt történik. Az Rho feladata, vezényelni az integrinek által szabályzott T-sejt és ECM molekulák össze- és szétkapcsolódási folyamatait (Vielkind és mtsai 2005). A migrálásban szerepet kapnak a chemokinek is, azonban feltételezik, hogy kooperálva az ECM molekulákkal hatékonyabban képesek működni (Savino és mtsai 2004; Yanagawa és mtsai 2001). Az ECM folytonos megújulását a mátrix metalloproteázok (MMP) teszik lehetővé. A szöveti átalakulás mellett másik fontos funkciójuk a T-sejtek fejlődésében rejlik (Gameiro és mtsai 2010). Az ECM glycoproteinek közé tartozó tenascin a NCC-ek vándorlását is szabályozza (Akbareian és mtsai 2013; Halfter és

mtsai 1989; Tucker 2001). Embrionális fejlődéskor mesenchymális sejtek migrálnak a thymus hámtelépébe, megelőzve a hemopoetikus sejtek kolonizációját (Dieterlen-Lievre és Martin 1981; Savagner és mtsai 1988). A mesenchymális eredetű fibroblastok ECM molekulákat (fibronektin) termelnek, melyek egy “finom” szövetes hálózatot alkotva jelennek meg a velőállományban, azonban a kéregállományban nem detektálható jelenlétük (Anderson és mtsai 1997; Savino és mtsai 2000; Suniara és mtsai 2000). A kor előrehaladtával az atrophizáló egér thymusban az ECM fehérjék mennyisége megnő, ami korrelál a különböző glycocorticoidok indukálta involúció során felhalmozódó ECM mennyiségével (Gameiro és mtsai 2010; Lannes-Vieira és mtsai 1991).

Habár (Weiss 1988) úgy gondolta, hogy a thymus alapvázát csak a TEC-ek alkotják, azonban Rosai és Levine (1976) megreformálta a thymusról alkotott eddigi véleményt. Ezt a dinamikusan változó szerkezetet a rácsrostok hálózata egészíti ki, melyek száma fokozatosan nő az előregedő thymus állományában (Yu és Lee 1993). A humán thymus tokjában, sövényeiben folyamatosan összefüggő rácsrostok találhatóak, azonban a kéreg-velő határán lokalizálódó erek körül a folyamatosság megtörik (Yu és Lee 1993).



### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Tekintettel arra, hogy a madár TDC-ekről in vivo nem rendelkezünk információval, ezért elsődleges célunk volt:

- I. A madár thymus dendritikus sejtjeinek **in vivo** **cytológiai** (elektronmikroszkópos szintű) **identifikálása és immunmorfológiai karakterizálása.**

A thymus velőállományban lévő hámsejtek a dendritikus sejtekkel együtt felelősek a centrális tolerancia kialakításáért, azaz a thymus negatív szelekciójáért, ezért:

#### **II.**

1. Célunk volt a **TDC-ek hámhoz való viszonyának meghatározása.**
2. További célul tűztük ki, morfometriás méréssel meghatározni a velőállomány további kompartmentjeinek: a **keratin negatív területek-KNA** és a **keratin pozitív hálózat (KPN) térfogati eloszlását a velőállományban** normál állatban és acut involúciót indukáló dexametazonnal történő kezelés után.
3. Jellemezni kívántuk a **KNA sejtes összetételét**, valamint
4. célunk volt a **KNA eredetének** meghatározása.

## **4. ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **4.1. Anyagok**

**Primer antitestek:** lsd. I. Táblázat

**Secunder antitestek:** biotinilált ló anti-egér IgG, biotinilált kecske anti-nyúl IgG (*Vector Laboratories, Burlingame, CA*), biotinilált kecske anti-egér IgG1 és IgG2a (*Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL*), Alexa 488-cal és Alexa 594-gyel jelzett anti-egér IgG, IgG1 és IgG2a secunder ellenanyagok, Zenon Alexa 488 IgG1 jelölő kit (*ThermoFischer Scientific, Waltham, MA*).

**Avidin-biotin-peroxidáz komplex (ABC) és előhívó reagensek:** Vectastain Elite ABC kit (*Vector Laboratories, Burlingame, CA*), 3,3-diamino-benzidin (DAB), 4-chloro-1-naphthol (*Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország*).

**4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI):** *ThermoFischer Scientific, Waltham, MA*.

**Polybed/Araldite Epoxy műgyanta keverék és OsO<sub>4</sub>:** (*Polysciences Inc., Warrington, PA*)

**5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU):** *Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország*.

**Dexametazon (Dexa Ratiopharm, a továbbiakban rövidítve: DM):** 4mg/ml oldatos injekció, *Teva (Semmelweis Egyetem, Központi Gyógyszertár)*.

### **4.2. Kísérleti állatok**

Kísérleteinkhez csirke (*Gallus gallus, White Leghorn SPF, Phylaxia-Sanophi, Magyarország*) és fürj (*Coturnix coturnix japonica*) embriókból (3, 6, 11, 13, 17, 20 napos), valamint kikelt állatokból (4-8 hetes), illetve 8 hetes gyöngytyúkból és nyúlból nyert szerveket használtunk. A tojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben forgatórácsos inkubáltuk 38°C hőmérsékleten, 60%-os páratartalom mellett. Valamennyi kísérlethez csoportonként legalább négy állat mintáit használtuk fel. Az állatkísérletek a Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával történtek (az engedély iktatószáma: 22.1/10032-4/2010).

### **4.3. Immunhisztokémia**

Immunhisztokémiai festések során a kivett szerveket vagy májba ágyazva, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk vagy 4%-os paraformaldehid-ben (PFA) 60 percig fixáltuk szobahőn.

A PFA-val történő fixálást követően a szövetmintákat 15%-os szacharóz, foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS-phosphate-buffered saline) hűtőszekrényben 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd PBS-ben 3x5 percig mostuk. Következő lépésben 37°C-on 1 órára, 15% szacharózt és 7,5% zselatint tartalmazó PBS-be helyeztük. Ezt követően az impregnált szerveket zselatinba ágyazva, folyékony nitrogénben előhűtött, -60°C-os 2-metilbután-izopentánban fagyasztottuk le. Cryomicrotommal 12  $\mu$  m vastagságú metszeteket készítettünk. A májba ágyazott szerveket, a metszést követően hideg acetonnal 10 percig fixáltuk.

A PBS-ben rehidrált metszeteket 45 percig inkubáltuk a primer ellenanyagokkal. Ezt követően a biotinizált szekunder ellenanyagokat használtuk 1%-os bovine serum albumin-t (BSA) tartalmazó PBS-ben, 1:200-as hígításban. Az endogén-peroxidáz aktivitást PBS-ben hígított 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal blokkoltuk, míg a thymus enogén-peroxidáz pozitív sejtjeit (EPC) 3,3'-diamino-benzidinnel (DAB) tettük láthatóvá. A primer ellenanyagok által adott jel felerősítéséhez ABC-t alkalmaztunk, és az ellenanyagok kötődési helyét 4-chloro-1-naphtol kromogén szubsztrát segítségével detektáltuk.

Egyszeres immunfluoreszcencia jelölés során Alexa-488-cal vagy Alexa-594-gyel jelzett szekunder ellenanyagot használtunk 1:100-as hígításban PBS-ben. Kettős jelölés esetén izotípus specifikus, azaz anti-egér IgG1, anti-egér IgG2, illetve anti-nyúl IgG ellenanyagot alkalmaztunk. A 74.2, a DEC205 és a cytokeratin 5 antitestek megjelölésére ZenonFluor 488 IgG1 kitet használtunk. A sejtmagokat 4,6-diamidino-phenylindol dihydrochloriddal (DAPI) tettük láthatóvá.

A metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintettük át, és a hozzacsatlakoztatott Zeiss AxioCam HRC kamerával digitális fényképeket készítettünk. Konfokális lézermikroszkópiát BioRad Radiance 2001 Rainbow LCM típusú mikroszkóppal végeztünk. A képek további feldolgozására, szerkesztésére Adobe Photoshop CS6 és Fiji programokat használtunk.

#### **4.4. Félvékony technika, elektronmikroszkópia**

A TDC-ek és a TEC-ek ultrastrukturájának jellemzésére félvékony és elektronmikroszkópos technikát alkalmaztunk. A kivett szerveket 4%-os Millonig pufferezt glutáraldehidben (GA) fixáltuk egy órán keresztül. A fixáló kimosására 4%-os Millonig puffert, majd a membránok kontrasztolására, illetve utófixálásra 0,5-2%-os osmiumtetroxidot ( $\text{OsO}_4$ ) használtunk. Újabb mosás után a szöveteket felszálló alkoholsorban 10 percig víztelenítettük. A dehidrációt intermediummal (propilén-oxid), és propilén-oxidban oldott Polybed/Araldite 6005 epoxy műgyanta keverékével való átítatás követte. A szerveket Polybed/Araldite 6005 epoxy műgyantába ágyasztuk, majd polymerizálódás céljából éjszakára  $56^\circ\text{C}$ -os termosztátba helyeztük. Az így elkészített blokkokból  $2\mu\text{m}$ -es metszeteket 1%-os toluidinkéssel festettük. Az ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom citráttal kontrasztoltuk. A preparátumokat Hitachi H-7600 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

#### **4.5. A dendritikus sejtek kimutatása pre-embedding immunhisztokémia technikával**

4%-os PFA-val fixált, 7,5%-os zselatinba ágyazott thymus blokkokból  $50\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk, majd hideg PBS-be vettük fel. A rehidrációt követően a mintákon 74.3 monoklonális antitesttel immunfestést végeztünk, melynek lépései azonosak a 3-as pontban leírtakkal. Az inkubációs időtartam a primer és sekunder antitest esetén 1,5-2 óra volt, az endogén-peroxidáz aktivitást 30 percig blokkoltuk, az ABC bekötődési idejét 60 percre növeltük. A 74.3 pozitivitást 3,3'-diamino-benzidinnel tettük láthatóvá. Az immunhisztokémiát követően a mintákat 1,5%-os GA-et és 4%-os PFA-t tartalmazó oldatban utófixáltuk  $4^\circ\text{C}$ -on egy éjszakán keresztül, majd a dehidrációt követően Polybed/Araldite 6005 epoxy műgyantába ágyasztuk. A félvékony metszeteket 0,1%-os toluidinkéssel festettük meg.

#### **4.6. Dexametazon kezelés**

A thymus acut involúciójának, illetve a KPN és a KNA térfogati eloszlási változásának előidézésére 24db 6 hetes csirkét kezeltünk dexametazon-nal (DM). Az

állatokat intraperitonealisan oltottuk testsúly-kilogrammonként 5mg DM-nal 2x5 napon keresztül. A thymus lebenyeket az utolsó kezelést követő 1,5-2 órával eltávolítottuk, majd immunhisztokémiai, illetve elektronmikroszkópos vizsgálatokra előkészítettük.

#### **4.7. Proliferáció vizsgálata bromo-deoxyuridinnel**

Az 5-bróm-2-deoxyuridin (BrdU), mint timidin analóg épül be az újonnan szintetizálódó DNS láncba, így kimutathatóak az S-fázisba lépett osztódó sejtek. A DM kezelést követő 3. napon az állatokat egyszeri alkalommal BrdU-nal (100 mg/testsúlykilogramm) oltottuk be intraperitoneálisan. A BrdU beadása után 1,5 órával az állatok thymusát eltávolítottuk, és a fagyasztott metszeteket acetonnal fixáltuk. PBS mosás után a DNS tartalmat 2N HCl-dal 37°C-on denaturáltuk, majd a szöveteket 0,1M borát pufferben neutralizáltuk 2x5 percig. A neutralizációt követően a BrdU beépülését anti-BrdU antitesttel tettük láthatóvá.

#### **4.8. Morfometriás mérés**

A thymus kéreg- és velőállományának, illetve a KPN és a KNA egymáshoz viszonyított térfogati eloszlásának vizsgálatára a Cavalieri sztereológiai mérési módszerét használtuk. A Cavalieri sztereológiai módszer segítségével kvantifikálni lehet a metszetek területeit, azokból pedig kiszámíthatjuk a szervek térfogatát (Tschanz és mtsai. 2014). 3-3 db kontroll és DM-nal kezelt csirke thymusok minden 25. metszetén cytokeratin festést végeztünk. Meghatároztuk a csirke thymus kéregállományának és velőállományának, valamint annak keratin pozitív (KPN) és keratin negatív területeinek (KNA) térfogatát. A módszer alkalmazása során az anti-cytokeratinnal festett thymus metszetekre egy általunk meghatározott nagyságú (25x25  $\mu$  m), digitális rácshálót (gridet) vetítettünk. Minden egyes metszeten kijelöltük a kéreg- és velőállomány, illetve KNA és KPN területeit, majd egy véletlenszerűen elhelyezett rács használatával megszámláltuk az ezekre a területekre eső rácspontok számát. A thymus térfogatának megbecsléséhez a következő képletet használva -  $V = A_p \times m \times t \times (P_i)$  (ahol V, a becsült térfogat,  $A_p$ , a rácsegységek területe, vagyis a rácspontok távolságának négyzete, m, a kiértékelt metszetek távolsága, t, az átlagos

metszetvastagság,  $P_i$ , az adott kompartmenten belüli pontok száma) - megkapjuk az egyes thymus lebenyek összterületét, illetve a kéreg- és velőállomány, valamint a KNA és KPN területét. Az elemzéshez a NeuroLucida szoftvert alkalmaztunk (MBF Biosciences).

#### **4.9. Fűrj-csirke testüreg kiméra**

A TDC-ek eredetének vizsgálatára 3 napos embrionális fűrj 3-4. garattasakat ültettünk át 3 napos csirke embrió testüregébe. A donorként szolgáló garattasokot a transzplantáció ideje alatt Penicillin-Streptomycint (PenStrep) tartalmazó steril PBS-ben tartottuk. A fogadó csirke embriót tartalmazó tojás tompa végén ejtett nyíláson keresztül 1,5-2ml albumint távolítottunk el, és a fejlődő embrió felett egy kis ablakot vágunk, melybe 2-3 csepp PenStrep-PBS-t cseppentettünk. Wolfram szálból készített késsel az embrió ektodermáján metszést végeztünk, majd üvegbot segítségével a szén szemcsével megjelölt fűrjből származó garattasokot transzplantáltuk a fogadó csirke embrió testüregébe. Ezt követően a tojásokat ragasztószalaggal zártuk le, majd további 2 hétig inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a 17 napos embriók hasüregét felnyitottuk, a graftokat eltávolítottuk, majd szövettani és immuncytokémiai feldolgozásokat végeztünk. Összehasonlító vizsgálatok céljából a host embrió thymusát is eltávolítottuk.

#### **4.10. Fűrj-csirke chorioallantois membrán kiméra**

A TDC-ek eredetének további vizsgálatára a 3 napos fűrj embrióból származó 3-4. garattasokot a 9 napos csirke embrió chorioallantois membránjára (CAM) ültettük. A transzplantáció után további 8 napig inkubáltuk a tojásokat. A mintavételezésnél mind a graftból fejlődő, mind pedig a gazda állat thymusát feldolgoztuk.

#### **4.11. Csirke-fűrj testüreg kiméra**

A 74.3 pozitív sejtek endodermális eredetének vizsgálatára 3 napos csirke embrióból származó 3-4. garattasokot helyeztünk 3 napos fűrj embrió testüregébe. Az inkubációs idők, illetve a szövettani feldolgozások metodikája mindenben azonos a 4.3-as pontban említettekkel.

#### 4.12. Ezüst impregnáció

A thymus KNA-ének további vizsgálatára Gömöri-féle ezüst impregnációt végeztünk (Krutsay 1980). A csirke thymusokat 1 éjszakán keresztül 4%-os pufferelt PFA-ban fixáltuk. A PBS-ben történő mosást követően a szerveket paraffinba ágyztuk, és 8µm-es metszeteken történt az elective festés.

#### I. Táblázat

<b>Antitest/klón</b>	<b>Felismert sejt típus/ specifititás</b>	<b>Hígítás</b>	<b>Beszerzési hely</b>
<b>Lu-5</b> egér IgG1	humán pán-cytokeratin	1:100	BMA, Biomedicals AG, Augst, Switzerland
<b>Basal cell cytokeratin</b> egér IgG1	cytokeratin 5	1:200	MerckMillipore Kft, Budapest, Magyarország
<b>AMF-17b</b> egér IgG1	vimentin	felülúszó	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>3B4</b> egér IgG2a	vimentin	1:200	MerckMillipore Kft, Budapest, Magyarország
<b>31</b> egér IgG1	laminin	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>3B2</b> egér IgG1	kollagén III	1:1500	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>B3/D6</b> egér IgG1	fibronektin	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>M1B4</b> egér IgG1	tenascin	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>D76</b> egér IgG1	dezmin	1:4	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>CVI-ChNL-74.3</b> (74.3) egér IgG1	csirke dendritikus sejtek és pneumocya II	1:200	Prionics AG, Switzerland (Kocsis és mtsai (2012))
<b>CD83</b> egér IgG2a	dendritikus sejtek	1:200	Dr. Colin Butter szívességéből, Pirbright Institute, Newbury, Anglia (Staines és mtsai 2013)
<b>DEC205</b> egér IgG1	dendritikus sejtek, thymus kérgi hámsejtek	1:200	Dr. Colin Butter szívességéből, Pirbright Intézet, Newbury, Anglia (Staines és mtsai 2013)
<b>CVI-ChNL-74.2</b> (74.2) egér IgG1	érett makrofágok	1:200	ThermoFischer Scientific, Waltham, MA

<b>CVI-ChNL-68.2</b> (68.2) egér IgG1	makrofágok	1:250	Acris Antibodies GmbH, Germany
<b>Kul01</b> egér IgG1	monocyták, macrofágok, interdigitáló sejtek és aktivált microglia	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA
<b>CSF1R</b> egér IgG1	Kolónia stimuláló faktor receptor1, monocyták, makrofágok	1:20	Dr. Adam Balik szívességéből, Roslin Institute, Scotland (Garcia-Morales és mtsai 2014)
<b>CT4</b> egér IgG1	csirke CD4	1:200	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL
<b>CT8</b> egér IgG1	csirke CD8	1:200	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL
<b>BoA1</b> egér IgG1	Bula és Bulb, B-sejtek	felülűsző	AbD Serotec, Puchheim, Germany (Igyártó és mtsai 2008)
<b>HIS-C7</b> egér IgG2a	CD45, pán- leukocya	1:200	ThermoFischer Scientific, Waltham, MA
<b>QCPN</b> egér IgG1	minden fürj sejt	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>MHCII</b> egér IgG1	MHCII	1:200	ThermoFischer Scientific, Waltham, MA
<b>TAP1</b> egér IgG2a	MHCII	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA
<b>1A4</b> egér IgG2a	$\alpha$ -simaizom aktin	1:200	Dako A/S, Glostrup, Denmark
<b>GIIF3</b> egér IgG1	simaizom aktin	felülűsző	Saját laboratóriumunkban előállított antitest (Nagy és mtsai 2001)
<b>SP-B</b> nyúl IgG	SP-B, pneumocya II	1:300	Dr. Jeffrey Whitsett szívességéből, Perinatal Institute, Cincinnati, Ohio
<b>CT4 FITC</b> egér IgG1	CD4	1:100	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL
<b>CT8-FITC</b> egér IgG1	CD8	1:100	Southern iotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL
<b>G3G4</b> egér IgG1	5-bromo-2'- deoxyuridine BrdU	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA



## **5. EREDMÉNYEK**

### ***5.1. A CSIRKE THYMUS DENDRITIKUS SEJTJEINEK NYOMÁBAN***

#### **5.1.1. A csirke thymus dendritikus sejtjeinek in vivo immunmorfológiai identifikálása és karakterizálása**

A 74.3 egy olyan csirke specifikus monoklonális ellenanyag, ami a Bursa Fabricii-ben a BSDC-eket (**1. A kép**), a lépben az interdigitáló DC-eket, míg a cecalis tonsilla csíracentrumaiban a FDC-eket (**1. B kép**) jelöli.

A 74.3 antitest a csirke thymus kéreg-velő határán és a velőállományban egyedi sejteket és sejtcsoportok festődését mutatja, hasonlóan az endogén peroxidáz aktivitást mutató sejtekhez (EPC) (Oláh és mtsai 1991), azonban két különböző sejtpopulációról van szó (**1. C kép**). A kéregállományban különálló 74.3 pozitív sejtek láthatóak (**1. C kép**). Ezen eredményeket figyelembe véve a 74.3 monoklonális antitest alkalmasnak bizonyult a csirke TDC-ek kimutatására.

A kéreg-velő határon csoportokba tömörülő 74.3 pozitív sejtek MHCII és vimentin pozitívak (**1. E, F és inset kép**). A 74.3 pozitív sejtek citológiai jellegzetességét elektronmikroszkópos szinten is szeretnénk volna jellemezni, ezért a pre-embedding immunhisztokémia technikát alkalmaztuk. A félvékony metszeteken a 74.3 antitest mind a kéreg-velő határon és a velőállományban, mind pedig a kéregállományban található sejtek citoplazmájában granuláris festődést mutat (**1. G, H kép**). Ez a technika azonban nem volt alkalmas a sejtek finom szerkezetének vizsgálatára, legalábbis többszöri próbálkozás után is sikertelennek bizonyult immun-elektronmikroszkópos kimutatásuk.

A CD83 és DEC205 az emlős DC-ekkel homológ, csirke-specifikus CD83 és DEC205 markerek, melyekkel, valamint a 74.3 monoklonális antitesttel kettős festéseket végeztünk annak igazolására, hogy a 74.3 marker a thymusban is DC-eket fest. A csirke specifikus CD83 monoklonális antitesttel történő immuncytokémiai vizsgálatok nyúlványos sejtek tömörüléseit mutatták (**1. I kép**), hasonlóan a 74.3 pozitív sejtekhez (**1. J kép**), azonban a kéregállományban nem találtunk CD83 pozitív sejtet. A két antitest (CD83, 74.3) eredményei nagyon hasonló morfológiai mintázatot adnak a

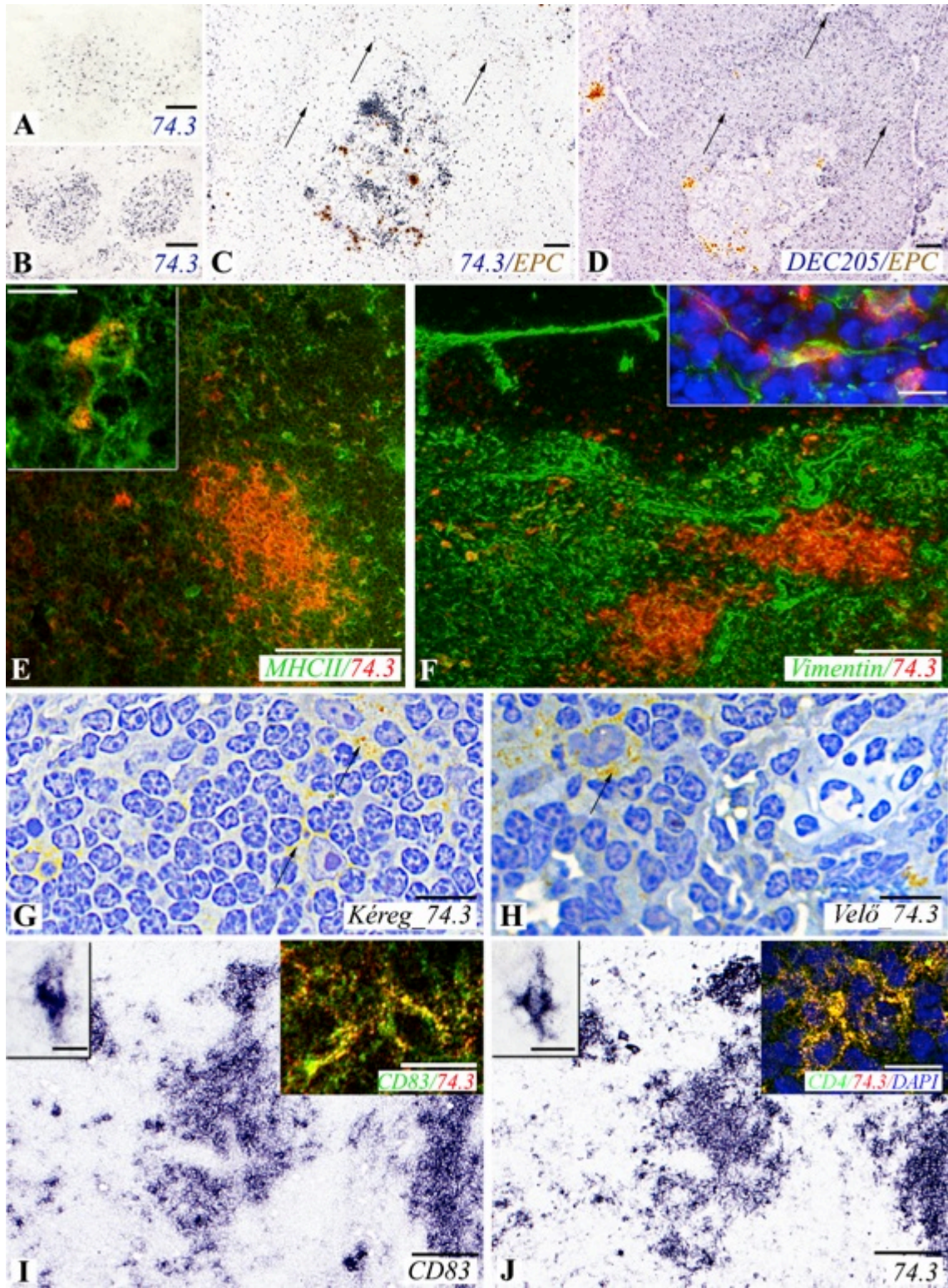
kéreg-velő határon és a velőállományban (**1. I, J kép**), ezért kettős immunfluoreszcens festést végeztünk. A konfokális mikroszkóppal készített felvételeink alapján kiderült, hogy a 74.3 pozitív sejtek valóban CD83 pozitívak is (**1. I jobb oldali inset kép**).

A TDC-ek további identifikálására a DEC205 csirke specifikus monoklonális antitestet használtuk, mint DC markert. Az immunhisztokémiai festések azonban más eredményeket hoztak: a 74.3<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtcsoportok nem mutattak DEC205 pozitivitást, bár a kéregállományban – hasonlóan a kérgi 74.3<sup>+</sup> sejtekhez - DEC205<sup>+</sup> egyedi sejteket találtunk (**1. D kép**). Habár a DEC205-öt a TDC-ek és cTEC-ek közös markereként tartják számon, azonban a csirke thymus velőállományában nem találtunk DEC205 pozitív sejtet, szemben a kéregállományban, ahol elszórta elhelyezkedő egyedi nyúlványos sejteket ábrázol.

A TDC-ek karakterizálására a fentebb említett antitestek mellett a CD4 és CD8 molekulák expresszióját is megvizsgáltuk. A humán TDC-ekkel megegyezően (Winkel és mtsai 1994) a csirke thymus velőállományában akkumulálódó CD83<sup>+</sup> és 74.3<sup>+</sup> DC-ek is CD4<sup>+</sup> (**1. J job oldali inset kép**), míg a CD8 molekula nem mutatható ki (nincs kép).

---

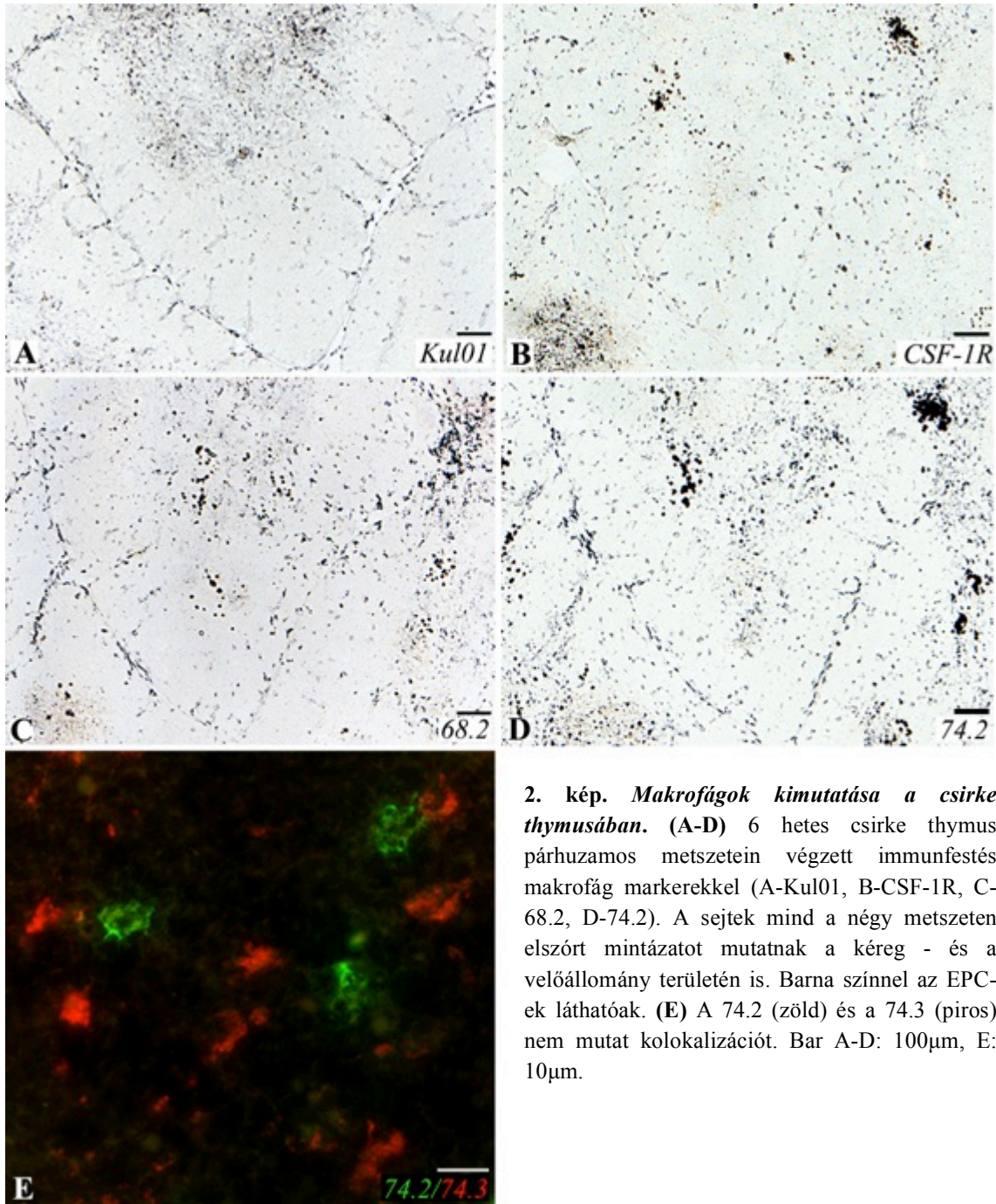
**1. kép. A 74.3<sup>+</sup> sejtek fenotipizálása. (A)** 74.3<sup>+</sup> DC-ek a bursa Fabricii velőállományában. **(B)** 74.3<sup>+</sup> FDC-ek a cecalis tonsilla csiracentrumaiban. **(C-J)** 6 hetes csirke thymus metszetei. **(C)** A velőállományban lévő 74.3 pozitivitást mutató csoportok (kék) nem kolokalizálnak az EPC-ek csoportjaival (barna). A kéregállományban 74.3<sup>+</sup> egyedi sejteket lehet látni (nyíl). **(D)** Párhuzamos metszet C-vel. A DEC205<sup>+</sup> sejtek a kéregállományban lokalizálódnak (nyíl), a velőállomány negatív. **(E és inset)** 74.3/MHCII kettős immunfluoreszcens festés. A velőállományban található 74.3<sup>+</sup> (piros) sejtcsoportok MHCII (zöld) pozitívak és **(F és inset)** vimentint (zöld) is expresszálnak. A magokat DAPI-val (kék) tettük láthatóvá. **(G-H)** Preembedding 74.3 immunhisztokémiai festés, thymus toluidin kékkel festett félvékony metszete. **(G)** Mind a kéregállományban, **(H)** mind pedig a velőállományban kimutatott 74.3<sup>+</sup> sejtek citoplazmájában DAB pozitív granulumokat lehet látni (nyíl). **(I)** A velőállományban lokalizálódó nyúlványos CD83 pozitív sejtek csoportokba tömörülnek ugyanúgy, mint **(J)** a 74.3 pozitív sejtek is. Párhuzamos metszet I-vel **(I jobb oldali inset)** CD83 (zöld) és 74.3 (piros) kettős immunfluoreszcens festés konfokális felvétele. A két molekula kolokalizációt mutat. **(I bal oldali inset)** CD83<sup>+</sup> sejt nagyobb nagyítással. **(J jobb oldali inset)** CD4 (zöld) és 74.3 (piros) kettős immunfluoreszcens festés konfokális felvétele a thymus velőállományából. A 74.3<sup>+</sup> sejtek CD4-et expresszálnak, sejtmag – DAPI (kék). **(J bal oldali inset)** A velőállományból egy 74.3<sup>+</sup> sejt nagyobb nagyítással. Bar A-B: 50 μ m; C-F, I és J: 100 μ m; E inset, F inset, G-H, I jobb és bal oldali inset és J jobb és bal oldali inset: 10 μ m.



1. kép.

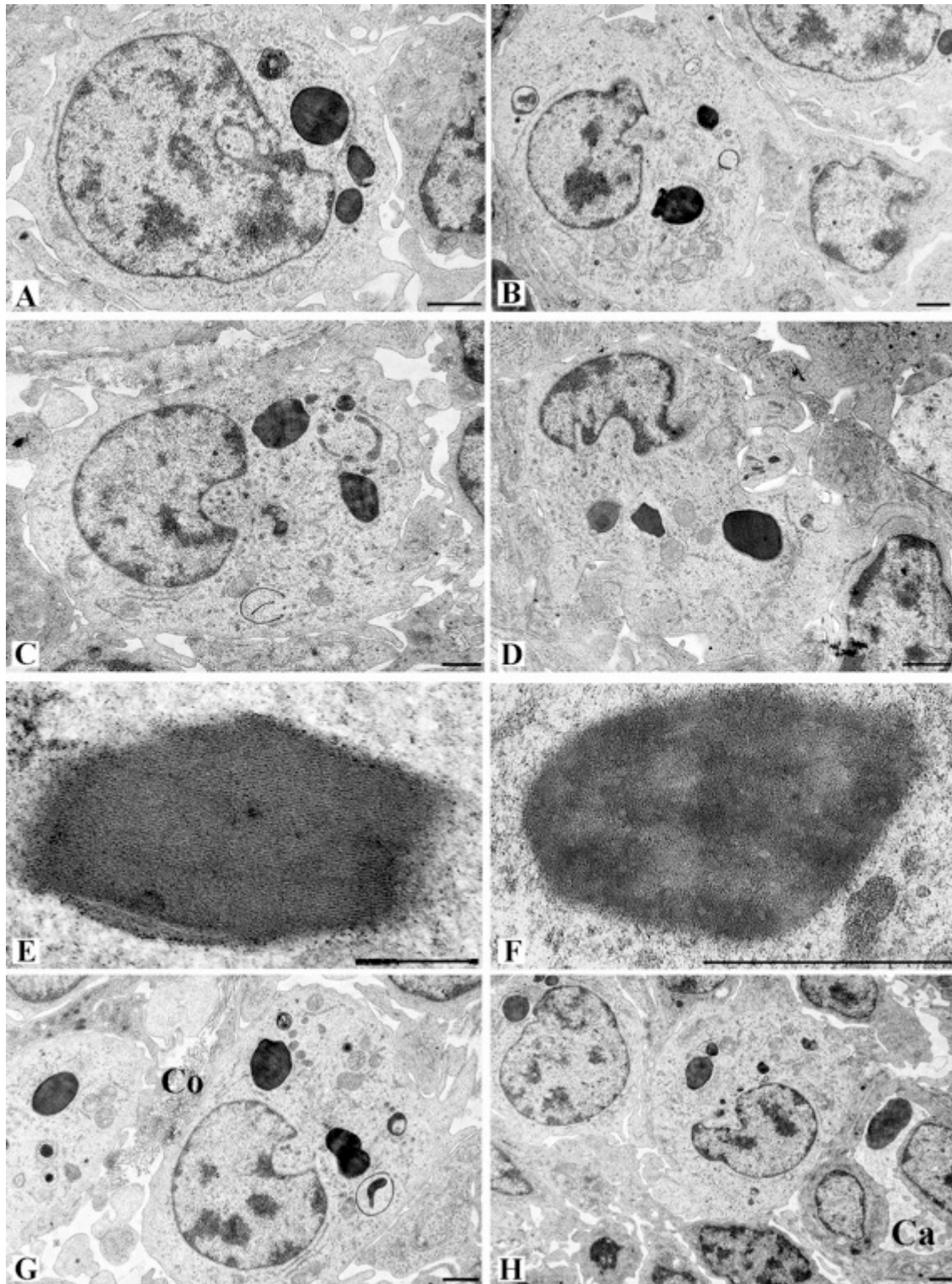


Annak eldöntésére, hogy a  $74.3^{+}CD83^{+}$  sejtek expresszálják-e a makrofágokra jellemző molekulákat, immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Már a  $74.3^{+}CD83^{+}$  sejtek eltérő eloszlási mintázatából (**1. C, I, J kép**) is kiolvasható, hogy ezek a sejtek nem makrofágok (**2. A, B, C, D kép**). Azonban, hogy ezt teljes biztonsággal kijelenthessük, kettős immunfluoreszcens festést végeztünk a 74.3 és 74.2 antitesttel, ami valóban két különböző sejtípust mutat (**2. E kép**).



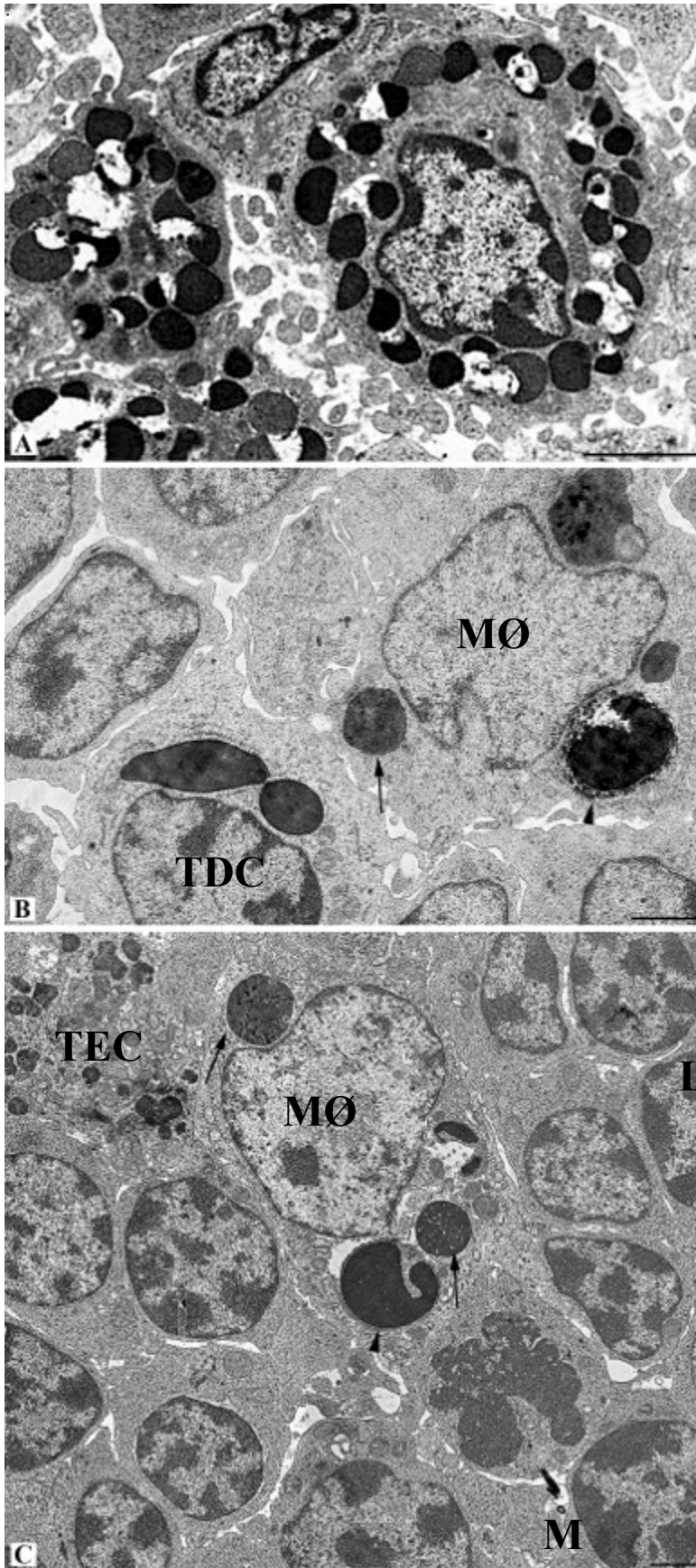
**2. kép. Makrofágok kimutatása a csirke thymusában.** (A-D) 6 hetes csirke thymus párhuzamos metszetein végzett immunfestés makrofág markerekkel (A-Kul01, B-CSF-1R, C-68.2, D-74.2). A sejtek mind a négy metszeten elszórt mintázatot mutatnak a kéreg - és a velőállomány területén is. Barna színnel az EPC-ek láthatóak. (E) A 74.2 (zöld) és a 74.3 (piros) nem mutat kolokalizációt. Bar A-D: 100 $\mu$ m, E: 10 $\mu$ m.

Az elektronmikroszkópos szintű immuncytokémiai vizsgálatok nem vezettek eredményre, de a 74.3 és a CD83 immunfestések arra engednek következtetni, hogy a TDC-ek csoportokat képeznek a velőállományban. Ez a „mankó” segített abban, hogy olyan sejtcsoportokat keressünk az ultravékony metszeteken, melyek elkülöníthetők a lymphoid sejtektől, a hámsejtektől és nem tartalmaznak lysoszómát, mint a makrofágok **(4. B, C kép)**. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során olyan nyúlványokkal rendelkező sejteket találtunk **(3. A-D és G-H kép)**, melyekben kimutathatóak a lamelláris elrendeződésű granulomok **(3. E, F kép)**. A sejtmagok alakja (maghártya invagináció), heterokromatin szerkezete, valamint a sejtmag egyik oldalán lokalizálódó granulomok, melyek esetenként lamelláris belső szerkezetet mutatnak **(3. E, F kép)**, olyan különleges jelleget kölcsönöz a sejtnak, mint amelyet a bursai szekréción sejteken és a csíracentrumok FDC-jein láthatunk. A morfológiai és immuncytokémiai jegyekre hagyatkozva ezeket a sejteket TDC-eknek tartjuk. Az elektronmikroszkópos felvételek szerint a TDC-ek gyakran az erek körül helyezkednek el **(3. H kép)**. A makrofágok citoplazmájában a lysoszómák mellett fagoszómák is láthatóak, melyek alátámasztják, hogy valóban két különböző sejtről van szó **(4. B, C kép)**. Az EPC-ek citoplazmájában is találunk granulomokat, azonban azok eloszlása, jellege és a sejtmag szerkezete **(4. A kép)** egy teljesen más sejttípust jellemez, szemben a TDC-ekkel. A TDC-ek csoportos elhelyezkedése a velőállományban és az ottani topográfiai helyzetük, valamint az ismert sejttípusoktól való elkülönítésük biztos „kapaszkodót” jelentett elektronmikroszkópos szintű meghatározásukban.



**3. kép.** *A csirke thymus dendritikus sejteinek elektronmikroszkópos szerkezete.* (A-D és G-H) A nyúlványos alakú sejtek citoplazmájában számos durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (DER) és mitokondriumok jelenléte figyelhető meg. A szabálytalan alakú, behúzódtat mutató sejtmag excentrikusan helyezkedik el. (E-F) Granulumok a csirke TDC-ből, ami (E), bizonyos metszési síkban lamelláris szerkezetet mutat. Co-kollagén kötegek, Ca-kapilláris. Bar A-H: 1  $\mu$  m.





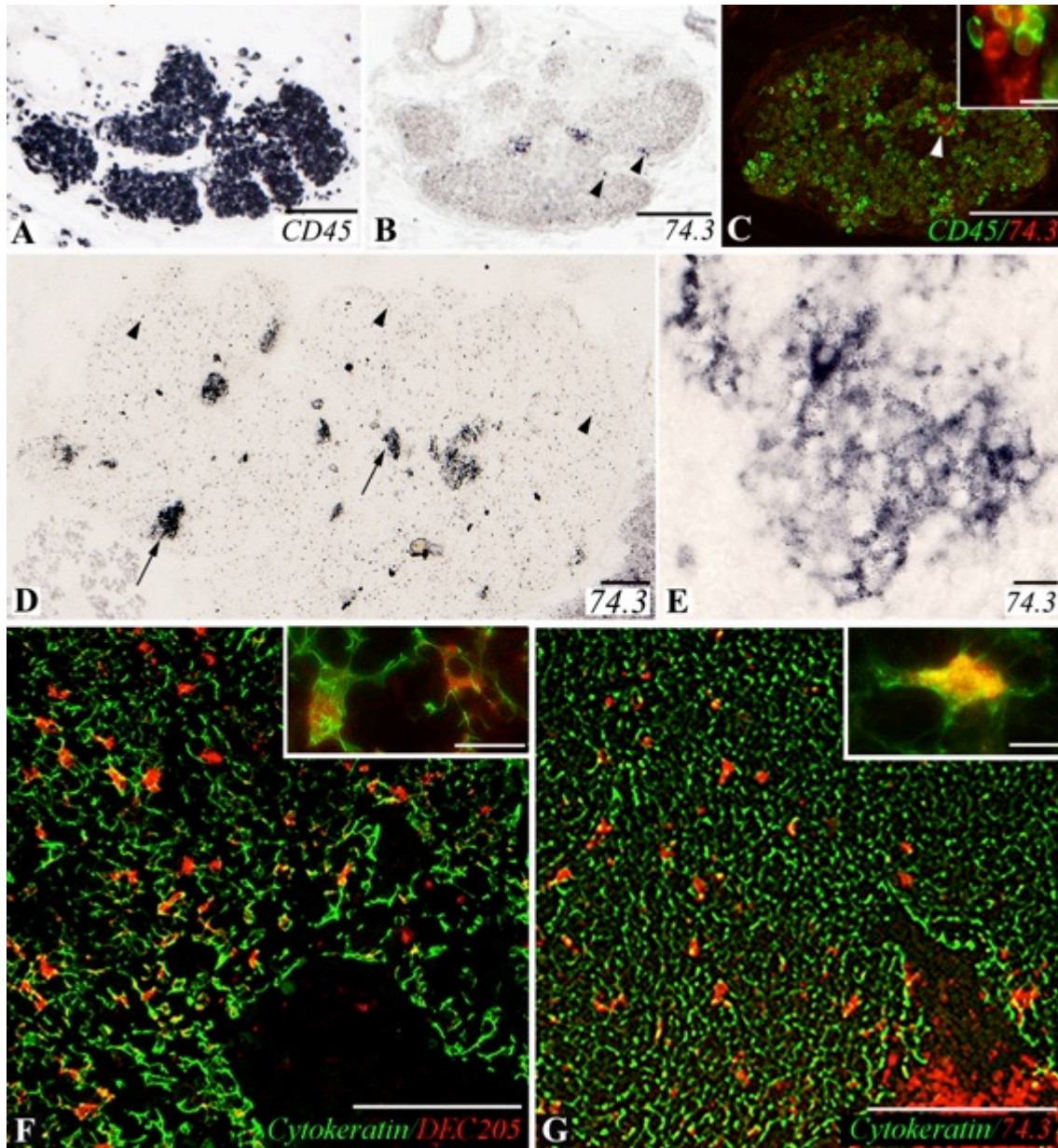
4. kép. A TDC-ek, az EPC-ek és a makrofágok morfológiájának elektronmikroszkópos összehasonlítása. (A) EPC-ek a thymus velőállományában. Citoplazmájukat nagy elektronsűrűségű granulomok töltik ki, melyek közül egyesek szekrécióra utaló jegyeket mutatnak. (B-C) A makrofágok sejtmag heterokromatinja diszperz eloszlású, citoplazmája fagoszómákat (nyílfej) és lysoszómákat (nyíl) is tartalmaz. Bar: 1 $\mu$ m. MØ-makrofág, TDC-thymus dendritikus sejt, TEC-hámsejt, M-mitózis, L-lymphocyta.

### **5.1.2. A 74.3 pozitív sejtek eredete a thymus kéreg- és velőállományában**

További vizsgálataink a csirke TDC-ek eredetére irányultak, ezért fejlődéstani vizsgálatokat is végeztünk. Az emlős TDC-eket véreredetűnek tartják, ezért anti-CD45 immunfestéssel **(5. A kép)** a 11 napos embrió thymust kolonizáló hemopoetikus sejteket mutattuk ki. Az első 74.3 pozitív sejtek az embrionális fejlődés 11. napján jelennek meg a thymusban **(5. B kép)**. A 74.3 pozitív sejtek eredetének kimutatása érdekében kettős immunfluoreszcens festést használtunk a CD45 közös pán-leukocytá markerrel és a 74.3 antitesttel. A kiértékelések során  $CD45^{+}74.3^{+}$  kettősen pozitív sejtek mellett **(5. C és inset kép)**  $CD45^{-}74.3^{+}$  sejteket is detektáltunk. A fejlődés során mindkét sejtpopuláció száma gyarapszik. A 14. embrionális napon egyre több csak  $74.3^{+}$  sejtet találunk, melyek a kéregállomány területére lokalizálódnak, illetve a csoportokba akkumuláló, nyúlványos 74.3 pozitív sejtek száma is nő **(5. D, E kép)**.

Korábbi eredményeink szerint a felnőtt állat thymusának kéregállományában is találhatóak egyedi  $74.3^{+}$  sejtek **(1. C kép)**. A  $DEC205^{+}$  sejtek mind számban, mind pedig eloszlásukban hasonló mintázatot mutatnak a kérgi  $74.3^{+}$  sejtekhez felnőtt állatban **(1. C, D kép)**, ezért cytokeratinnal kettős immunfluoreszcens festést végeztünk ezen sejtek hovatartozásának kimutatására, ami szerint a kéregállományban lévő cytokeratint expresszáló sejtek pozitívak DEC205-re és 74.3-ra **(5. F, G és inset kép)**.





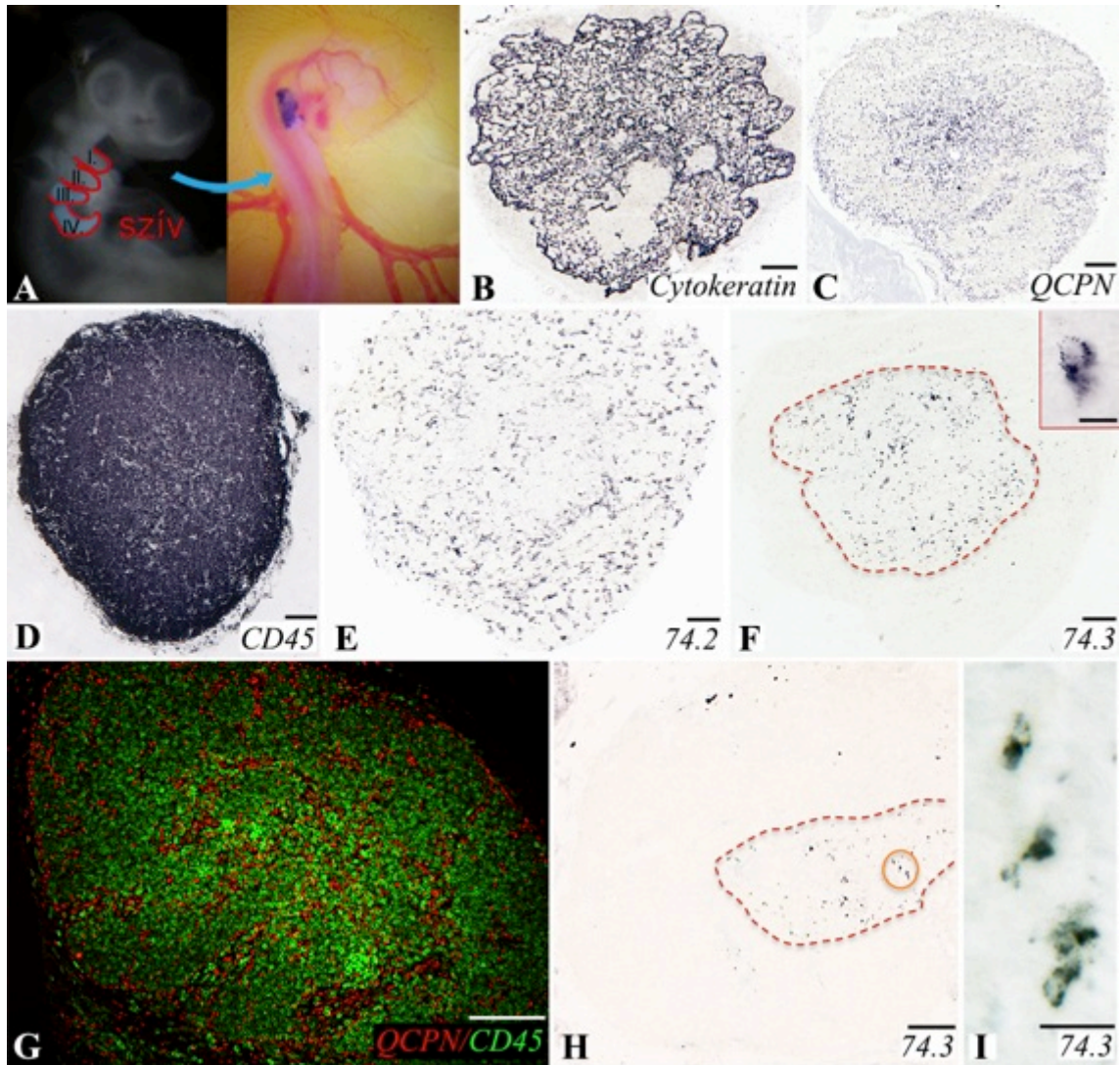
**5. kép. A 74.3<sup>+</sup> sejtek immunkarakterizálása.** (A-C) 11 napos embrió thymus. (A) CD45 immuncytokémiai festés. (B) 74.3 pozitív sejtsomók a lebeny belsejében és a tok alatt egyedi 74.3 pozitív sejtek (nyílhegy). (C) A thymus állományában CD45<sup>+</sup>74.3<sup>+</sup> sejtek detektálhatóak (nyílhegy). (C *inset*) Nagy nagyítású felvétel a lebeny belsejéből, ahol a CD45<sup>+</sup>74.3<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtek is megfigyelhetők. (D-E) 74.3 immunfestés a 14 napos csirke embrió thymusán. (D) A velőállományban több 74.3 pozitív sejtsoport jelenik meg (nyíl) és a kéregállományban megnőtt a 74.3 pozitív egyedi sejtek száma (nyílhegy). (E) Részlet a D kép egy sejtsoportjáról, ami 74.3<sup>+</sup> nyúlványos sejtekből áll. (F és *inset*) Cytokeratin (zöld) és DEC205 (piros) kimutatása a kéregállományában. A DEC205-öt expresszáló sejtek cytokeratin pozitívak. (G és *inset*) Cytokeratin (zöld) és 74.3 (piros) kettős immunfluoreszcens festés a kéregállományban. A cytokeratint expresszáló sejtek 74.3 pozitívak. Bar A-B, D, F-G: 100µm, C: 10µm, E, F *inset* és G *inset*: 20µm.

A  $CD45^+74.3^+$  kettősen pozitív és a  $CD45^-74.3^+$  egyszeresen pozitív sejtek két különböző populációt alkotnak. Kérdés, hogy az utóbbi, a  $CD45^-74.3^+$  egyszeresen pozitív sejtek is valóban DC-ek-e, és ha igen milyen eredetűek? A  $CD45^+74.3^+$  kettősen pozitív sejtek kétséget kizáróan hemopoetikus eredetűek, míg a kérgi egyedi  $CD45^-74.3^+$  sejtek hisztológiai eloszlása hasonló a kortikális epithelialis retikulum sejtekéhez, ami felveti a sejtek hám eredetét. Ennek a feltételezésnek az igazolására csirke-fürj, illetve fürj-csirke testüreg (**6. A kép**) és chorioallantois membrán (CAM) kiméra kísérleteket végeztünk. A dendritikus sejtek hemopoetikus eredetének vizsgálatára 3 napos fürj 3-4. garatívet transzplantáltunk 3 napos csirke embrió testüregébe. A beültetett garatívékban thymus fejlődött. A fürj eredetű endodermális hámretikulummal rendelkező thymusban (**6. B, C kép**) a csirke keringéséből belépő,  $CD45^+$  sejtek jelennek meg (**6. D kép**). A  $74.2^+$  makrofágok (**6. E kép**) mellett megtaláljuk a  $74.3$  pozitív sejteket is a velőállományban (**6. F és inset kép**), azonban a kéregállományban nincs  $74.3^+$  sejt, ami arra utal, hogy a csirke thymus kérgi  $CD45^-74.3^+$  sejtjei a thymus hámteléből fejlődnek. A hemopoetikus eredet további alátámasztására CAM kimérát alkalmaztunk. 3 napos fürj embrió 3-4. garatívet ültettünk ki 9 napos csirke embrió CAM-ra. A garatívékban ez esetben is morfológiailag felismerhető thymus lebeny fejlődött. A CAM kísérlet esetében is a fürj hámmal rendelkező thymus állományába valóban a csirke keringéséből léptek be a  $CD45^+$  és a  $74.3^+$  sejtek (**6. G, H, I kép**). Ezzel bebizonyítottuk, hogy a velőállományban lévő  $74.3^+$  nyúlványos sejtek hemopoetikus eredetűek.

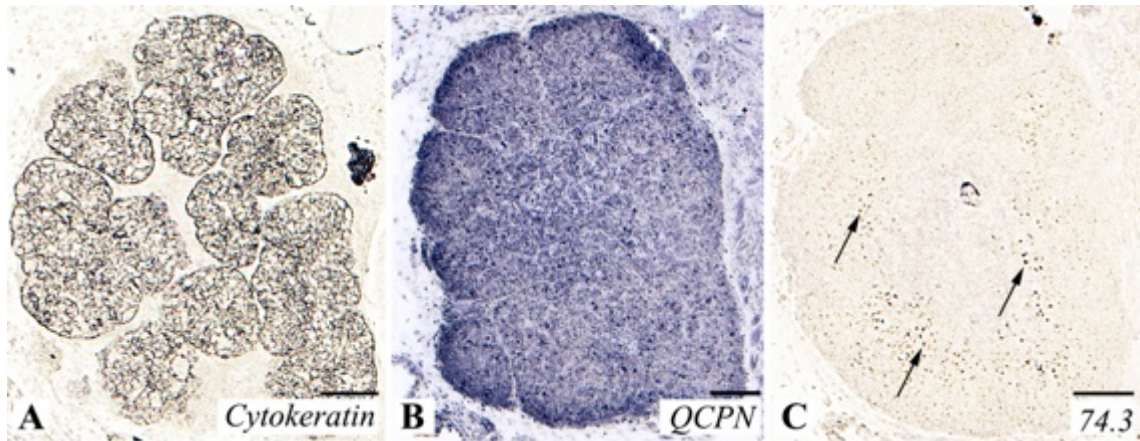
A  $CD45^-74.3^+$  sejtpopuláció eredetét fordított kiméra technika segítségével mutattuk ki, vagyis 3 napos csirke embrió 3-4. garatívet ültettünk át 3 napos fürj testüregébe. Mivel a  $74.3$  antitest csak a csirke eredetű sejteket ismeri fel, így ebben a kísérletben a fürj TDC-eket nem tudjuk kimutatni. A kiméra thymus csirke eredetű hámretikulum vázát QCPN pozitív a fürj keringéséből származó sejtek népesítették be (**7. A, B kép**). Ezen kísérlet eredményei szerint csak a kéregállományban találtunk  $74.3$  pozitív endodermális eredetű csirke sejteket (**7. C kép**).

Mind az embrionális festési mintázatok, mind a kiméra kísérletek arra engednek következtetni, hogy a  $74.3$  a thymusban valóban két populációt jelöl, vagyis a cTEC-ekben és a TDC-ekben is kimutatható.





**6. kép. A 74.3<sup>+</sup> sejtek eredete I. A-F** Fürj-csirke 17 napos embrió testüreg kiméra thymus. **(A)** 3 napos fürj embrió garatívek láthatóak, melyekből a 3-4. garatívet (késsel színezve) transzplantáltuk (nyíl) a fogadó csirke embrió testüregébe. **(B)** Anti-cytokeratinnal festett kiméra thymus. **(C)** QCPN festéssel detektált fürj sejtek a kiméra thymusban. **(D)** CD45<sup>+</sup> sejtek a thymus hámtelepében, melyek között **(E)** 74.2<sup>+</sup> makrofágok a thymus egész állományában megtalálhatóak, míg **(F)** a 74.3<sup>+</sup> sejtek kizárólag a velőállomány területére lokalizálódnak (a kéreg-velő határt a szaggatott vonal jelzi). **(F inset)** A 74.3 pozitívitás intracitoplazmatikusan jelentkezik a nyúlványos sejtekben, a sejtmag körül. **G-I** Fürj-csirke 17 napos embrió CAM kiméra thymusa. **(G)** QCPN (piros) és CD45 (zöld) kettős immunfestés kiméra thymuson. **(H)** A velőállomány területén 74.3<sup>+</sup> nyúlványos sejtek jelentek meg (a kéreg-velő határt szaggatott vonal mutatja). **(I)** A H metszet bekarikázott területe nagyobb nagyítással. Bar B-F és G-H: 100µm, F inset: 10µm, I: 20µm.



7. kép. A  $74.3^+$  sejtek eredete II. A-C Csirke-fürj 17 napos embrió testüreg kiméra thymus metszetei. (A) A thymus hámtelope cytokeratin immunfestéssel. (B) QCPN<sup>+</sup> sejtek a thymus telepében. (C) A kiméra thymus perifériás részén (jövendőbeli kéregállomány) 74.3 pozitív sejtek láthatóak (nyíl) Bar A-C: 100 $\mu$ m.

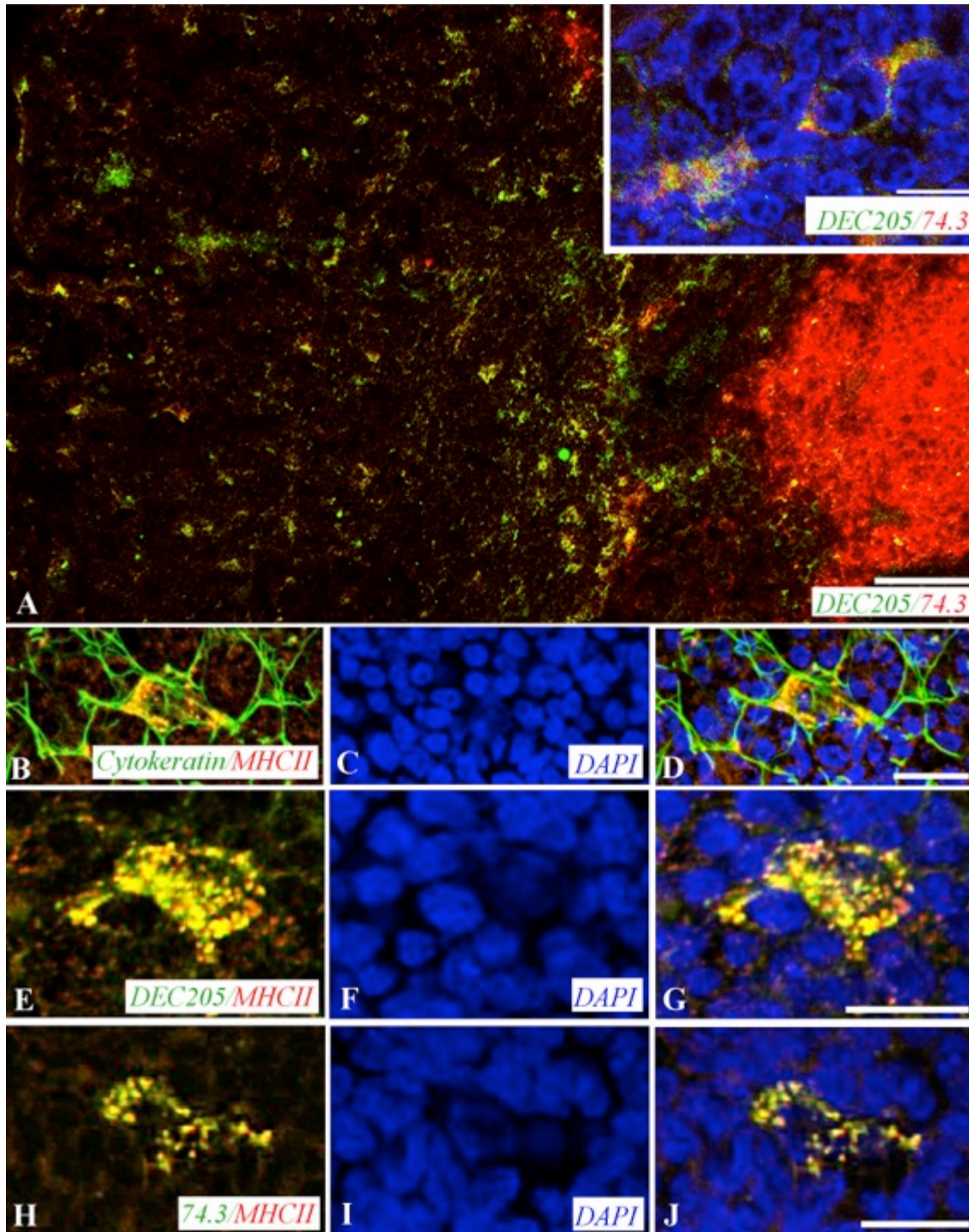
Eddigi eredményeinket összefoglalva: a kéregállományban lévő  $74.3^+DEC205^+CD45^-$  sejteket **hámsejteknek**, míg a velőállományban található  $74.3^+DEC205^-CD45^+$  sejteket DC-eknek tekintjük.

### 5.3. A KÉRGI HÁMSEJTEK VARIÁBILITÁSÁNAK JELLEMZÉSE

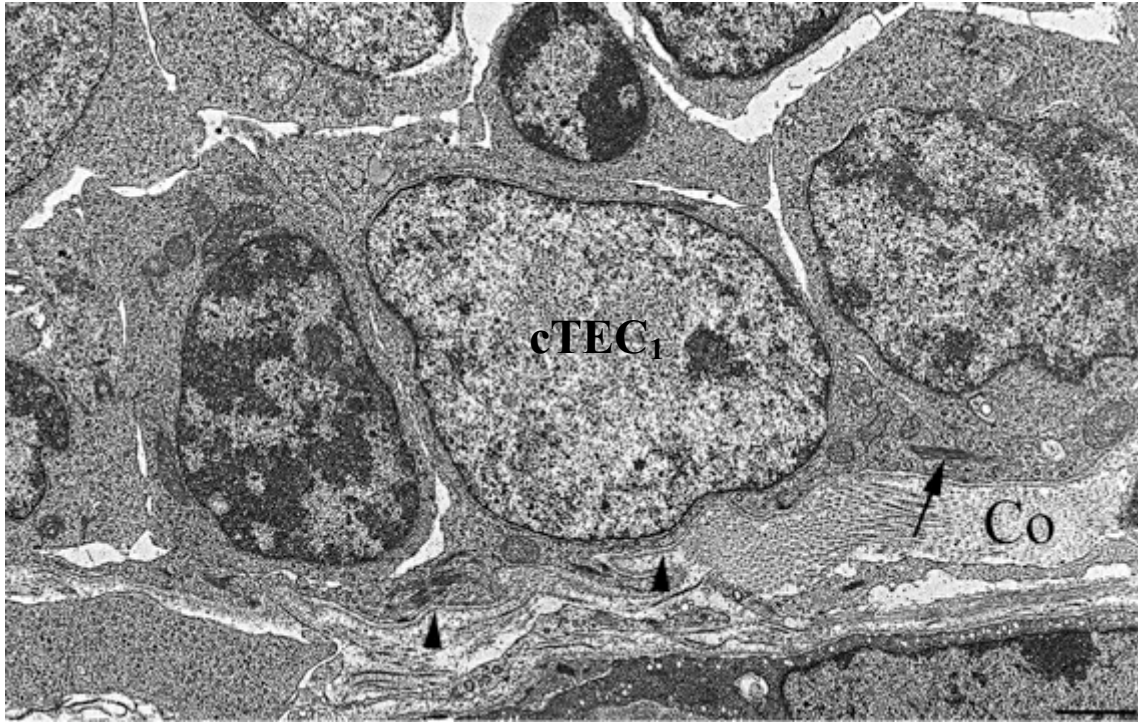
Habár eredeti célunk a TDC-ek morfológiai identifikálása és fenotipikus jellemzése volt, azonban a 74.3 pozitív antigén kéregállományban való lokalizációja a cTEC-ek irányába terelte figyelmünket. Immuncytokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a cTEC-ek a 74.3 mellet DEC205 pozitívak is (**5. F és G kép**), melyek kolokalizációt mutatnak (**8. A és inset kép**). A DEC205-nek szerepe van a cTEC-ek MHCII-höz kötött antigén prezentációjában (Jiang és mtsai 1995; Swiggard és mtsai 1995), ezért a DEC205 és az MHCII molekula koexpresszióját vizsgáltuk. A cytokeratint expresszáló hámsejtek MHCII pozitívak (**8. B, D kép**). A DEC205 és 74.3 pozitív sejtek is kolokalizációt mutatnak az MHCII molekulával (**8. E, G és H, J kép**).

Bár a cTEC-ek morfológiai jellemzése nem tartozott eredeti célunk közé, azonban elektronmikroszkóppal is karakterizáltuk a cTEC-eket. Vizsgálataink során találtunk olyan **1**; cTEC-eket (**cTEC<sub>1</sub>**), melyek citoplazmája granulumoktól mentes volt, azonban a sejtmag kromatin szerkezete és desmoszómális kapcsolatuk igazolja hám eredetüket (**9. kép**). A cTEC<sub>1</sub>-ek vagy a tok alatt helyezkednek el, vagy a sövények mentén találhatóak és membrana basalissal rendelkeznek (**9. kép**). A granulumoktól mentes citoplazmájú cTEC<sub>1</sub> mellett olyan **2**; cTEC-eket (**cTEC<sub>2</sub>**) is kimutattunk, melyek magja nagy, eukromatikus szerkezetet mutat, citoplazmájukban a különböző denzitású és méretű granulumok (**10. A, B kép**) mellett keratin filamentum jelenléte igazolja hám eredetüket.





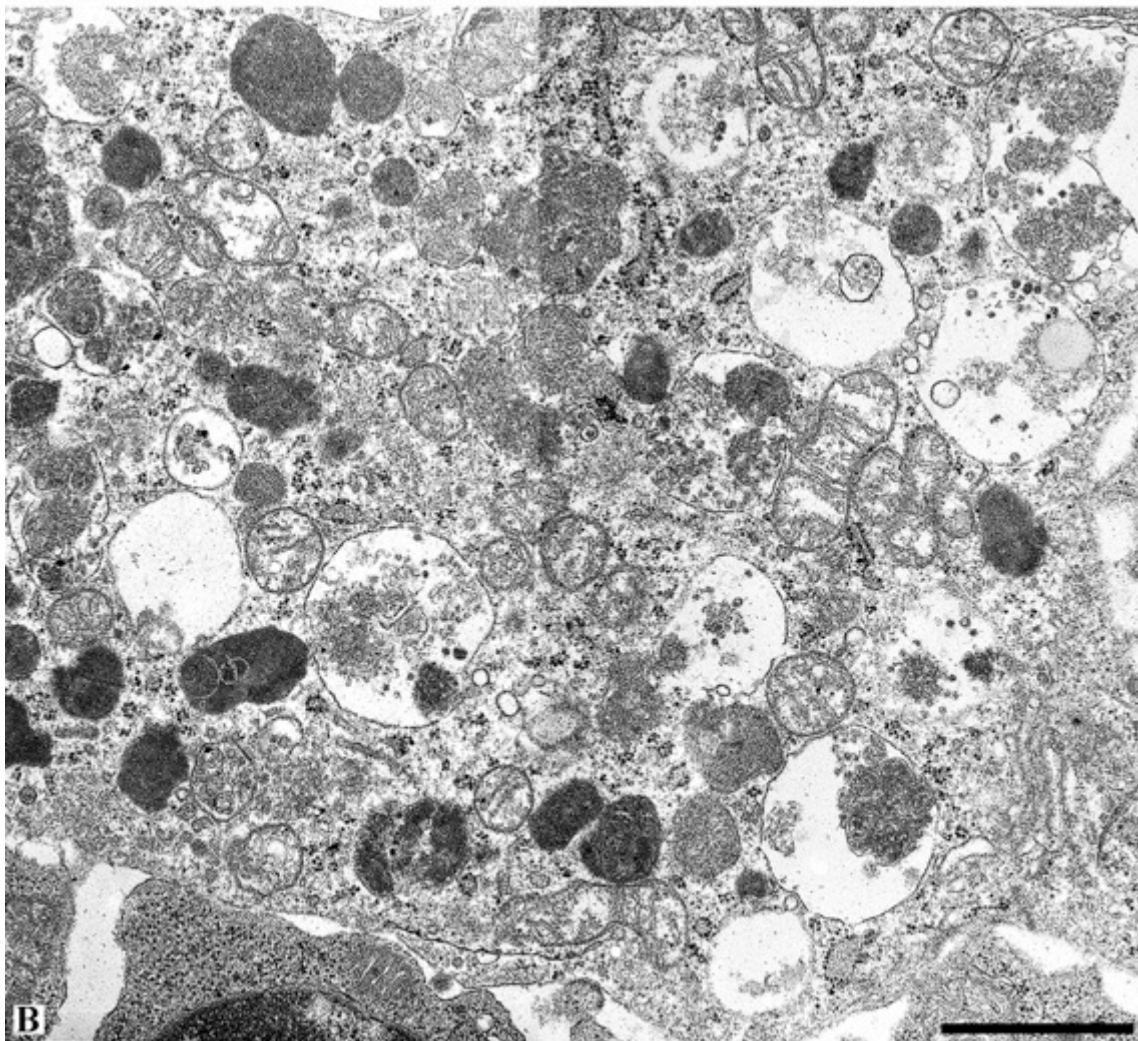
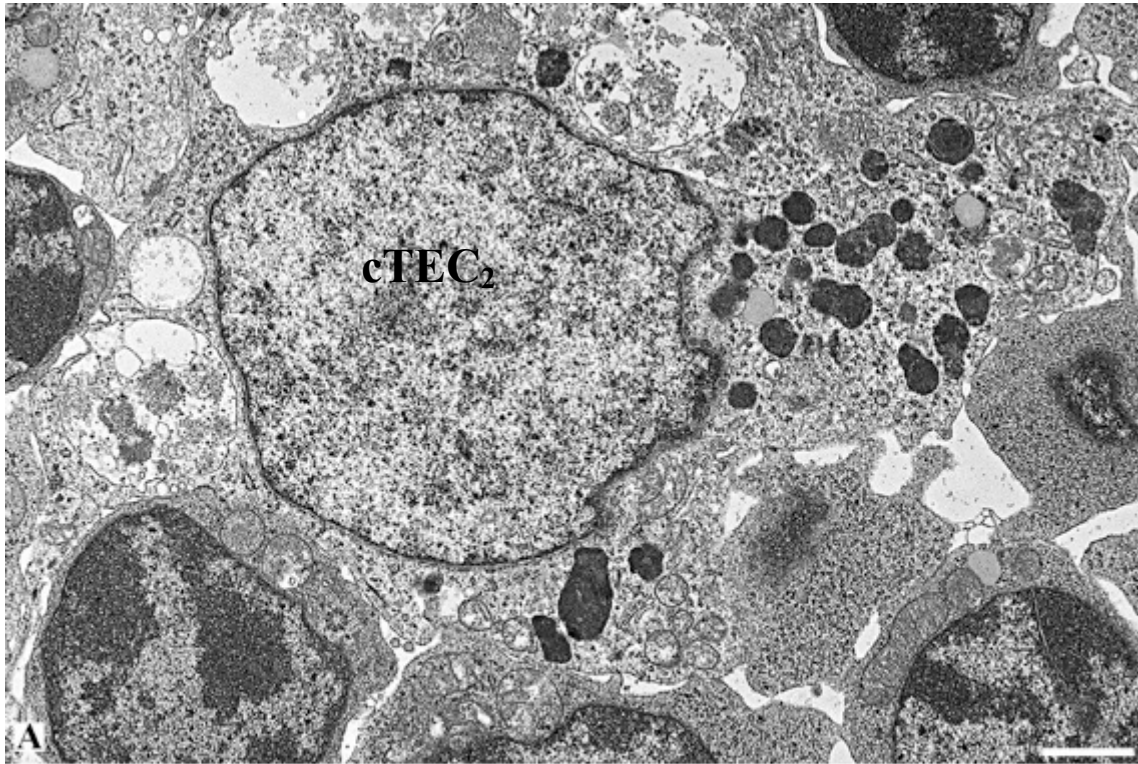
**8. kép. A cTEC-ek immunfenotípusa.** (A) A 74.3 (piros) és a DEC205 (zöld) a kéregállományban kolokalizációt mutat elszórt egyedi sejteken, ami (A **inset**) nagyobb nagyítással is látható (konfokális felvétel). (B) A cytokeratin pozitív (zöld) cTEC-ek MHCII-t (piros) expresszálnak (konfokális felvétel). (C) B kép DAPI-val festett felvétele, ami a sejtmagokat mutatja. (D) B és C kép „összejejtett” változata. (E) A DEC205 (zöld) kolokalizál az MHCII molekulával (piros) (konfokális felvétel). (F) E kép DAPI-val festett felvétele, ami a sejtmagokat mutatja. (G) E és F kép „összejejtett változata”. (H) 74.3 (zöld) MHCII (piros) kettősen pozitív sejtek a kéregállományban (konfokális felvétel). (I) H kép DAPI-val festett felvétele, ami a sejtmagokat mutatja. (J) Bar H és I kép „összejejtett változata”. A: 100  $\mu$  m, A inset, D, G és J: 10  $\mu$  m.



**9.kép. A *cTEC<sub>1</sub>* ultrastruktúrája.** Elektronmikroszkópos felvétel a *cTEC<sub>1</sub>*-ről. A thymus lebeny felszínén elhelyezkedő *cTEC<sub>1</sub>*, melynek a citoplazmájában nincs granulum. A lebenyt a *cTEC<sub>1</sub>* membrana basalisa zárja le a sötét kötőszövet felé (nyílhegy). A *cTEC*-ekre jellemző sejtmag és a keratin intermedier tonofibrillumok (nyíl) jól láthatóak. Co-kollagén kötegek metszete. Bar: 1  $\mu$  m.

**10. kép. A *cTEC<sub>2</sub>* ultrastruktúrája (A-B)** Elektronmikroszkópos felvétel a *cTEC<sub>2</sub>*-ről. Morfológiai ismertetői közé tartozik az elnyúlt alak, a nagy, halvány sejtmag, az organelumokban gazdag citoplazma, a különböző denzitású és nagyságú granulumok. **(B)** *cTEC<sub>2</sub>* citoplazma részlet. Különböző méretű, denzitású és tartalmú granulumok mellett számos mitokondrium és DER látható. Bar: 1  $\mu$  m





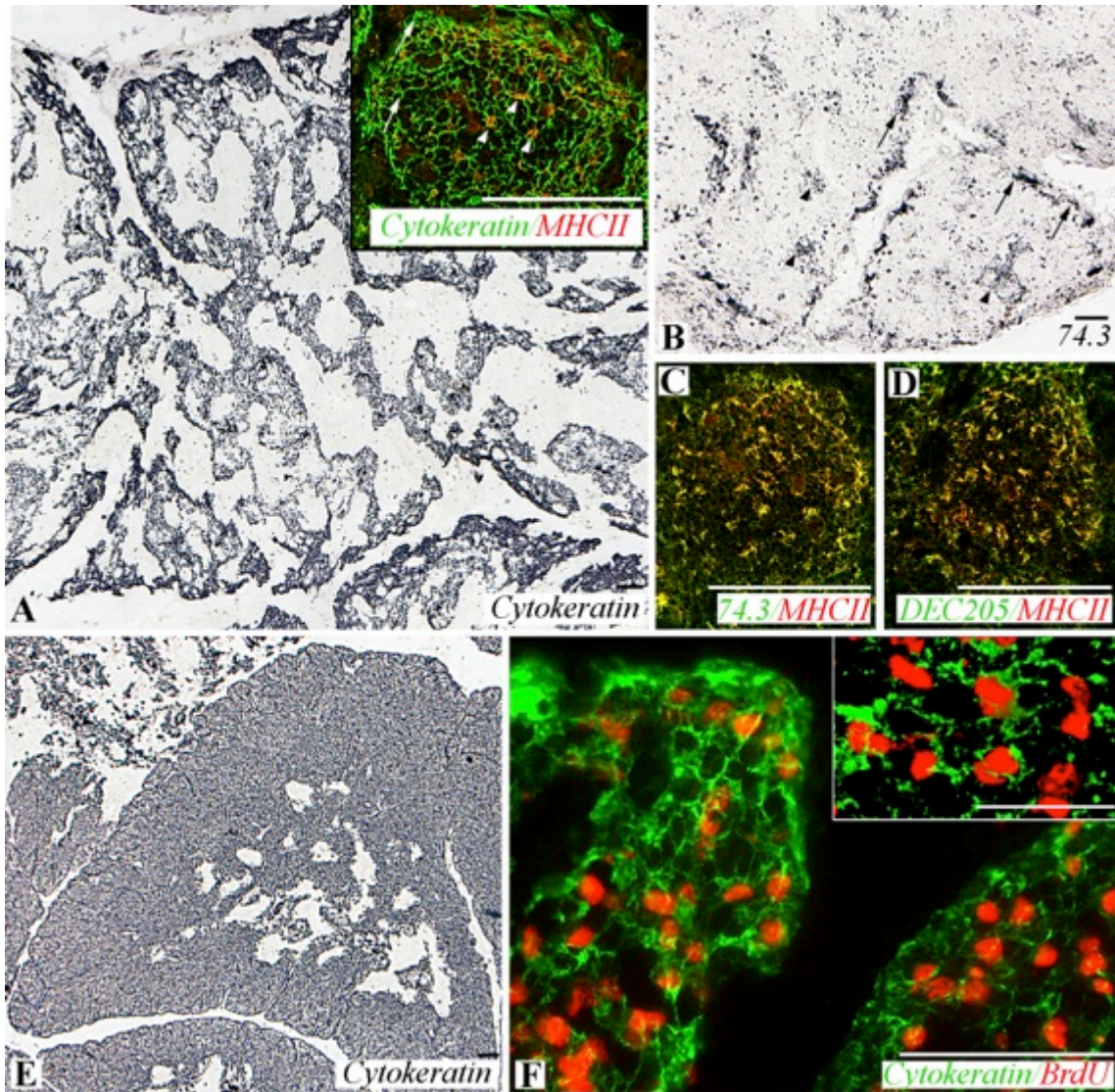
10.kép



Habár eredeti célunk a TDC-ek morfológiai identifikálása és fenotipikus karakterizálása, valamint a velőállomány kompartmentjeinek (KNA és KPN) morfológiai jellemzése volt (lsd. alább), azonban a KNA és KPN térfogateloszlási változásának előidézéséhez alkalmazott DM kezelés más útra terelte figyelmünket. A kortizon kezelés hatására a kéregállomány drasztikus hanyatlását lehet megfigyelni (**11. A kép**). A hemopoetikus sejtek depletálódása következtében a hámsejtek morfológiai változásokon mennek keresztül, melyeket immuncytokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal követtünk nyomon.

A kéregállomány szerkezete jelentősen átalakult (**11. A kép**), azonban megtartották mind az MHCII, DEC205 (nincs kép), mind pedig a 74.3 pozitívításukat (**11. A inset, B, C és D kép**). A kéregállomány elvékonyodott, azonban a velőállományban a KPN és KNA egymáshoz viszonyított térfogatszázalékos eloszlása nem változott (**5. A és B ábra**).

A kezelés befejeztével kíváncsiak voltunk, hogy a thymus hámretikuluma hogyan változik a regenerációs fázisban. Az utolsó kezelést követő 3. napon a thymus állománya regenerálódik. Az elvékonyodott kéreg újra visszanyeri eredeti alakját, morfológiáját (**11. E kép**). A regeneráció mechanikájának megértésére az utolsó (10.) kezelést követő 3. napon az állatokat BrdU injekcióval oltottuk intraperitoneálisan. A BrdU<sup>+</sup> lymphocyták mellett találtunk BrdU<sup>+</sup> proliferációra képes hámsejteket is (**11. F és inset kép**).



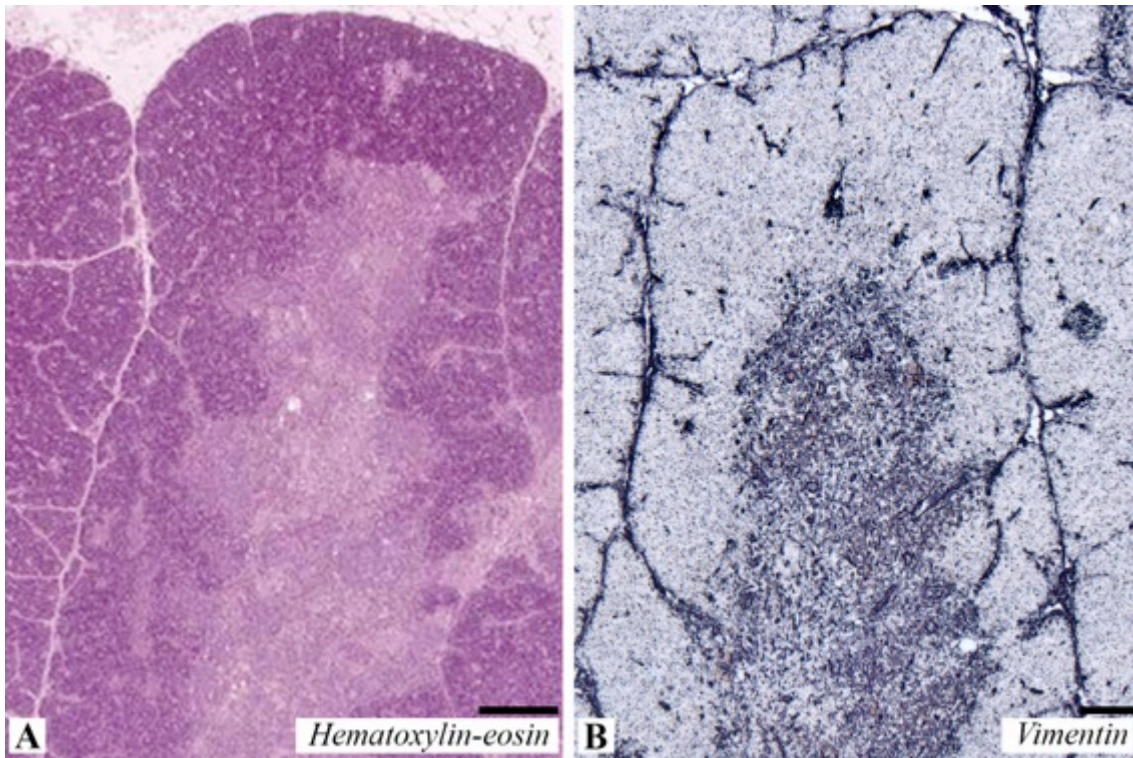
**11. kép. A cTEC-ek immunfenotípusa DM kezelést követően.** (A-D) DM-nal injektált csirke thymus metszetei, a kezelést követő 10. napon. (A) Cytokeratin immuncytokémiai festés. (A inset) (konfokális felvétel). Cytokeratin (zöld) és MHCII (piros) kettős immunfluoreszcens festés a kéregállományban. A nyílhegy a kolokalizációt adó sejteket mutatja. MHCII-t nem expresszáló sejtek – nyíl. (B) Intenzíven festődő 74.3+ sejtek az elvékonyodott kéregállományban a thymus tokja és sövényei alatt tömörülnek (nyíl). A velóállomány területén, csoportokban lokalizálódó 74.3+ sejtek (nyílhegy). (C) A kéregállomány területéről készült 74.3 (zöld) és MHCII (piros) kettős immunfluoreszcens festés konfokális felvétele. (D) DEC205 (zöld) és MHCII (piros) kettős immunfluoreszcens festés konfokális felvétele a kéregállományban. (E-F) Thymus metszetei a DM utolsó kezelést követő 3. napon. (E) Cytokeratin immuncytokémiai festés. (F) Cytokeratin (zöld) és BrdU (piros) kettős immunfluoreszcens festés a kéregállományban. (F inset) (F) kép nagyobb nagyítású konfokális felvétele. Bar A-D, A inset, B inset, C inset: 100  $\mu$  m, E: 50  $\mu$  m, E inset: 25  $\mu$  m



## 5.2. A MADÁR THYMUS VELŐÁLLOMÁNYÁNAK KOMPARTMENTALIZÁCIÓJA

### 5.2.1. A KPN és a KNA megjelenése

Hematoxylin-eosin festés alapján a thymus állománya kéreg- és velőállományra tagolható (**12. A kép**), amit az anti-vimentin festés is megerősít. A vimentin pozitív sejtek a velőállomány területén lokalizálódnak, kirajzolva a klasszikus hisztológiai kéreg-velő kompartmenteket (**12. B kép**).

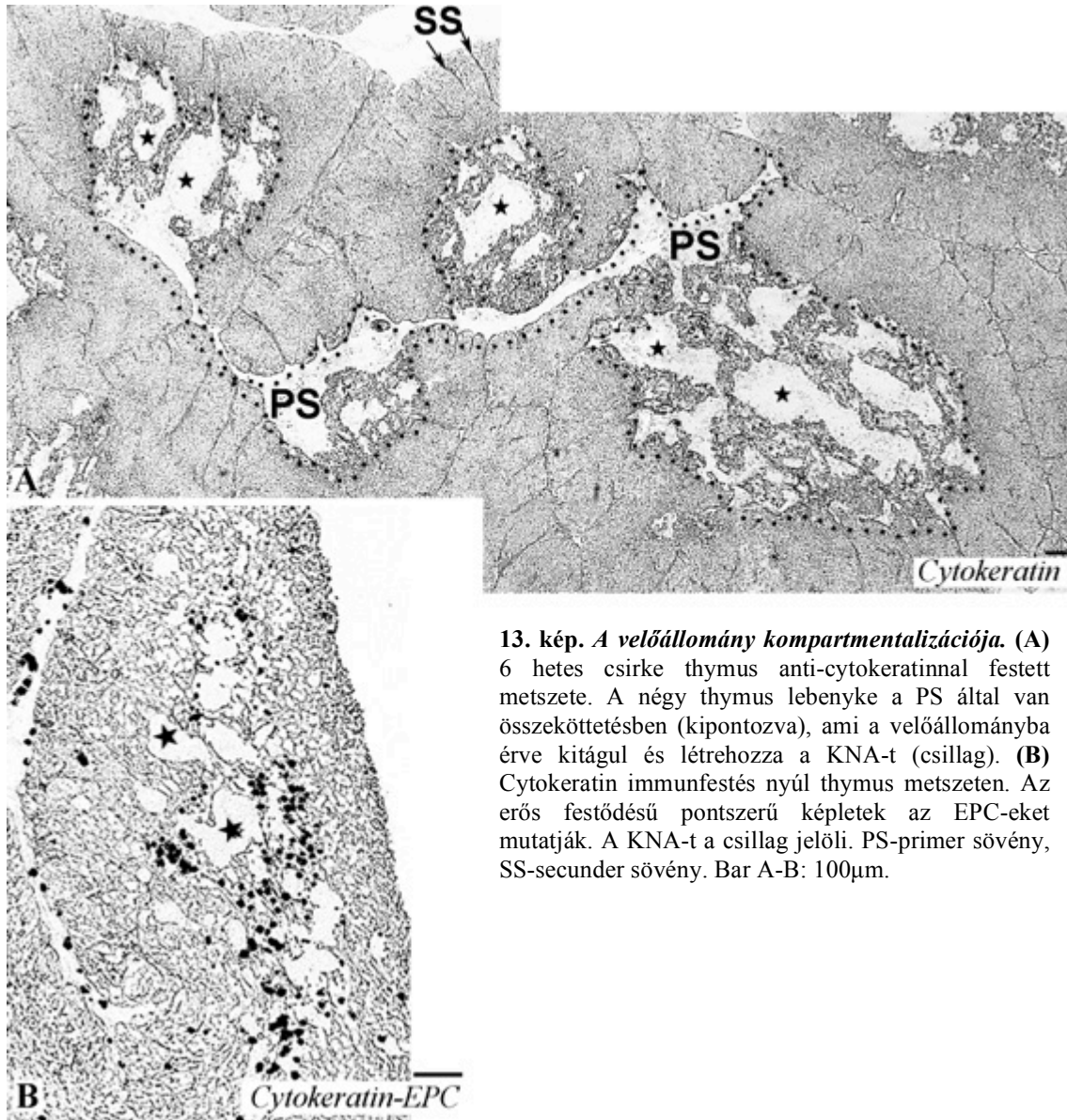


**12. kép.** (A) 6 hetes thymus hematoxylin-eosin és (B) anti-vimentin immunhisztokémiai festése. Bar A-B: 100  $\mu$  m

A thymus endodermális hámrétikulumból áll, melyben a T-sejtek érése és immunkompetens sejté válása történik. A TDC-ek szerepet játszanak a szelekciós folyamatokban, ezért viszonyuk a hámrétikulumhoz alapvető jelentőségű. Ez a tény igényelte, hogy megvizsgáljuk a TDC-ek és a hámrétikulum topográfiai helyzetét. A hámsejtek keratin intermedier filamentumai biztos alapot szolgáltatnak meghatározásukban. A cytokeratin festés meglepő képet adott a velőállományban: cytokeratin pozitív kötegek - melyek összeköttetésben vannak a kéreg hámrétikulumával – szövik át a velőállományt, mint keratin pozitív hálózatot (keratin

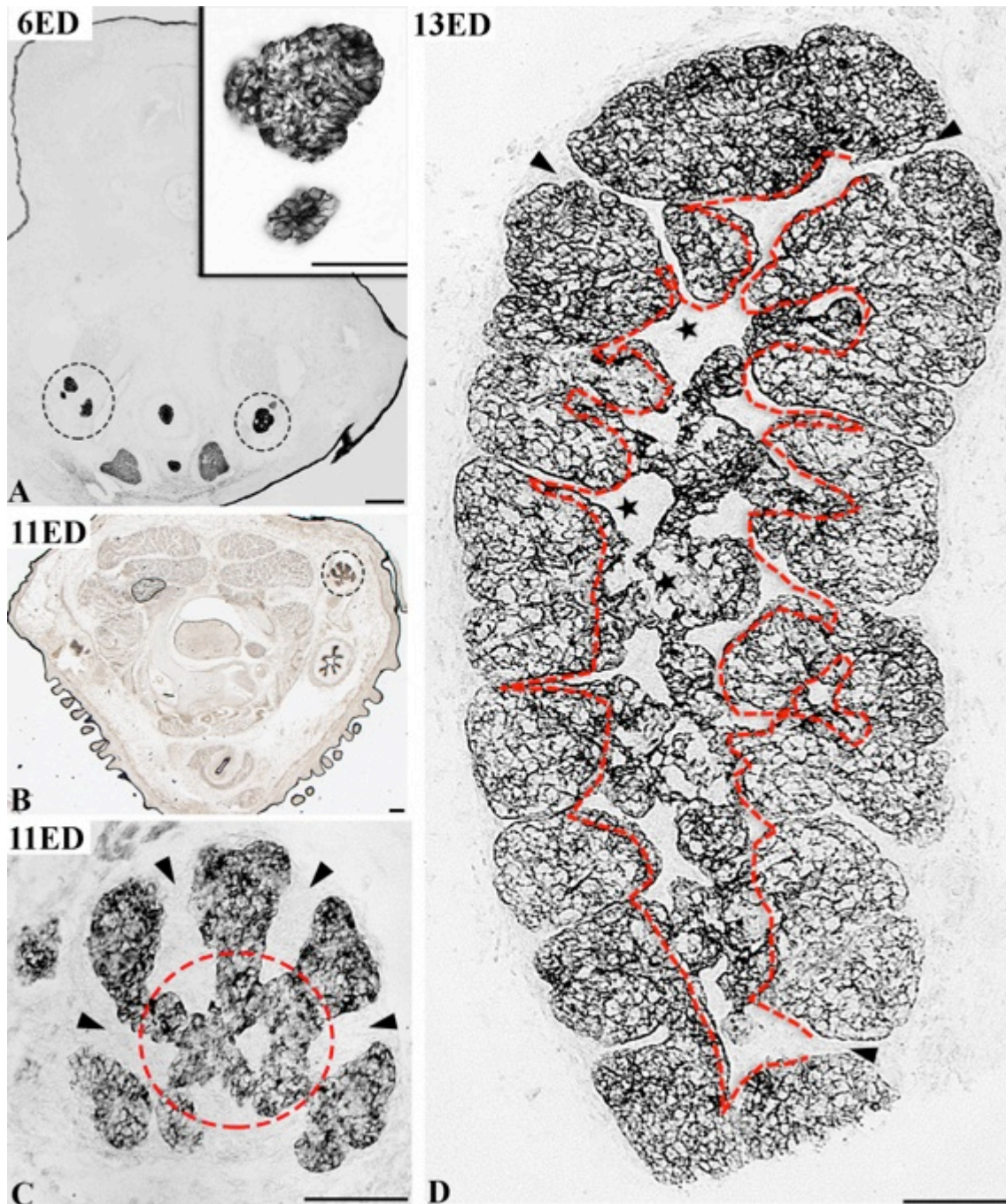
positive network-KPN) képezve, míg a hálózat hézagait keratin negatív területek (keratin negative area-KNA) töltik ki (**13. A kép**). A velőállomány hámretikulum mentes területei (KNA) valószínűleg folyamatosak a kötőszöveti sövetekkel. Ezeket a már korai embrionális korban megjelenő söveteket primer söveteknek (PS) neveztük el (**13. A kép**). A cytokeratin festés azt mutatja, hogy a madár thymus velőállománya szövettanilag két különböző egységből épül fel: a kéreggel összefüggő keratin pozitív hálózatot (KPN) olyan területek szakítják meg (**13. A kép**), ahol nincs keratin expresszió (KNA). A madár thymus velőállományának keratin pozitív (hámretikulum) és keratin mentes (hámretikulum hiányos) területeinek elkülönülése felvetette azt a kérdést, hogy a velőállomány kompartmentalizációja madár specifikus-e vagy egy általános hisztológiai tulajdonsága a thymusnak. Ez a felvetés indokolta, hogy az emlős thymust is cytokeratin immunfestéssel megvizsgáljunk. Ezen immunfestések alapján a velőállomány KNA-ei nemcsak madárban, de emlősben (nyúl) (**13. B kép**) is kimutathatóak.

A velőállomány KPN- és KNA-ra való elkülönülése indokolta az embrionális vizsgálatokat, valamint arra a kérdésre kerestük a választ, hogyan fejlődik a thymus hámretikuluma és mikor jelenik meg a KNA? Az embrionális fejlődés 6. napján a thymus homogén hámretikulummal rendelkezik (**14. A és inset kép**), majd a 11. napon a sarjadzásnak induló hámköteg faagszerűen elágazódik (**14. B, C kép**). Az embrionális thymus telep centrális részéből (**14. C kép**) alakul ki a későbbi velőállomány, ami összeköti az elágazódó hámkötegeket, melyekből a leendő kéregállomány fejlődik. A fejlődés 13. napján a PS-ek közvetlen folytatásaként cytokeratin pozitivitást nem mutató területek jelennek meg (**14. D kép**), melyek a KNA kezdeményei. A fejlődés későbbi szakaszában a PS-ek közelében erősebb cytokeratin festődésű hámsejtek tömörülése látható, melyekből kialakul a későbbi KPN (**15. kép**). A PS-ekkel szemben a kialakult kéregállományban olyan sövetek jelennek meg (**13. A kép**), melyek rövidek és nem érik el a velőállomány területét. Rendszerint vérereket nem tartalmaznak, ellentétben a PS-ekkel. Ezeket a söveteket secunder söveteknek (SS) neveztük el.

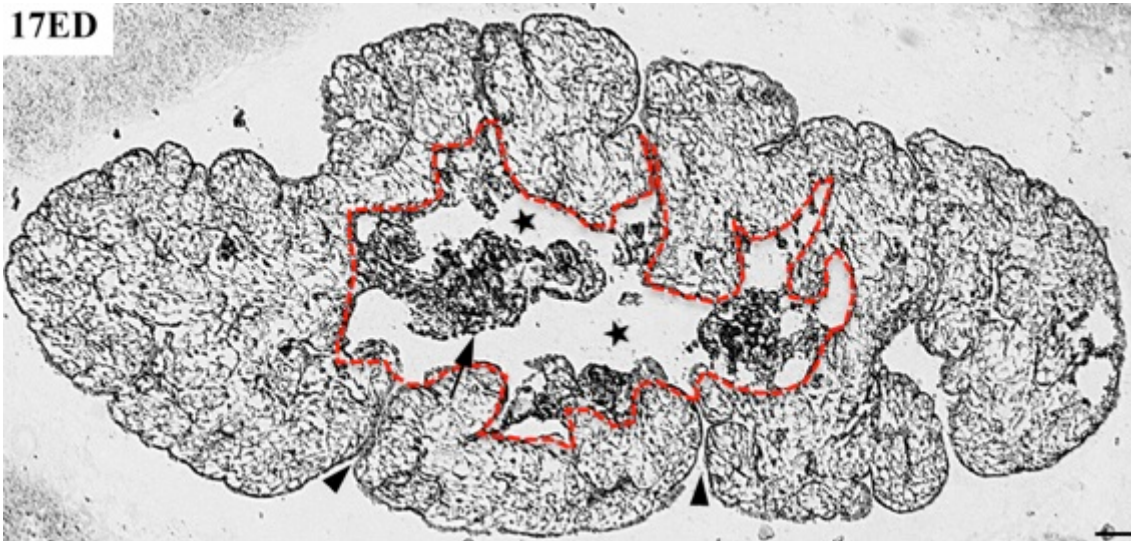


**13. kép. A velőállomány kompartmentalizációja. (A)** 6 hetes csirke thymus anti-cytokeratinnal festett metszete. A négy thymus lebenyke a PS által van összeköttetésben (kipontozva), ami a velőállományba érve kitér és létrehozza a KNA-t (csillag). **(B)** Cytokeratin immunfestés nyúl thymus metszeten. Az erős festődésű pontszerű képletek az EPC-eket mutatják. A KNA-t a csillag jelöli. PS-primer sötét, SS-secunder sötét. Bar A-B: 100 $\mu$ m.





**14. kép.** *A fejlődő thymus hámtelepének differenciálódása cytokeratin festéssel.* (A-D) Cytokeratin immunfestés. (A) 6 napos csirke embrió nyak keresztmetszete. A bekarikázott területek a fejlődő thymust mutatják. (A *inset*) Thymus részlet az A képről nagyobb nagyítással. (B) 11 napos csirke embrió nyak keresztmetszete. A bekarikázott struktúra a thymust jelöli, amit a (C) képen kinagyítva lehet látni. Nyílhegy jelzi a későbbi primer sővények kezdeményét. A szaggatott vonalon kívül eső terület a későbbi lebenyék kéregállományát ábrázolja, a körön belül pedig a fejlődő velőállomány látható. (D) 13 napos csirke embrió thymusa. A primer sővények kitágulása a velőállomány KNA-ét adja. Szaggatott vonal jelzi a kéreg- és velőállomány határát. KNA-csillag, PS-nyílhegy. Bar A-B: 200  $\mu$  m, A *inset*: 50  $\mu$  m, C-D: 100  $\mu$  m.

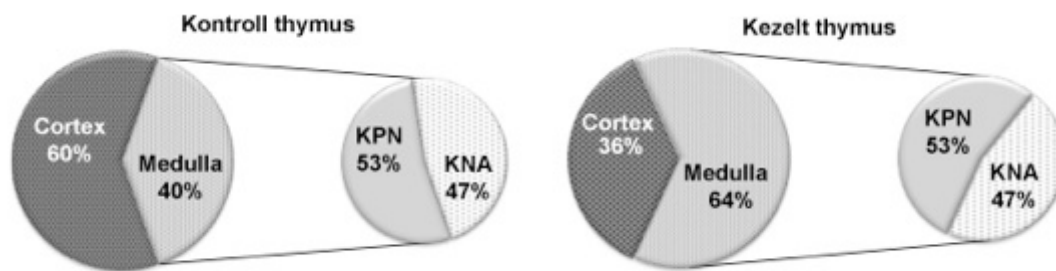


**15. kép.** 17 napos csirke embrió thymus keresztmetszete anti-cytokeratin festéssel. A KPN-t alkotó hámsejtek keratin intermedier filamentum tartalma nagyobb, mint a kérgi hámsejteké, ezért intenzívebb reakciót adnak. Szaggatott vonallal a kéreg-velő határ van jelölve. KNA-csillag, KPN-nyíl, PS-nyílhegy. Bar: 200  $\mu$  m.

A velőállományban található, közvetlen az ereket körülölelő tereket – perivascularis tereket ganglionléc származékoknak tekintik (Müller és mtsai 2008). Annak kimutatására, hogy a KNA nagyobb, mint a perivascularis tér, morfometriai mérést végeztünk. A kéreg- és velőállomány, valamint a KPN és KNA területeinek, illetve térfogatainak kvantifikálását a sztereológiai Cavalieri módszerrel analizáltuk. Morfometriás eredményeink szerint a kéregállomány aránya a lebeny összterfogatához képest 60%, a maradék 40%-ot pedig a velőállomány foglalja el. A velőállományban található további két kompartment –KPN és KNA- egymáshoz viszonyított százalékos eloszlása 53% (KPN) és 47% (KNA) (**5. A ábra**). Irodalmi adatok szerint DM kezelés hatására a perivascularis tér megnő (Gameiro és mtsai 2010). Annak igazolására, hogy a KNA nem egyezik meg a perivascularis térrel, DM kezelést alkalmaztunk. Az akut involúció előidézése következtében, amit a lebenyek kisebb mérete, az éretlen CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-sejtek depléciója és a kéregállomány elvékonyodása mutat (**20. F kép és 11. A kép**). A kéreg-velő aránya a kezelt állatok thymusában felcserélődik. A kéregállomány a thymus 36%-át adja, a velőállomány pedig a 64%-át (**5. B ábra**). Arra is kerestük a választ, hogy vajon a glycocorticoidok indukálta involúció során az ECM mennyiségének növekedésével (Gameiro és mtsai 2000) a KNA expanziója is

megfigyelhető-e. Számításaink kiértékelésekor egyértelművé vált, hogy az ECM molekulák (fibronectin, tenascin) mennyisége felhalmozódik (**20. G, H kép**), azonban a KNA területe nem nő meg (**5. B ábra**), szemben az irodalomban leírt perivasculáris térrel (Gameiro és mtsai 2010).

Habár a velőállomány mérete is csökkent a kortizon hatására, azonban az azt alkotó KPN és KNA területeinek aránya változatlan maradt: 53% KPN és 47% KNA (**5. B ábra**).



**5. ábra A**

**5. ábra B**

Térfogati arányok a (A) kontroll és a (B) DM kezelt csirke thymus kéreg- és velőállományában, illetve a KPN- és KNA-ban.



### **5.2.2. A KPN és az abból kialakult struktúrák: a Hassall test és a cysta**

A velőhámsejtek (mTEC) az egységes kérgi hámsejthálózat közvetlen folytatásaként alkotják a velőállomány KPN-át, amit a KNA szakít meg (**16. A kép**). A mTEC-ek a keratin mellett MHCII pozitívak is, azonban nem expresszálják a DEC205 (**1. D kép**) molekulát és a 74.3-at (**1. C kép**), mint a cTEC-ek.

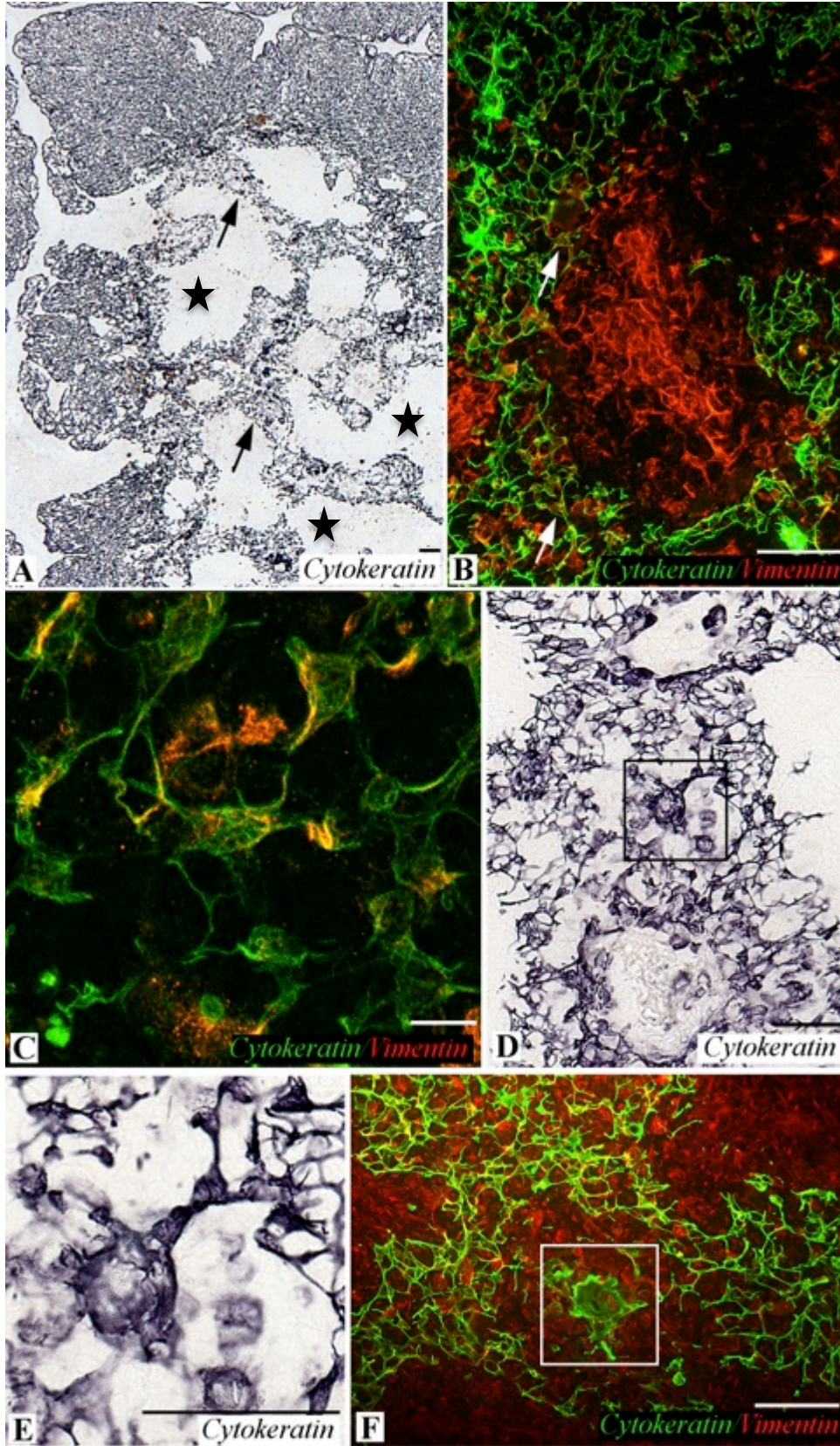
A cTEC-el csak keratin intermedier filamentumot termelnek, ellenben a KPN felszíni hámsejtjeivel - vagyis azok a mTEC-ek, melyek közvetlenül a KPN-KNA határán lokalizálódnak -, melyek a cytokeratin mellett a flexibilisebb vimentin intermedier filamentumot is produkálják (**16. B, C kép**).

A cytokeratin immunfestés során a KPN sejtjei között HB-eket találtunk (**16. D, E kép**). A HB-eket alkotó sejtek hagymalevélszerűen összetömörödnek (**16. D, E, F kép**), melyek mindig a KPN „belső” területén helyezkedtek el. A KPN ezen belső hámsejtjeinek citoplazmájában turnover-ük során felhalmozódik a keratin tonofibrillum (**16. D, E kép**), azonban nem expresszálnak vimentin intermedier filamentumot (**16. F kép**).

A KPN széli sejtjei „fogazottá” válnak. Laminin immunfestéssel ezeken a területeken - a velőállomány KNA-e körül található KPN felszíni hámsejtjei esetében - a basalis membrán szakadozottá válik (**17. A, B, C kép**). Vagyis a KNA-t – ahol az artériát és vénákat találjuk - egy nem folyamatos basalis lamina választja el a KPN-től, amit cytokeratin és laminin kettős immunfluoreszcens festéssel mutattunk ki (**17. D kép**).

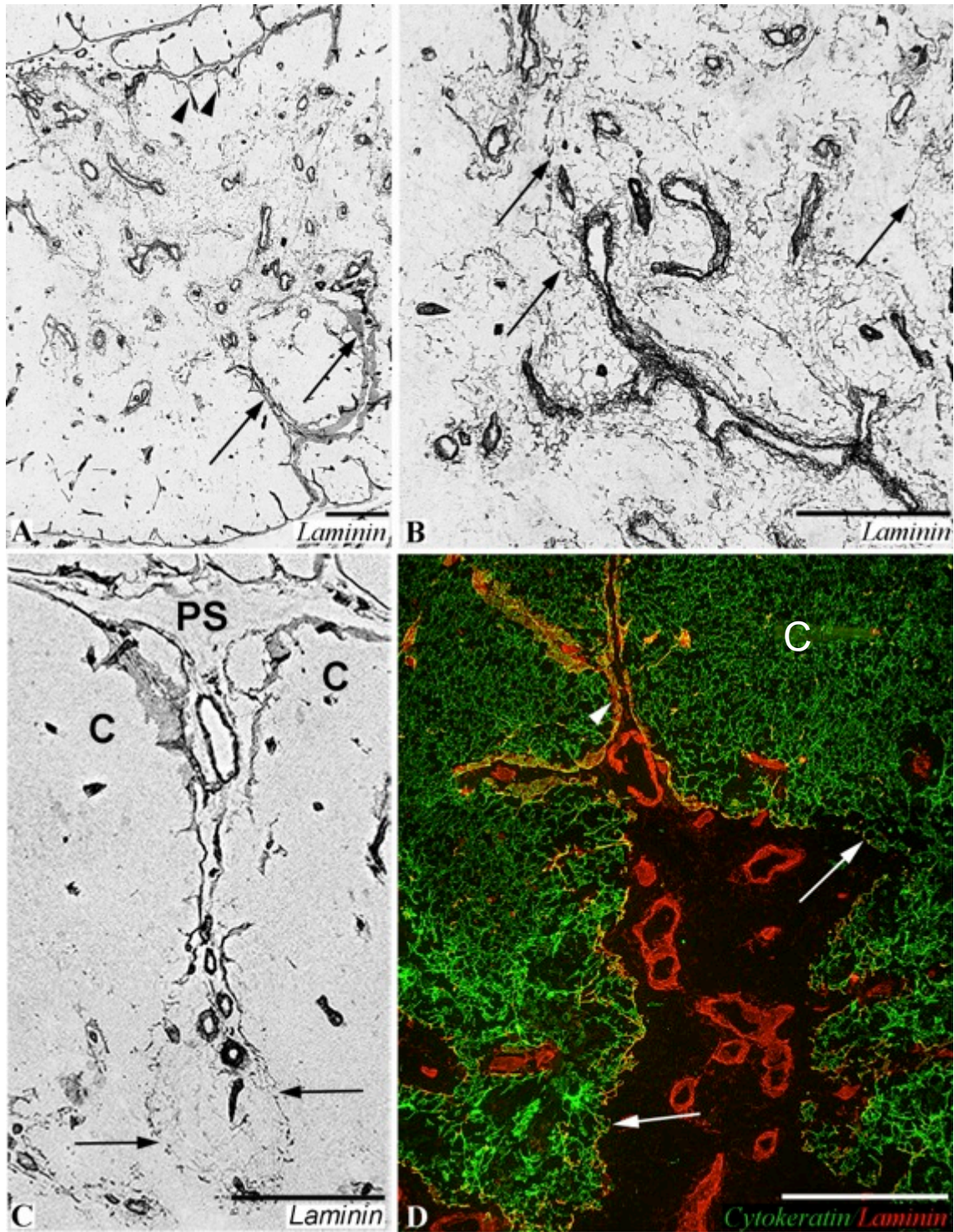
---

**16. kép. A KPN karakterizálása I.** (A) 6 hetes csirke thymus cytokeratin immunfestése. A kéregállomány hámretikuluma egységes festődést mutat, ezzel szemben a velőállomány a KPN-re (nyíl) és KNA-ra (csillag) különül. (B) Cytokeratin (zöld) és vimentin (piros) kettős immunfluoreszcens festés a thymus velőállományában. A sárga szín jelzi a két molekula kolokalizációját (nyíl) a KPN felszínén. (C) Nagy nagyítású konfokális felvétel a cytokeratin (zöld) és vimentin (piros) kettősen pozitív sejtről. (D-F) Cytokeratin immuncytokémiai festés 8 hetes gyöngytyúk thymus velőállományán. (D) Bekeretezve egy Hassall test kinagyított képe látható az (E) képen. (F) Cytokeratin (zöld) és vimentin (piros) kettős immunfluoreszcens festés a thymus velőállományából. A bekeretezett Hassall test vimentin negatív. Bar A-B és D-F: 50µm, C: 10µm.



16. kép





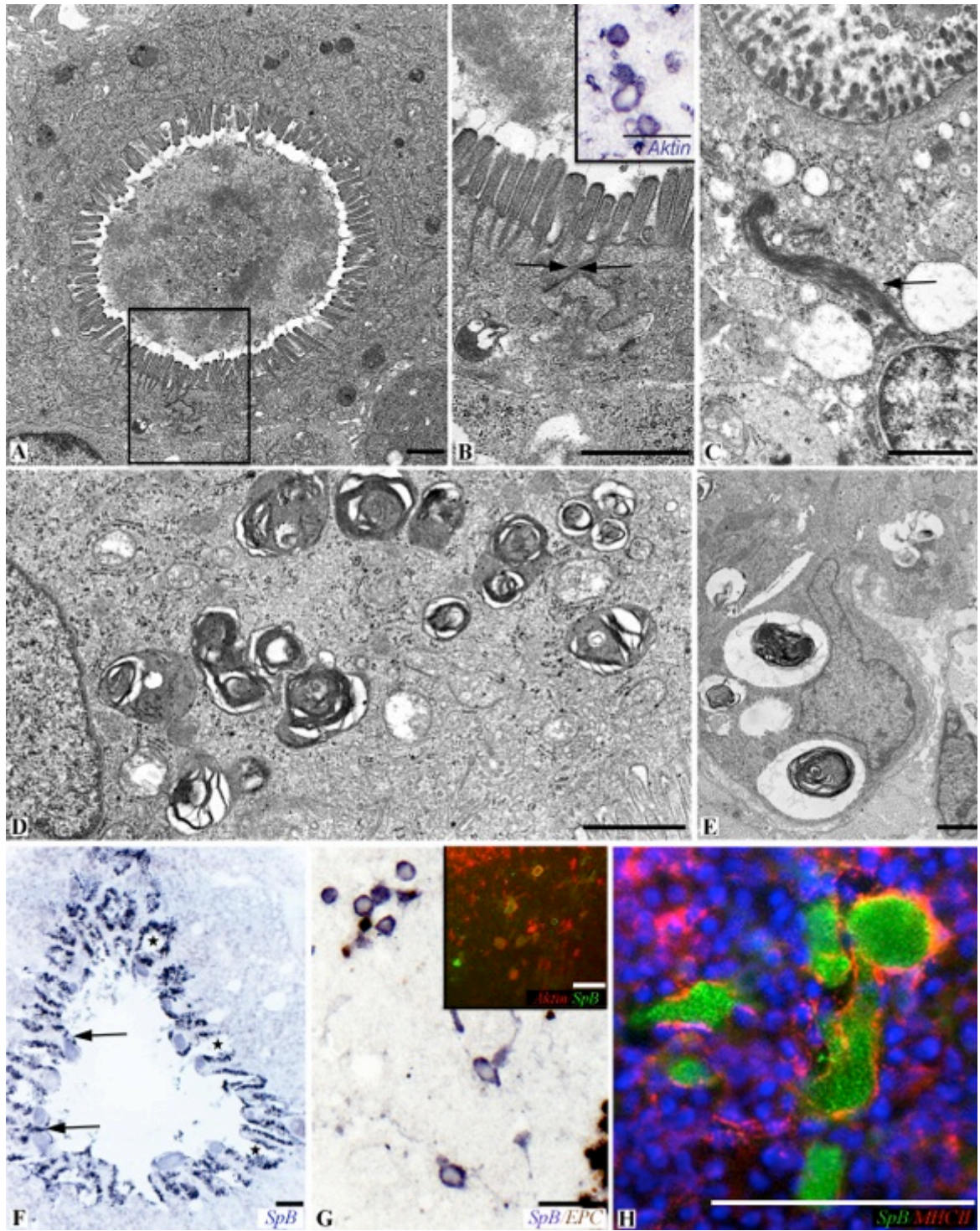
**17. kép. (A-C)** 6 hetes csirke thymus laminin immuncytokémiai festése. **(A)** Átnézeti kép a thymusról. PS-nyíl, SS-nyílhegy. **(B)** Részlet a velőállomány területéről. A nyilak a felszakadozott membrana basalisra mutatnak. **(C)** Részlet a kéreg-velő határról. A tok és a PS lamina basalis folyamatos, addig a KNA-t körülölelő membrana basalis fensztrálttá válik (nyíl). **(D)** Cytokeratin (zöld) és laminin (piros) kettős immunfluoreszcens festés. A PS membrana basalis folyamatos (nyílhegy), míg a KPN széli hámsejteké felszakadozott (nyíl). Erek kizárólag a KNA-ban találhatóak. C-cortex, PS-primer sővény, SS-secunder sővény. Bar: 100  $\mu$  m.

A mTEC-ek egy másik fejlődési útvonalának eredménye lehet a cystaképződés. A cysták apikális felszínét mikrobolyhok képezik (**18. A kép**), melyekben aktin található (**18. B inset kép**). A mikrovillusok tengelyében haladó filamentumok a sejt apikális részén található terminal web mikrofilamentum rendszerében rögzülhetnek (**18. A, B, C kép**). Számos esetben a cystát alkotó sejtek citoplazmájában (**18. D kép**) a tüdő II. típusú pneumocytáira (**18. E kép**) jellemző, myelinszerű struktúra látható. A II. típusú pneumocyták surfactant B-t (SP-B) (**18. F kép**) is termelnek, ami a tubuláris myelin alkotója. A cysták ultrastrukturális morfológiája alapján – myelinszerű képletek a citoplazmában -, valamint annak ismeretében, hogy a cysták szövetspecifikus antigéneket (TRA) is termelhetnek (Dooley és mtsai 2005a, b), többek között SP-A-t és SP-B-t, anti-SP-B immunfestést végeztünk. Vizsgálataink során kerek sejtek csoportosulását figyeltük meg a thymus velőállományában (**18. G kép**). A cysták mikrovillusaiban aktin filamentumok húzódnak, amit anti-aktin immunfestéssel mutattunk ki (**18. B inset kép**). Annak bizonyítására, hogy az SP-B-t valóban a cysták expresszálják, kettős immunfluoreszcens festést végeztünk SP-B-vel és aktinnal, melyek egy sejten belüli kolokalizációt mutattak (**18. G inset kép**). A cysták további immunmorfológiai karakterizálása során kimutattuk, hogy az emlős irodalommal megegyezően (Dooley és mtsai 2005a), a madár thymus cystáit alkotó hámsejtek is MHCII<sup>+</sup> (**18. H kép**).

---

**18. kép. A KPN karakterizálása II, a cysták morfológiai jellemzői. (A-D)** Elektronmikroszkópos felvételek 6 hetes csirke thymus velőállományában lévő cystákról. **(A)** Multicelluláris cysta mikrobolyhokkal. A cysta üregét közepesen elektron sűrű anyag tölti ki. **(B)** Az A képen bekeretezett területről készült nagyobb nagyítású felvétel. Nyíl - A sejtek laterális membránjai interdigitációval kapcsolódnak egymáshoz. **(B inset)** Aktin kimutatása a cystákban immuncytokémiai festéssel. **(C)** A cysta sejtek citoplazmájában tonofibrillumok találhatóak (nyíl). **(D)** A citoplazmában feltekeredett, myelinszerű struktúrák találhatóak, melyek morfológiai szerkezete megegyezik **(E)** a csirke tüdő II. típusú pneumocyták citoplazmájában lévő granulomokéval. **(F)** Anti-SP-B immuncytokémiai festés 8 hetes csirke tüdején. Az atriumokban (csillag) és a parabronchusokban (nyíl) SP-B pozitivitás látható. **(G)** Részlet 6 hetes csirke thymus velőállományából, anti-SP-B immuncytokémiai festéssel. A barna színreakció az EPC-eket jelöli, melyek mellett kerek SP-B pozitív cysták láthatóak (kék). **(G inset)** Aktin (piros) és SP-B (zöld) kettős immunfluoreszcens festés. **(H)** SP-B (zöld) és MHCII (piros) kettős immunfluoreszcens festés. Bar A-E: 1  $\mu$  m, B inset, F-H: 50  $\mu$  m.

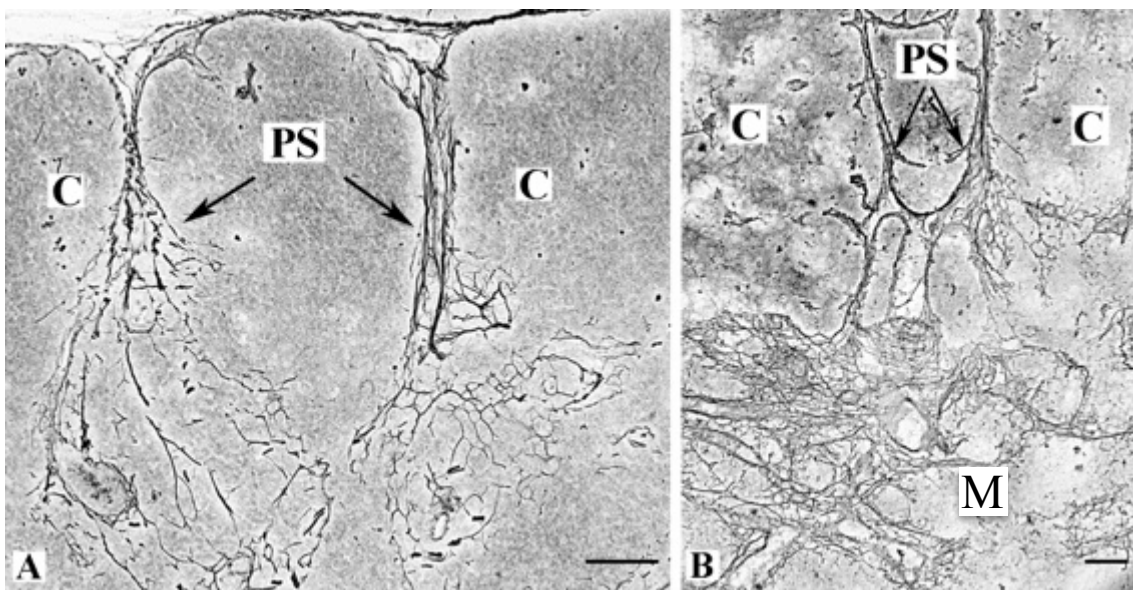




18. kép

### 5.2.3. A keratin negatív területek morfológiai karakterizálása

Amikor nyilvánvalóvá vált, hogy a KNA területein nem találunk hámretikulumot, a következő kérdésre kerestük a választ: ha nem hámszövetet, akkor milyen típusú szövetet találunk a KNA területein? A perifériás nyirokszövetek vázát a retikuláris kötőszövet alkotja, melynek alapját a rácsrostok képezik. A rácsrostok klasszikus kimutatásának módja az ezüst impregnáció. A Gömöri-féle technikával a ganglionléc eredetű területeken, vagyis a tokban, a PS-ekben és a KNA területein rácsrostokat mutattunk ki (**19. A, B kép**), melyet a III. típusú kollagén jelenléte is megerősített (**20. A kép**).

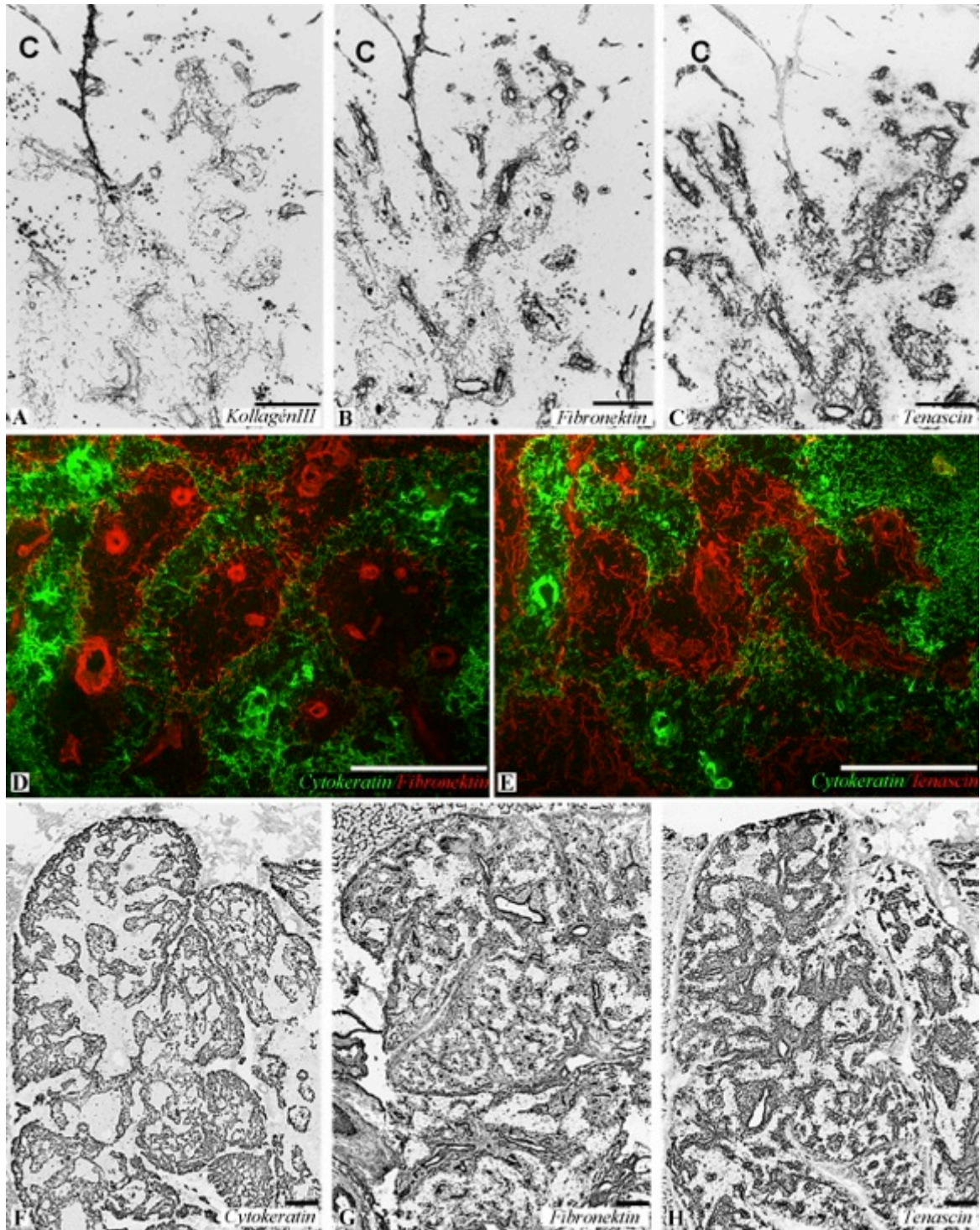


19. kép. Rácsrostok kimutatása Gömöri féle ezüst impregnációval. (A-B) A kéregállomány rácsrost mentes, szemben a velőállománnyal, ahol a KNA területén megjelennek a rácsrostok. PS-primer sötétség, C-kéregállomány, M-velőállomány. Bar: 200  $\mu$  m

A KNA támasztó elemét képező rácsrostok igazolása után kíváncsiak voltunk, vajon a kötőszövetre jellemző extracelluláris mátrix (ECM) elemei is jelen vannak-e ezen a területen, azaz a perifériás nyirokszervekre jellemző hisztológiai szerkezettel állunk-e szemben. Két alapvető ECM elemet vizsgáltunk: a fibronectint (**20. B kép**), ami a lymphocita migrációhoz szükséges elem, és a tenascint (**20. C kép**), ami pedig gátolni képes a sejt-vándorlást, így migrációt szabályozó szerepe van. A festési eredmények szerint mind a fibronectin mind pedig a tenascin a tok, a PS-ek és azok tágulatainak, vagyis a KNA területén expresszálódnak (**20. D, E kép**).

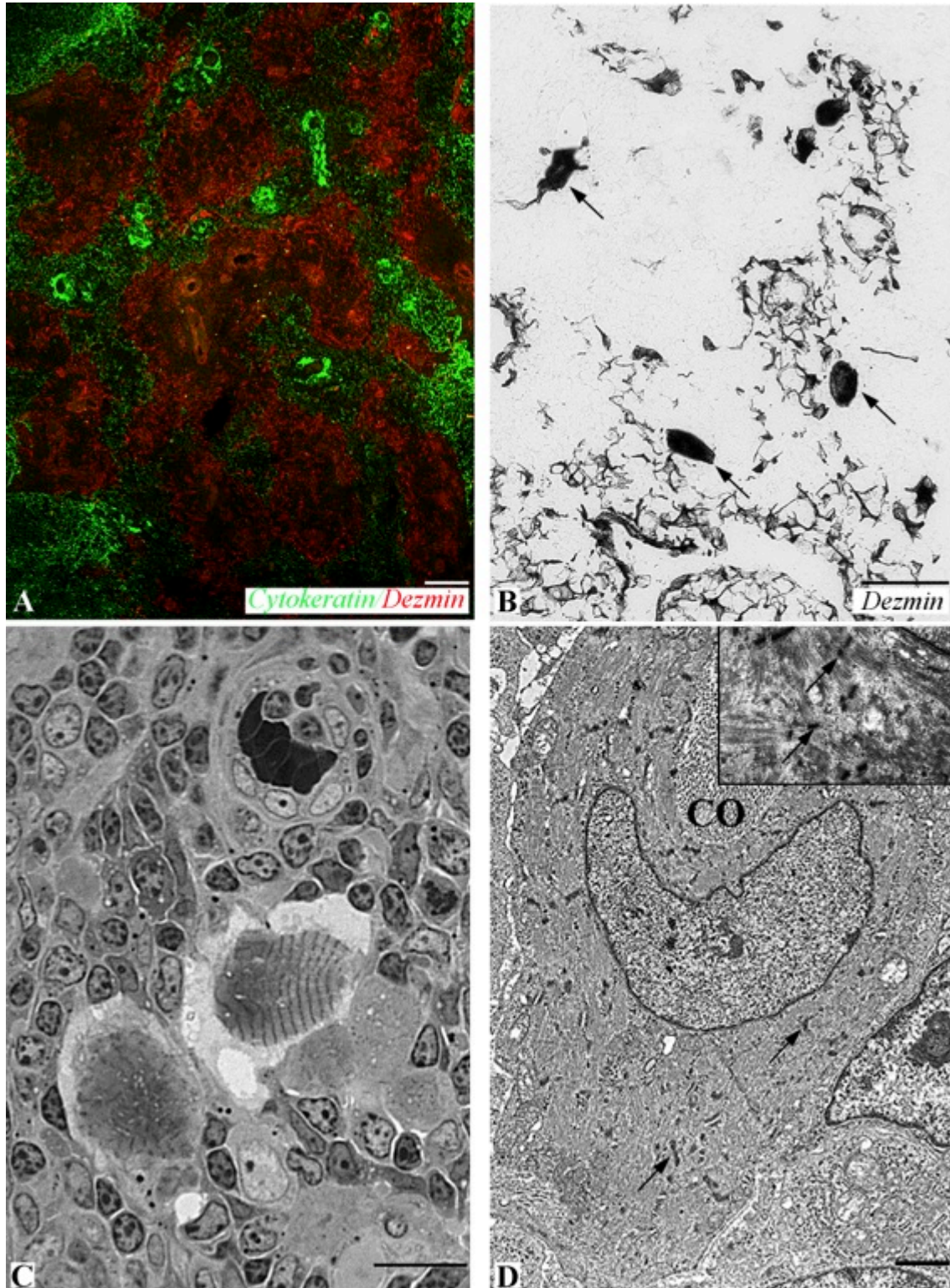
A KNA eredetének további igazolására a ganglionléc eredetű myoid sejtek (Nakamura és Ayer-Le Lièvre 1986) lokalizációját vizsgáltuk. A thymus velőállományára jellemző sejttípus a myofilamentumokat tartalmazó myoid sejt, ami különböző izom specifikus proteineket expresszál, mint pl.: troponin T-t és dezmin (Tamiolakis és mtsai 2004). Dezmin festéssel a KNA területein **(21. A kép)** nagy, széles citoplazmával rendelkező, nyúlványos sejteket találtunk, melyek citoplazmájában a dezmin intermedier filamentum kimutatható **(21. B kép)**. Félvékony, illetve elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy ezek a sejtek olyan magányos myoid sejtek, mint a simaizom sejtek, azonban harántcsíkolatot mutatnak **(21. C, D és inset kép)**.





**20. kép. A KNA karakterizálása I.** (A-C) Sorozatmetszetek 6 hetes csirke thymusból. (A) A kollagén III, (B) a fibronektin és (C) a tenascin jelenléte a PS-ben és a velőállományban. (D) Cytokeratin (zöld) és fibronektin (piros) valamint (E) cytokeratin (zöld) és tenascin (piros) kettős immunfluoreszcens festése a thymus velőállományában. (F-H) DM kezelt hét hetes csirke metszetei. (F) Cytokeratin (G) Fibronektin (H) tenascin immunfestés. Bar: 200  $\mu$  m.





**21. kép. A KNA karakterizálása II, Myoid sejtek a KNA-ban.** (A) Cytokeratin (zöld) és dezmin (piros) kettős immunfluoreszcens festés a thymus velőállományában. (B) Dezmin immunfestés. A nyilak myoid sejteket jelölnek. (C) Félvékony metszet 6 hetes csirke thymus velőállományából, toluidin-kékkel megfestve. A kép közepén harántcsíkolatot mutató myoid sejt látható. (D és inset) Elektronmikroszkópos felvétel egy myoid sejtről. A citoplazmában lévő sötét vonalszerű képződmények a Z-vonalakat mutatják (nyíl). CO-kollagén kötegek. Bar A-C: 100 $\mu$ m, D: 1 $\mu$ m.

#### **5.2.4. A hemopoetikus sejtek kolonizációja a velóállományban**

A cytokeratin festés alapján a velóállomány kétféle kompartmentből épül fel: KNA-ból és KPN-ből (**13. A kép**). A  $74.3^+$  TDC-ek (**22. A kép**) pontosabb lokalizációjának meghatározásához kettős immunfluoreszcens festést végeztünk cytokeratinnal és a 74.3 markerrel. A  $74.3^+$  sejtek a KNA központi területeit foglalják el (**22. B kép**), ahol, mint egy barriert alkotva körülhatárolják az ereket (**22. C kép**), melyeken keresztül elhagyják az érett T-sejtek a thymust és onnan a perifériára kerülnek.

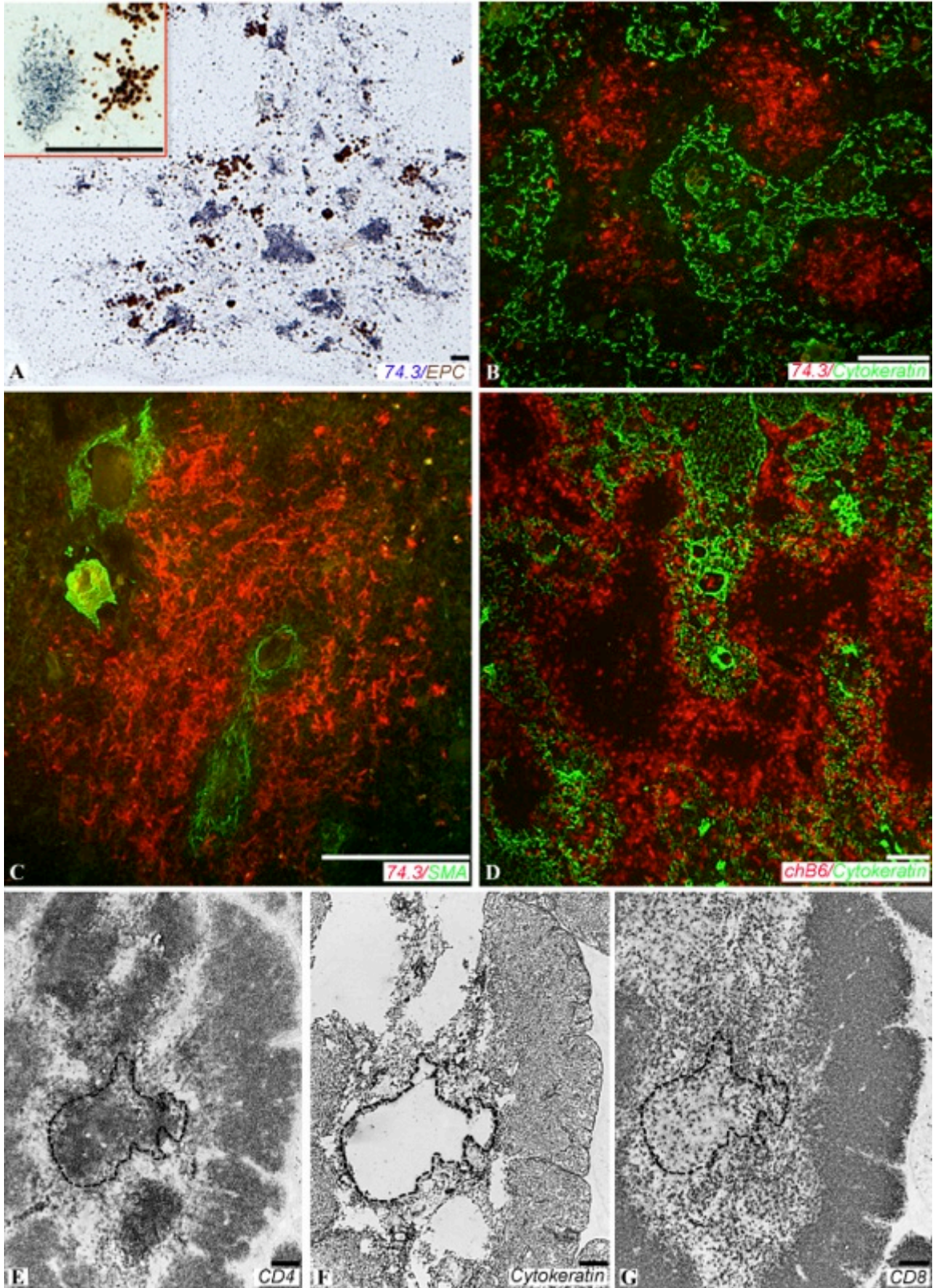
A lymphocyták velóállományban történő elhelyezkedését CD4 és CD8, valamint cytokeratin immunfestéssel követtük nyomon. A velóállományban lévő T-sejtek foltos elrendeződést mutatnak. Párhuzamos metszeteket alkalmazva kiderült, hogy a  $CD4^+$  sejtek főként a KNA-ben lokalizálódnak (**22. E, F kép**), míg a  $CD8^+$  sejtek inkább a KPN-ban (**22. F, G kép**).

A thymus további hemopoetikus sejtjei közé tartoznak a B-sejtek is, melyek szintén a velóállományban találhatóak. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon a B-sejtek esetében is kimutatható-e valamely rendezettség a velóállomány KNA és KPN területei között. Az anti-chB6 és anti-cytokeratin kettős immunfluoreszcens festés azt mutatja, hogy a B-sejtek meghatározott rendben sorakoznak a KPN felszínén, egyfajta határt képezve a KPN és KNA között (**22. D kép**).

---

**22. kép. Hemopoetikus sejtek a velóállományban.** (A) 74.3 (kék) és EPC-ek (barna) kettős hisztokémiai festés. A két sejtcsoport nem kolokalizál, amit nagyobb nagyítással az (A inset) képen lehet látni. (B) 74.3 (piros) és cytokeratin (zöld) kettős immunfluoreszcens festés. A  $74.3^+$  sejtcsoportok a KNA-ben lokalizálódnak. (C) 74.3 (piros) és simaizom aktin (zöld) kettős immunfluoreszcens festése a KNA-ben. A  $74.3^+$  DC-ek (piros) az erek (zöld) köré rendeződnek. (D) ChB6 (piros) és cytokeratin (zöld) kettős immunfluoreszcens festés. A chB6 pozitív B-sejtek (piros) a KNA-ban akkumulálódnak, közel a KPN felszínéhez (zöld). (E-G) Párhuzamos metszetek, az azonos területek körberajzolva láthatóak. (E) CD4 (F) cytokeratin (G) CD8 immunfestés. A  $CD4^+$  sejtek leginkább a velóállományban, a KNA-ban helyezkednek el (vö.E-F). Bar A-G: 100  $\mu$  m.





22. kép

## **6. MEGBESZÉLÉS**

Doktori munkám során az eddig még csak in vitro körülmények között ismert csirke thymus dendritikus sejtjeit (TDC) in vivo identifikáltam és karakterizáltam. A TDC-ek lokalizációjának kimutatásakor állapítottuk meg, hogy a velőállomány kompartmentekre tagolható. Értekezésem második felében ezen szerkezet vizsgálatát végeztem (keratin negatív terület-KNA és keratin pozitív hálózat-KPN).

A thymus dendritikus sejtjeinek karakterizálásához a 74.3, CD83, DC205 és vimentin-specifikus ellenanyagokat használtuk. Korábbi kutatási eredmények alapján ezen ellenanyagok a bursa Fabriciiben a szekréciós dendritikus sejteket, a perifériás nyirokszervekben (lép, cecalis tonsilla) a follikuláris dendritikus sejteket és az interdigitáló dendritikus sejteket ismerik fel. Mivel a makrofág és a lymphoid DC populációk közös eredetűek (Fogg és mtsai 2006) és néhány membrán antigénjük azonos, ezért munkám során ki kellett zárni, hogy a 74.3 antitest valóban nem a makrofágokat jelöli.

Emlős irodalmi adatok alapján tudtuk, hogy a thymus DC-eket a velőállományban és/vagy a kéreg-velő határon kell keresni, ezért fontos volt meghatározni, hogy melyik antitest ad reakciót a velőállományban. A 74.3 és a CD83 markerek 50-80  $\mu$  m átmérőjű sejtcsoportokat ismertek fel. Kettős immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy a két marker kolokalizál, vagyis a TDC-ek mindkét antigént expresszálják. A CD83 membrán, míg a 74.3 pozitív antigén citoplazmatikus. A 74.3 antitest a velőállományban lévő sejtcsoportokon kívül a kéregállományban szétszórtan elhelyezkedő, csillag alakú, nyúlványos egyedi sejteket is jelölt, melyekről később kiderült, hogy kérgi hámsejtek.

A kapott eredmények után egyrészt a 74.3 és CD83 pozitív sejtcsoportok fenotípusát és cytológiai szerkezetét, valamint a kérgi 74.3 pozitív sejtek típusát és eredetét vizsgáltuk meg. Miután a velőállományban lévő sejtcsoportok egyes sejtjeinek és a kérgi 74.3 pozitív sejtek fenotípusát (immuncytokémia), cytológiai képét (elektronmikroszkópia) és eredetét (kiméra) meghatároztuk, a kapott információt összevetettük a csirke lymphoid dendritikus sejtjeivel. Ennek a vizsgálatnak volt az eredménye a csirke thymus dendritikus sejtjeinek identifikálása és karakterizálása.

A velőállomány 74.3 pozitív sejteinek immuncytokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálata vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy annak strómális sejtjes összetétele (hám- és dendritikus sejtek) két élesen elkülönülő kompartmentre (KNA és KPN) tagolódik. Ezek és a bennük lévő T- és B-sejtek eloszlása is meghatározott topográfiai elrendeződést mutat.

## ***6.1. A THYMUS DENDRITIKUS SEJTEK JELLEMZÉSE***

### **6.1.1. A thymus dendritikus sejtek lokalizációja**

A kéreg-velő határon és a velőállományban csoportokba tömörülő és elszórtan elhelyezkedő nyúlványos 74.3 pozitív sejteket detektáltunk, melyek a CD83 molekulát is expresszálják. A kéregállományban nem találtunk CD83 pozitív sejteket, azonban a 74.3 markerrel elszórt, egyedi, nyúlványos sejteket mutattunk ki. A 74.3<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtek csoportos megjelenése a kéreg-velő határon és a velőállományban megegyezik az emlős TDC-ek lokalizációjával (Lafontaine és mtsai 1997; Res és mtsai 1999; Schmitt és mtsai 2007; Vandenabeele és mtsai 2001; Wu és mtsai 1991).

A kéreg-velő határon EPC-eket találtunk. Ez utóbbi sejtek megjelenési formája (a csoportokba való akkumulálódás) felvetette annak a lehetőségét, hogy az Oláh és mtsai (1991) által azonosított EPC-ek 74.3 pozitívak. Ugyanakkor az elektronmikroszkópos és immunhisztokémiai vizsgálataink is azt mutatták, hogy két különböző sejtpopulációról van szó.

Mivel a T-sejtek szelekciójában a mTEC-eken kívül a TDC-ek is szerepet kapnak (Farr és Rudensky 1998; Klein és mtsai 1998; Kleindienst 2000; Perera és Huang 2015; Webb és Sprent 1990), ezért elengedhetetlen volt a TDC-ek hámmoz viszonyított topográfiai helyzetének meghatározása. Cytokeratin és 74.3 kettős immunfluoreszcens festéssel a thymus KNA-ban 74.3<sup>+</sup> sejtcsoportokat - valamint a KPN területén egyedi elszórt sejteket a KPN és a KNA területén detektáltunk. Sawanobori és mtsai (2014) hasonló eredményeket publikáltak patkány thymusról, miszerint a velőállományban “epithelium free area”-t találtak, ahol MHCII<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> TDC-ek akkumulálódtak, míg az ú.n. “epithelium-contained area”-ban és az “epithelium free area”-ban MHCII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> TDC-eket detektáltak. Habár a 74.3 pozitív



sejtcsoportok nem mutattak DEC205 pozitivitást, azonban a sejtek megjelenési formái (csoportokba akkumulálódás) alapján feltételezhetjük, hogy a csirke TDC-ek azok a sejtek, melyek a KNA-ban csoportokba tömörülnek.

Az erek körül  $74.3^+$  sejtcsoportokat találtunk. Ezen sejtek feltehetőleg a Farr és Nakane (1983) által leírt egér thymus kéreg-velő határán lévő  $Ia^+$  (MHCII) sejttömörüléseknek, esetleg a Baba és mtsai (2009) által megfigyelt signal regulator protein (Sirp)  $\alpha$  pozitív DC-eknek felelhetnek meg. Ezek a sejtek bizonyítottan részt vesznek a véreredetű antigének T-sejteknek való bemutatásában.

### **6.1.2. A thymus dendritikus sejtek fenotípusa**

Az emlős TDC-ekhez hasonlóan (Barthélémy és mtsai 1986; DeWaal és mtsai 1984; Farr és Nakane 1983; Löning és mtsai 1982; Mahrle és mtsai 1983; Pelletier és mtsai 1986; Steinman és mtsai 1979) az általunk leírt, a kéreg-velő határon és a velőállományban lokalizálódó  $74.3^+CD83^+$  kettősen pozitív sejtek vimentint és MHCII molekulát expresszálnak. Mivel a 74.3 antitest, a madár más nyirokszerveiben is a DC-eket jelöli, melyek MHCII pozitívak (Oláh és Glick 1994, 1995; Oláh és mtsai 1992), feltételeztük, hogy a csirke thymus 74.3 és MHCII pozitív sejtjei a TDC-jeit is jelöli.

A TDC-ek fenotípusának további jellemzésére a DEC205 antitestet használtuk, ami az emlős TDC-ekben kimutatható (Jiang és mtsai 1995; Swiggard és mtsai 1995). A csirke homológ DEC205 nem jelölte a  $74.3^+CD83^+$  kettősen pozitív sejtcsoportokat a velőállományban, azonban a kéregállományban DEC205<sup>+</sup> egyedi nyúlványos sejteket találtunk, hasonlóan a  $74.3^+$  kérgi sejtekhez. A kérgi  $74.3^+$  sejtek DEC205 pozitívnak bizonyultak. Wu és mtsai (2010b) eredményei szerint az in vitro körülmények között tartott, LPS-dal vagy CD40L-el stimulált csirke vöröscsontvelő sejteken, melyekből DC-ek differenciálódnak, a CD83 és a DEC205 molekulák expressziója fokozottá vált. A madár DC-ekre a 74.3 pozitív antigén expressziója jellemző, ezért felmerült annak a lehetősége, hogy a kéregállományban lévő  $74.3^+$  sejtek DC-ek. A kérgi  $74.3^+$  DEC205<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtek hovatarozásának kimutatása érdekében kettős immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy a  $74.3^+DEC205^+$  sejtek keratin intermedier filamentumot expresszálnak, ami ezen sejtek hám eredetére utal. Emlősben a DEC205-öt a TDC-ek és a kérgi hámsejtek (cTEC) közös markereként tartják

számon, ezért felvetődött, hogy a kéregállományban található  $74.3^+$  DEC205<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtek hámsejtek. Ugyanakkor az emlős thymus kéregállományában DC-eket mutatott ki több kutatócsoport is (Ladi és mtsai 2008; Paessens és mtsai 2008; Vandenabeele és mtsai 2001), ezért annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a  $74.3$  a hámsejteket vagy a DC-eket jelöli a kéregállományban csirke-fürj kimérát alkalmaztunk.

### **6.1.3. A thymus dendritikus sejtek eredete**

A  $74.3^+$ CD83<sup>+</sup>DEC205<sup>-</sup> a kéreg-velő határon és a velőállományban lokalizálódó és a kérgi  $74.3^+$ CD83<sup>-</sup>DEC205<sup>+</sup> sejtek eredetének vizsgálatához csirke-fürj kiméra embriómanipulációs technikát használtuk. Kimutattuk, hogy a csirke keringéséből CD45<sup>+</sup> $74.3^+$  hemopoetikus sejtek vándorolnak be a kiméra thymus fürj eredetű hámretikulumába. Ezt igazolta a chorioallantois membrán kiméra kísérlet is, miszerint a  $74.3^+$  sejtek valóban a véráramból kerülnek a thymusba.

Amennyiben a csirke garatíveket transzplantáltuk a fürj embrió testüregébe (fordított kiméra), a kiméra thymus hámretikuluma a csirke garattasakok endodermájából fejlődött ki. A thymus hámtelépében  $74.3^+$  nyúlványos sejteket mutattunk ki a jövődöbeli kéregállomány területén. A fordított kiméra során nem találtunk CD45<sup>+</sup> sejtet a kifejlődött thymusban, azaz a  $74.3$  pozitív sejtek semmiképp sem származhatnak a vérkeringésből. Mivel a kiméra thymus telepe a fürj 3-4. garattasakok endodermájából fejlődött ki, amiben  $74.3$  pozitív sejteket találtunk, valamint a felnőtt thymus kéregállományában kimutatott cytotokeratint expresszáló sejtek  $74.3$  pozitívítása is arra enged következtetni, hogy ezen sejtek hámsejtek.

Eredményeink szerint a  $74.3$  antitesttel valóban két populációt lehet elkülöníteni a thymusban: 1; a kéreg-velő határon és a velőállományban csoportokban és egyedi sejtekként megjelenő **CD45<sup>+</sup> $74.3^+$ CD83<sup>+</sup>DEC205<sup>-</sup> hemopoetikus sejteket** és 2; a kéregállományban lévő **CD45<sup>-</sup> $74.3^+$ CD83<sup>-</sup>DEC205<sup>+</sup> endodermális eredetű sejteket**.

A kéregállományban két különböző morfológiai jegyekkel bíró hámsejteket azonosítottunk, melyeket cTEC<sub>1</sub>-nek és cTEC<sub>2</sub>-nek neveztünk el. A cTEC<sub>1</sub> citoplazmája granulumoktól mentes volt, szemben a cTEC<sub>2</sub>-kel, melyek citoplazmájában különböző denzitású granulumokat találtunk. A  $74.3$  marker granuláris festődést mutatott a cTEC-

ekben, ami feltehetőleg a cTEC<sub>2</sub>-et jelöli, hiszen csak azon kérgi hámsejtek citoplazmájában detektáltunk granulumokat. A 74.3<sup>+</sup> cytokeratint expresszáló, a kéregállományban lokalizálódó sejtek minden esetben MHCII és DEC205 pozitívak voltak, ami alapján úgy gondoljuk, hogy ezek a sejtek hámsejtek, melyek megfeleltethetők az emlősben leírtakkal (Alexandropoulos és Danzl 2012).

Ezen morfológiai jegyekre hagyatkozva a kéreg-velő határon és a velőállományban lévő **CD45<sup>+</sup>74.3<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup>DEC205<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>** sejteket a **thymus DC**-eknek tekintjük, míg a **CD45<sup>-</sup>74.3<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup>DEC205<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>** sejteket a thymus **kérgi hámsejtjeinek (cTEC)**.

#### **6.1.4. A thymus dendritikus sejtek cytológiája és a makrofágok kizárása**

A csirke TDC-ek elektronmikroszkópos szintű identifikálása érdekében pre-embedding immunhisztokémia technikát alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel 74.3 pozitív sejteket detektáltunk a kéregállományban, a kéreg-velő határon és a velőállományban. Mivel a 74.3 pozitív, granuláris szerkezetet mutató, nyúlványos sejtek immun-elektronmikroszkópos kimutatása többszöri próbálkozás után is sikertelennek bizonyult, ezért a TDC-ek ultrastruktúrájának jellemzésekor a 74.3 és CD83 immunfestések eredményeire támaszkodtunk: olyan nyúlványos, granulumokban gazdag sejteket kerestünk, melyek az erek közelében csoportosan helyezkednek el. Az ultrastruktúrális vizsgálatok során azonosított sejtekben a sejtmag excentrikusan helyezkedik el, melynek a maghártya invagináció jellegzetes alakot kölcsönöz. A sejtek számos elektrondenz granulumot tartalmaznak, melyek szerencsés metszése esetén lamelláris szerkezetet mutatnak. Ehhez hasonló szerkezetet írtak le a cecalis tonsilla csíracentrumaiban lévő follikuláris dendritikus sejtek granulumaiban (Oláh és Glick 1979). Ezen morfológiai hasonlóság alapján neveztük el a lamelláris szerkezetű granulumokkal rendelkező nyúlványos sejteket a TDC-jeinek.

A biztos cytológiai karakterizálás érdekében szeretnénk volna elkülöníteni a lamelláris szerkezetű granulumokkal rendelkező nyúlványos sejteket a makrofágoktól immuncytokémiai és elektronmikroszkópos szinten is. A makrofágok citoplazmájában lysoszómát és fagoszómát is tartalmaz - szemben a TDC-ekkel - amit elektronmikroszkópos felvételekkel igazoltunk. 74.3 és 74.2 kettős immunfluoreszcens

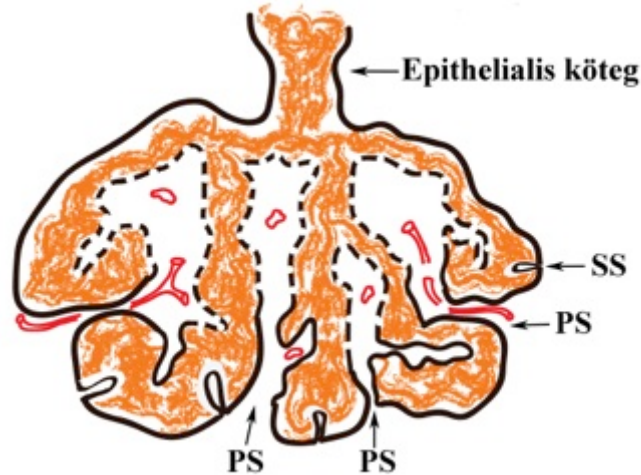
festéssel kimutattuk, hogy a két marker nem kolokalizál. Ezen eredményeket figyelembe véve és a további makrofágok monoklonális antitestekkel történő immunfestés alapján kijelenthetjük, hogy két különböző sejttípusról van szó, és a 74.3 nem jelöli a thymus makrofágjait.

## ***6.2. A VELŐÁLLOMÁNY KOMPARTMENTALIZÁCIÓJA***

### **6.2.1. A KPN és KNA kialakulása**

A thymus dendritikus sejtjeinek identifikálása és karakterizálása során a TDC-eknek a hámrétikulumhoz való topográfiai viszonyát vizsgálva a velőállomány további tagozódását azonosítottuk. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a velőállomány újabb kompartmentekre (keratin pozitív hálózat-KPN és keratin negatív terület-KNA) tagolódik, ami nem fajspecifikus, hiszen emlős (nyúl) thymusban is detektáltuk. A keratin negatív terület jelenlétét más kutatók eredményei is alátámasztják mind a madár (Boyd és mtsai 1992; Guillemot és mtsai 1984; Minkó és Oláh 1996), mind pedig az emlős rendszerben (Sawanobori és mtsai 2014; García-Ceca és mtsai 2015), azonban azok kialakulása és funkciója mostanáig tisztázatlan maradt. A thymus az egyetlen olyan nyirokszerv, ami hasonlóan fejlődik, mint a mirigyek (**6. ábra**). A 3-4. garattasakból fejlődő endodermális eredetű epithelialis köteg a környező mesenchymába nő, melyek kölcsönös interakciója következtében a hámbimbó „sarjadzani” kezd. Az epithel sziget ganglionléc eredetű mesenchymába való ágyazódását Rodewald megfigyelései is alátámasztják (Rodewald 2008; Rodewald és mtsai 2001). Az embrionális fejlődés 11. napján a mesenchyma továbbfejlődve PS-ekként tör be a formálódó hámrétikulumba. Az embrionális thymus telep lebenyekre való tagolódásában a PS-ek fontos szerepet tölthetnek be. Immuncytokémiai és hisztokémiai vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a PS-ek a velőállományba érve folyamatosak a KNA-tel. A KNA a PS-ek tárgulataiként értelmezhető, a hámtelep egyre mélyebb és mélyebb területeibe való nyomulásával kialakítja a vele (PS-ekkel) összefüggő KNA-t. Ushiki és Takeda (1997) eredményei alapján az emlősben leírt perivascularis tér folyamatos a kötőszöveti sővényekkel, melyek ganglionléc származékok. Ezen eredményeket összevetve az általunk megfigyeltekkkel, feltételezzük,

hogy a KNA is ganglionléc származék, hiszen a KNA is hasonló folytonosságot mutat a PS-ekkel, ugyanúgy mint az emlősben megfigyelt perivascularis tér. A PS-ek mellett megjelenő rövid lefutású, csak a kéregállomány területéig terjedő söveteket secunder söveteknek (SS) neveztük el.



**6. ábra.** *A thymus fejlődésének sémás rajza.*

A sarjadzásnak indult hámbimbóból kialakuló epithelialis köteg a környező mesenchymába nő. A PS-eket és a felszínt határoló hámsejtek folyamatos lamina basalissal rendelkeznek (fekete vonal), azonban a leendő velőállomány területére érve szaggatottá válik. PS-primer sötény, SS-secunder sötény.

Néhány kutató szerint a perivascularis tér nem más, mint az epithelialis hálózat egy maradványa (Hwang és mtsai 1974; Kato és Schoefl 1987; 1989), míg mások eredményei azt mutatják, hogy az “epithel sejtek egy vékony rétegével határolódik” (Bearman és mtsai 1975; Irino és mtsai 1981; Pereira és Clermont 1971; Ushiki 1986). Megfigyeléseink alapján a KNA-et a mTEC-ek alkotta KPN határolja, ami hasonló sztereotípiát mutat az emlősben kimutatott perivascularis térrel. Annak igazolására, hogy a KNA nem feleltethető meg a perivascularis térnek és, hogy nagyobb területet foglal el, mint a perivascularis tér, Cavalieri morфомetriás becslést végeztünk. A sztereológiai metodikával, kimutattuk, hogy a KNA nagyobb terület, mint a perivascularis tér, hiszen a KNA a thymus lebeny közel 50%-t elfoglalja. Eredményeink azt mutatják, hogy a normál thymus kéreg- és velőállomány térfogatának aránya 3:2, a KPN és KNA egymáshoz viszonyított térfogatszázalékos eloszlása pedig 53% és 47%.



Összefoglalva, a velőállománynak közel felét a KNA alkotja, vagyis a KNA nagyobb területet foglal el önmagában, mint a perivasculáris tér.

A kortizon kezelés hatására a lebenyek mérete csökkent. A dupla negatív T-sejtek depletálódnak (Franchini és mtsai 2004; Ishidate és Metcalf 1963), a kéregállomány zsugorodik. A cytokeratin festés alapján azt gondolhatnánk, hogy a velőállomány térfogata megnőtt, azonban morfometriás számításaink alapján ez nem bizonyult igaznak. A kezelés következtében a kéreg- és velőállomány térfogatszázalékos eloszlása felcserélődött a kontroll csoporthoz képest, vagyis a kéregállomány 60%-ról 36%-ra csökkent a velőállomány pedig 40%-ról 64%-ra relatíve „megnőtt”. Méréseink alapján a velőállomány kompartmentjei, a KPN és a KNA egymáshoz viszonyított aránya a kezelés következtében változatlan maradt. A kor előrehaladtának eredményeként a humán thymusban involúciós folyamatok indulnak el, melynek következtében a perivasculáris tér expanziója figyelhető meg (Gameiro és mtsai 2010). Vagyis ezen megfigyeléseink is alátámasztják azt a feltevésünket, hogy a KNA valóban nagyobb és nem egyezik meg a perivasculáris térrel, hiszen a dexametazon kezelés következtében nem nőtt meg a KNA térfogata, szemben az emlősben leírt perivasculáris térrel. A velőállomány térfogata csökkent a kontroll állatokéhoz képest, azonban az acut involúciót szenvedett thymus lebeny nagyobb százalékát foglalja el, mint a kéregállomány. Vagyis a szteroid mind a cTEC-ekre, mind pedig a mTEC-ekre egyaránt hatással volt. A kezelés jól szemlélteti, hogy a kéregállományban megszűnik a lympho-epithelialis kapcsolat. A fény- és elektronmikroszkópos eredményeink alapján a lymphocyták depletálódnak és a hámrétikulum „összeesik”. Vajon ennek a megváltozott mikrokozmosznak köszönhető a kéregállomány elvékonyodása vagy annak, hogy a cTEC-eknek külön progenitora van, mely szintén érzékeny lehet kortizonra, így a kezelés ideje alatt a progenitorok is blokkolva vannak és azok nem képesek megvédeni a kéregállományt? Azon eredményeink tükrében, hogy a kezelés következtében nem csak a kéregállomány térfogata, de a velőállományé is csökkent, feltételezhetjük, hogy a cTEC-ek és mTEC-ek egy közös bipotens progenitorral rendelkeznek, egyetértésben az irodalomban találtakkal (Bennett és mtsai 2002; Bleul és mtsai 2006; Farr és mtsai 2002; Rossi és mtsai 2007). BrdU-nal történő vizsgálattal kimutattuk, hogy a regeneráció fázisában a cTEC-ek képesek proliferációra. Az utolsó kezelést követő 3. napon a thymus lebenyek

visszanyerik eredeti méretüket, újraépülnek és a kéregállomány újra „feltöltődik” a T-sejtek progenitoraival. Azonban az tisztázatlan marad, hogy melyik folyamat indukálja a másikat. Vagyis, a T-sejt progenitorok migrálása következtében áll helyre a rend, vagy azért vándorolnak oda a T-sejt progenitorok, mert a thymus hámrétikuluma újra képes lesz azok befogadására? Dudakov és mtsai (2012) kimutatták, hogy stressz, fertőzés vagy sugárzás okozta immundepleciót követően a thymus képes megújulni, újraépülni. Egészséges szervezetben a TDC-ek által termelt interleukin- (IL) 23 szekrécióját az éretlen T-sejt prekurzorok gátolják. Amennyiben a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-sejtek depletálódnak, az IL-23 szekréciója fokozódik, ami, mint egy láncreakciót beindítva, a lymphoid szövet indukáló (lymphoid tissue inducer) sejteken keresztül stimulálja a cTEC-ek proliferációját az IL-22 termelésével. Dudakov eredményeiből azt következtethetjük, hogy a regeneráció akkor történhet meg, amennyiben a cTEC-ek proliferációja által újra visszanyerheti a kéregállomány a normál működéshez szükséges hámrétikulum hálózatát.

A 13 napos embrió thymusában a lebeny belsejében erősebb keratin affinitást mutató TEC-eket találtunk, melyek a felnőtt thymus kéreg-velő határán is kimutathatóak. A regeneráció során K5<sup>+</sup>K8<sup>+</sup> progenitor hámsejtek jelennek meg a kéreg-velő határon, melyekből a cTEC-ek differenciálódnak, illetve a cTEC-ek és a mTEC-ek progenitorai is lehetnek (García-Ceca és mtsai 2009; Klug és mtsai 1998, 2002; Rodewald 2008; Sun és mtsai 2013). Vajon ezek, a keratint erősebben expresszáló hámsejtek lehetnek-e a thymus hám progenitor sejtjei, melyekből a kéregállományban a granulomoktól mentes cTEC<sub>1</sub> és a granuláris cTEC<sub>2</sub>, a velőállományban pedig a KPN-ot alkotó mTEC-ek differenciálódnak? További vizsgálatokat igényel, hogy vajon ezen, az erősebb keratin expressziót mutató területeken történik-e proliferáció, akár a hámsejtek vagy akár a lymphocyták tekintetében?

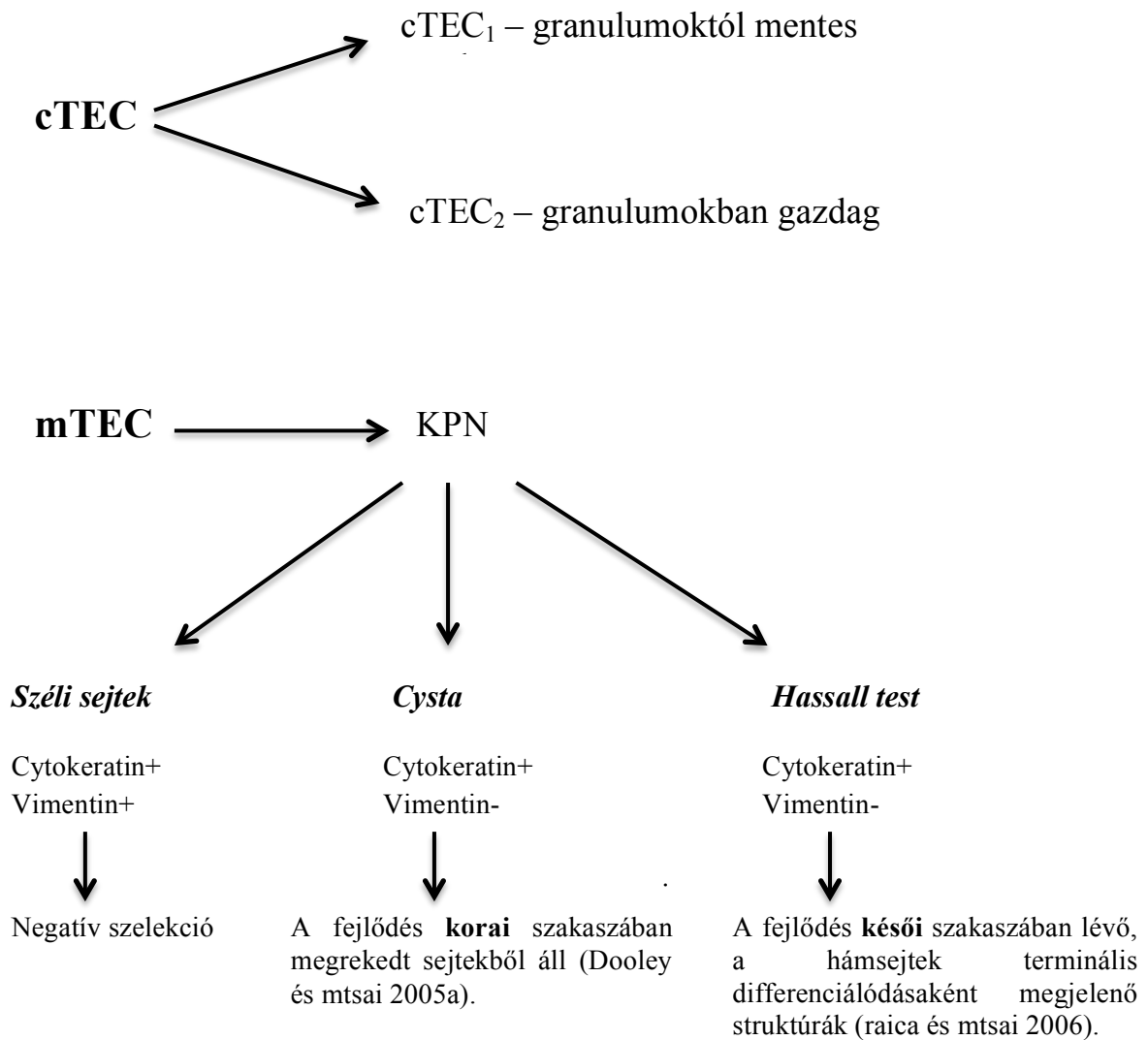
### **6.2.2. Avelő hámsejtek differenciálódási lehetőségei: a KPN széli sejtjei, cysta és a Hassall test**

Fejlődéstani vizsgálataink során az embrionális thymus jövőbeli velőállomány területén megfigyelt erősebb keratin affinitást mutató TEC-ekből a KPN alakul ki. Immunfluoreszcens festésekkel a KPN széli hámsejtjeinek citoplazmájában a

keratin mellett vimentin intermedier filamentumot is kimutattunk, ami ezen sejtek plaszticitását jelentheti. Feltételezhetően ezek a széli hámsejtek azok, melyek részt vesznek a velőállomány legfőbb funkciójában, a negatív szelekcióban.

A KPN belső sejtjeiből képződhetnek a cysták és Hassall testek (HB), melyek kialakulása során megszakadt a kapcsolatuk a hemopoetikus elemekkel. Feltételezésünket arra alapozzuk, hogy ezen sejtekben nem mutattunk ki vimentin intermedier filamentumot, csak cytokeratint. Immuncytokémiai festéseink alapján a csirke thymus cystáit alkotó mTEC-ek MHCII pozitívak és a II. típusú pneumocyták által expresszált surfactant-B (SP-B) proteint termelnek, valamint citoplazmájukban a II. típusú pneumocytákra jellemző myelinszerű morfológiával rendelkező képleteket detektáltunk elektronmikroszkóppal. Egyes kutatók úgy gondolják, hogy a T-sejtek szelekciójában is szerepet kapnak azáltal, hogy különböző szövetspecifikus antigéneket (TSAs) (többek között SP-A-t és SP-B-t) termelnek (Vroegindeweij és mtsai 2010) és MHCII molekulájuk révén részt vesznek azok bemutatásában. A cystákkal kapcsolatos morfológiai eredményeink is alátámaszthatják az emlősben leírt funkciójukat, azonban ennek tisztázására további funkcionális vizsgálatokat kell végeznünk. További kérdések megválaszolása szükséges ahhoz, hogy választ adhassunk arra a kérdésre, hogy milyen jelentőség rejlik abban, hogy a **cystákat** alkotó mTEC-ek fejlődése a **korai szakaszban** megrekedt, melynek eredményeként a sejtek polarizáltak maradtak (Dooley és mtsai 2005a, b). Illetve, hogy a **Hassall testek** a mTEC-ek **terminális differenciálódásának** eredményeként jelennek meg. A HB-eket alkotó mTEC-ek között vimentin pozitív granulocytákat, makrofágokat találtak (Minkó és Oláh 1996), azonban immunfestéseink alapján a mTEC-ek nem expresszálnak vimentint, hasonlóan a KPN belső sejtjeihez. Ezen megfigyeléseink is arra engednek következtetni, hogy a KPN széli (keratint és vimentint is expresszáló mTEC-ek) és belső (csak keratint produkáló mTEC-ek) sejtjeinek eltérő funkciójuk lehet.

A thymus hámsejtjeinek különböző differenciálódási útvonalait a **7. ábra** szemlélteti.



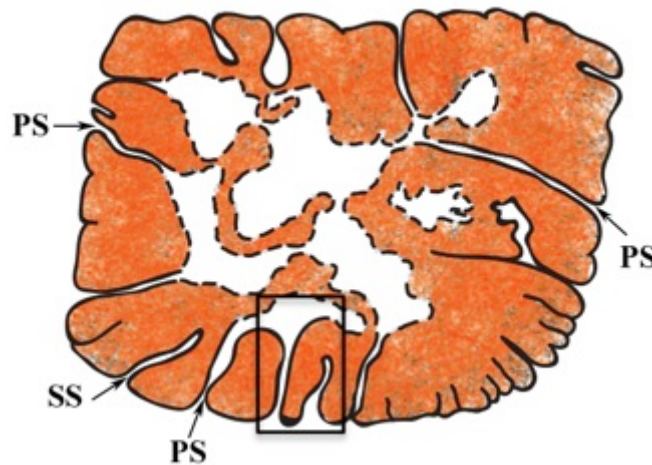
**7. ábra. A kérgi és velő hámsejtek differenciálódási útvonalai.** A kéregállományban lévő hámsejteket citoplazmájuk tartalma alapján megkülönböztethetjük, mint cTEC<sub>1</sub> melynek citoplazmája granulumoktól mentes, és cTEC<sub>2</sub>, mely granulumokban gazdag citoplazmával rendelkezik. A KPN-t alkotó velő hámsejtek (mTEC) széli sejteji cytokeratin és vimentin intermedier filamentumot is expresszálnak, melyek feladata a T-sejtek negatív szelekciója lehet. Amennyiben a KPN-t alkotó hámsejtek cystákat vagy Hassall testet képeznek, vimentint nem, csak cytokeratin intermedier filamentumot termelnek. Míg a cysták a fejlődés korai stádiumában megrekedt polarizált sejtekből állnak, addig a Hassall testeket a hámsejtek turnoverének eredményeként a fejlődés késői szakaszába eljutó hámsejtek alkotják.

### 6.2.3. Vér-thymus barrier

A kéregállományban érő lymphoid progenitorok számára olyan „steril” mikrokörnyezet jön létre, melynek kialakításban a vér-thymus barrier játszik fontos szerepet. A kéregállományon kívül sem a kéreg-velő határon, sem pedig a velőállományban nem találunk vér-thymus barriert.

A tokot és a PS-eket alkotó hámsejtek lamina basalis folyamatos, azonban a velőállomány KNA-re érve ez a folytonosság megszakad, ahol a felszakadozott lamina basalis egyfajta határt mutat a KPN és a KNA között (**8. ábra**).

A KPN feneztrálttá vált lamina basalis valamint a keratin és vimetin filamentum közös expressziója lehet az első cytológiai és molekuláris jele annak, hogy a vér-thymus barrier valóban csak a kéregállományban létezik, azonban a KPN és a KNA között ez megszűnik.



**8. ábra.** *A PS-ek és a velőállomány kapcsolata.* A PS-ek a velőállományba érve KNA-té tágulnak. A KNA-t határoló lamina basalis felszakadozottá válik (fekete szaggatott vonal). A bekeretezett területet a 9. ábra szemlélteti. PS-primer sővény, SS-secunder sővény.



#### **6.2.4. A KNA eredete és kapcsolata a PS-ekkel**

Amikor nyilvánvalóvá vált, hogy a KNA-ban nem találunk hámrétikulumot, több kérdésre is kerestük a választ: 1; Ha nem hámszövetet, akkor milyen típusú szövetet találunk a KNA területein? 2; Ez esetben a thymus velóállományának tekinthető-e a KNA vagy egy másodlagosan megjelenő, a hámrétikulumba belenövő peripheriális nyirokszövetnek? A peripheriális nyirokszövetek vázát a retikuláris rácsrostok adják. Ezüst impregnációval a ganglionléc eredetű területeken, vagyis a tokban, a PS-ekben és a KNA-ben is rácsrostokat mutattunk ki, melyek mellett az ECM elemeinek (kollagén, fibronectin, tenascin) jelenlétét is igazoltuk, azonban a kéregállományban nincs ECM expresszió. Mind a fibronectin, mind pedig a tenascin képes befolyásolni a sejtek migrációját (Savino és mtsai 2000; 2004) és szükségesek a fetális thymus normál fejlődéséhez (Lannes-Vieira és mtsai 1991). A ganglionléc eredetű mesenchymális sejtek a thymus epitheliumába vándorolnak, ahol fibroblastokká differenciálódva ECM molekulákat kezdenek el termelni, melyek fontos szerepet kapnak a T-sejt fejlődés során (Sunjara és mtsai 2000). Az ECM molekulák jelenléte a KNA-ban arra enged következtetni, hogy a már “megszűrt” T-sejtek perifériára való jutásához szükség van a T-sejtek KNA-ba való lépéséhez. Az erek körül olyan területeket jegyeztek fel, melyekben ezüst impregnációval rácsrostokat mutattak ki (Sainte-Marie és Leblond 1964). A szerzők perivascularis csatornának (perivascular channel) nevezték el, amit ma perivascularis térként emlegetünk. A perivascularis csatorna nem feltétlenül egy ér körül figyelhető meg, akár 2-3 ér is magába foglalhat kötőszövetbe ágyazva (Sainte-Marie és Leblond 1964; Kostowiecki 1967; Ushiki és Takeda 1997). Eredményeink azt mutatják, hogy a thymus velóállományában kimutatott rácsrostok nem csak a perivascularis térben jelennek meg, hanem az egész KNA területét kitöltik. A DM-nal indukált acut involúció során az ECM molekulák expressziója fokozottabbá vált a KNA területén, ami megegyezik az irodalomban leírtakkal, hiszen acut (Lannes-Vieira és mtsai 1991; Gameiro és mtsai 2010) és fiziológiás (Savino és mtsai 1993) involúciót előidézve a retikuláris rácsrostok és az ECM molekulák mennyiségének növekedését tapasztalták.

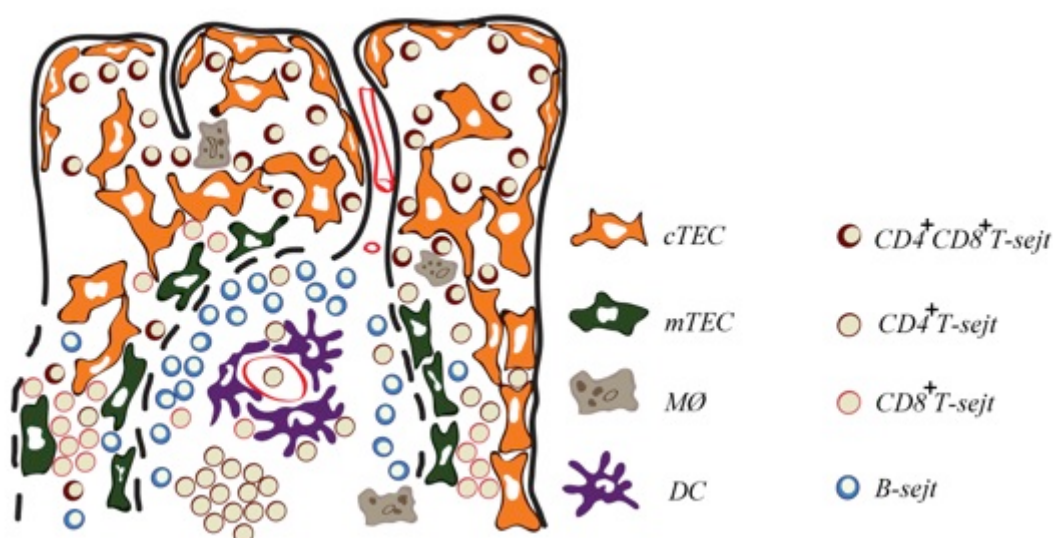
A KNA-ban harántcsíkoltat mutató ámbár magányos, nyúlványos myoid sejteket találtunk. Harántcsíkolt izom fejlődhet a somiták myotomjából, a prechordalis lemezből (Seifert és Christ, 1990) vagy a ganglionlécéből, de semmiképp sem lehet

endodermális vagy ectodermális eredetű. A ganglionléc sejtek myogén potenciálját számos kutatócsoport igazolta (Nakano és Nakamura 1985; Yamashita és Sohal 1987). A myoid sejtek eredetére vonatkozóan különböző teóriák születtek, azonban Nakamura és Ayer-Le Lièvre (1986) csirke-fürj kiméra eredményei szerint ganglionlécből származnak. A myoid sejtek KNA-ban való lokalizációja valamint a PS-ek és a KNA egymáshoz való viszonya (vagyis, hogy a PS-ek a velőállományba érve KNA-té “tágnak”), közvetett bizonyítékai lehetnek a KNA ganglionléc eredetének.

### **6.2.5. A dendritikus sejtek és lymphoid sejtek topográfiai viszonya a KNA-ban**

A pozitívan szelektált T-sejtek továbbvándorolnak a velőállományba, ahol negatívan szelektálódnak a mTEC-ek és a DC-ek kooperációja révén. A KNA-be érve a hemopoetikus sejtek szigorú rendezettségét mutatnak. A B-sejtek a KPN és a KNA határán, mint egy határoló zóna tagjai felsorakoznak. Korábban kevésbé ismerték el szerepüket a negatív szelekcióban, azonban mára már széles körben elfogadottá vált, hogy a  $CD4^+$  T-sejtek negatív szelekciójában részlegesen részt vesznek (Boursalian és mtsai 2004; Frommer és Waisman 2010). MHCII molekulájuk révén képesek a saját antigén bemutatására, mellyel az autoreaktív  $CD4^+$  T-sejtek kivonásában kapnak szerepet (Frommer és Waisman 2010). Az AIRE gén körüli vizsgálatokban egy újabb fordulat következett be, hiszen azok expresszióját a mTEC-ekben figyelték meg, azonban Yamano és mtsai (2015a) megfigyeléseire hagyatkozva a thymus B-sejtjeiben is kimutatható az AIRE expressziója. Az AIRE mediálta szövetspecifikus antigéneket termelt B-sejteknek szerepe van a T-sejtek szelektálásában, mindazonáltal esszenciális feladatot töltenek be a centrális tolerancia kialakításában (Yamano és mtsai 2015b). Feltételezhetően az általunk megfigyelt sejtes rendezettség is arra utalhat, hogy a B-sejtek részt vehetnek a T-sejtek szelekciójában. A KNA valószínűleg tranzitzónaként működik a thymus és a periféria között. A KNA-ban lokalizálódó  $CD4^+$  és  $CD8^+$  egyszeresen pozitív T-sejtek eloszlása, az erek köré akkumulálódása is ezt mutatja, hiszen az érett T-sejtek perifériára való jutása az ereken keresztül történik. Vizsgálataink során a KNA-ban lokalizálódó erek körül  $74.3^+$  DC-ek aggregálódtak. Az emlős nyirokcsomókban található magas endothel-lel bélelt erek (HEV-high endothelial venule) körül  $CD11c^+$  DC-ek csoportosulnak (Moussion és Girard

2011). A thymus postkapillárisai nem mutatnak a HEV-re emlékeztető morfológiát, azonban a KNA és az ott található erek egy igen erős sejtmigrációnak adnak teret. Ezen eredményeink alapján, az általunk karakterizált 74.3 pozitív sejtek is hasonló funkcióval bírhatnak, mint az emlős nyirokcsomókban talált  $CD11c^+$  DC-ek. A hemopoetikus sejtek és a KPN ezen szigorú és szabályszerű rendezettsége a T-sejtek thymuson belüli meghatározott úton történő vándorlására utal. A cTEC-ek hálózatán túljutó pozitívan szelektálódó T-sejtek a velőállomány KPN-on továbbhaladva a KNA-be kilépve, az ott lokalizálódó ereken keresztül hagyhatják el a thymust (**9. ábra**).



**9. ábra.** A hemopoetikus sejtek elrendeződése a KNA-ben (8. ábra bekeretezett területe részletesen). A KNA centrális részében foglalnak helyet a vérerek, melyek körül a DC-ek aggregálódnak. A B-sejtek a KPN és a KNA mentén határt képeznek. A  $CD4^+$  T-sejtek a KNA-ben csoportosulnak. cTEC-kérgi hámsejt, mTEC-velő hámsejt, MØ-makrofág, DC-dendritikus sejt.

Mindezen morfológiai bizonyítékok arra engednek következtetni, hogy az eddig már jól ismert morfológiai kéreg-velő határ mellett létezik egy funkcionális határ a KPN és a KNA között. Ugyanakkor az a kérdés is felvetődik, hogy vajon ez a funkcionális határ a kéreg- és velőállomány között húzódik-e – vagyis egy újabb kéreg-velő határt definiálunk-, vagy amennyiben a KPN-t a velőállomány egy kompartmentjének tulajdonítjuk, akkor az a velőállomány részeként fogható-e fel?

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

- 1) In vivo azonosítottam a madár (csirke) thymus dendritikus sejtjeit.
- 2) Jellemeztem a TDC-ek cytologiai szerkezetét elektronmikroszkópos szinten.
- 3) A madár thymus velőállományában két élesen elkülönülő részt (keratin pozitív hálózat-KPN és keratin negatív terület-KNA) mutattam ki.
- 4) Kimutattam, hogy a TDC-ek a KNA-ban található erek köré csoportosulnak.
- 5) Kiméra technikával bebizonyítottam, hogy a  $74.3^{+}DEC205^{-}CD45^{+}$  csoportokba akkumulálódó sejtek, dendritikus sejtek, valamint a kéregállományban loklizálódó  $74.3^{+}DEC205^{+}CD45^{-}$  egyedi sejtek hámsejtek.
- 6) A KPN széli sejtjei vimentin intermediér filamentumot is expresszálnak a cytokeratin mellett, mely a sejtek plaszticitását növeli. Ezek a sejtek érték el a thymus velő hámsejtek végső differenciálódását.
- 7) A cystákat képező hámsejtek a thymus retikuláris hámsejtjeihez hasonlóan MHC II antigént expresszálnak, valamint SP-B-t. Ultrastruktúrájukban is hasonlítanak a II. típusú pneumocytákra, így feltehetőleg képesek lehetnek surfactant termelésre is.
- 8) Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a vimentin negatív Hassall testeket a hámsejtek turnoverének eredményeként a fejlődés késői szakaszába eljutó hámsejtek alkotják.
- 9) A thymus felszínét és a PS-eket határoló hámsejtek membrana basalis folyamatos, azonban a velőállomány KNA-be érve ez a folyamatosság megszűnik, a membrana basalis felszakadozik. Ez lehet az első hisztológiai jele a vér-thymus barrier hiányának a velőállományban.

- 10) A myoid sejtek jelenléte a KNA-ben – ami a PS-ek tágulataiként értelmezhetőek - közvetett bizonyítéka lehet a KNA ganglionléc eredetének.
  
- 11) Vizsgálataink szerint a hisztológiailag megjelenő kéreg-velő határnál a felületileg jelentősebb KPN-KNA határ lehet funkcionálisan fontosabb, a KNA felépítése alapján, mint perifériás nyirokszövet fogható fel a thymuson belül.



## ÖSSZEFOGLALÓ

Doktori munkám során a csirke thymus dendritikus sejtjeit (TDC) in vivo fény- és elektronmikroszkópos szinten vizsgáltam. A sejtek fenotípusának meghatározásában a DC-ekre jellemző monoklonális antitesteket használtam (74.3, CD83, MHCII és anti-vimentin). A 74.3<sup>+</sup> TDC-ek a kéreg-velő határ és a velőállomány keratin mentes területein csoportokba rendeződve, az erek körül helyezkednek el. A DC-ek cytológiai szerkezetének leírására a transzmissziós elektronmikroszkóp nyújtott lehetőséget, melynek eredményeit összevetve a DC-ekre jellemző cytológiai szerkezettel, igazolta azok dendritikus sejt voltát.

A 74.3 monoklonális antitest a kéregállományban egyedi, csillag alakú sejteket is felismer, melyekről csirke-fürj kiméra kísérlettel kimutattam, hogy hám eredetű retikuláris sejteket reprezentálnak és nem DC-eket.

Az anti-cytokeratin immunfestés a thymus velőállományában két élesen elkülönülő kompartmentet mutatott, melyeket keratin pozitív hálózatnak (KPN) és keratin negatív területnek (KNA) neveztem. Morfometriás vizsgálatok alapján a két terület hozzávetőlegesen 50-50% arányban foglalja el a velőállományt.

A KPN széli sejtjei a cytokeratin mellett vimentin intermedier filamentumot is expresszálnak. A KPN belső sejtjeiből alakulhatnak ki a cysták és a Hassall testek, melyek sejtjei elvesztették kapcsolatukat a T-sejtekkel, vagy ki sem alakult. A sövények felszínén lévő folyamatos membrana basalis a KPN széli sejtjeinek KNA felé néző oldalán szaggatottá válik, ami az első ismert morfológiai jele annak, hogy a velőállományban nem működik a vér-thymus barrier.

A thymust kolonizáló CD45 pozitív hemopoetikus sejtek a KPN és a KNA-n belül különböző elrendeződést mutatnak. A DC-ek és a CD4<sup>+</sup> sejtek a KNA-ben lokalizálódnak, a B-sejtek a KNA és KPN határán sorakoznak, míg a CD8<sup>+</sup> sejtek a KPN területét preferálják.

A thymus epitheliális telepének elágazódásait elválasztó sövényeket primer sövényeknek (PS) neveztük el, melyek a velőállomány KNA-vel folyamatosak, azonos hisztológiai összetételűek. A thymus tokja és a PS-ek a ganglionlécből fejlődnek, ennek alapján feltételezzük, hogy a KNA is ganglionléc eredetű, amit a harántcsíkolatot mutató myoid sejtek jelenléte is alátámaszt.

## **SUMMARY**

The goal of my thesis was the *in vivo* identification of chicken thymic dendritic cells (TDCs) by immunophenotyping and electron microscopy. In phenotypic characterization of TDCs, several monoclonal antibodies (74.3, CD83, MHC class II and anti-vimentin) were used. TDCs were found in clusters around the blood vessels, locating in the keratin free areas of thymic medulla. The cytological structure of the TDCs was described by transmission electronmicroscopy.

However the 74.3 monoclonal antibody reacted with scattered individual cells in the thymic cortex. Chicken-quail and quail-chicken chimeric experiments provided circumstantial evidence, that the 74.3 positive cortical cells are epithelial cells and not TDCs.

Anti-cytokeratin immunostaining showed two sharply separated compartments in the avian thymic medulla, which were named as keratin positive network (KPN) and keratin negative area (KNA). Morphometric studies showed that the two areas form approximately 50-50% of the medulla.

Marginal epithelial cells of the KPN besides the cytokeratin intermediate filament express vimentin. The inner cells of thy KPN express only cytokeratin filament. These epithelial cells form the thymic cysts and Hassall's bodies. Cyst's epithelial cells maintain their polarity and lose the connection with the T and mesenchymal cells.

Primary septae separate the branching epithelial cords of the thymic anlage and receive the blood vessels. Surface of the epithelial cords is covered by a basal lamina, which becomes discontinuous at the dilation of the primary septum. The structural changes in the basal lamina are the first observation and finding, which may explain the existence and absence of blood-thymus barrier in the cortex and medulla, respectively. Anti-keratin immunostaining provided evidence that the KNA is "a dilation" of the primary septae, which develop from the cells of neural crest. This finding suggests, that the KNA of the thymic medulla may also be of neural crest origin. Presence of myoid cells in the KNA may confirm our hypothesis.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

- Ackerman GA, Knouff RA (1964) Lymphocyte formation in the thymus of the embryonic chick. *Anat rec* 149:191-215
- Aichinger M, Wu C, Nedjic J, Klein L (2013) Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J Exp Med* 210:287-300
- Akagawa KS, Takasuka N, Nozaki Y, Komuro I, Azuma M, Ueda M, Naito M, Takahashi K (1996) Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. *Blood* 88:4029-4039
- Akbareian SE, Nagy N, Steiger CE, Mably JD, Miller SA, Hotta R, Molnar D, Goldstein AM (2013) Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Dev Biol* 382:446-456
- Alexandropoulos K, Danzl NM (2012) Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. *Immunol Res* 54:177-190
- Alves NL, Takahama Y, Ohigashi I, Ribeiro AR, Baik S, Anderson G, Jenkinson WE (2014) Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur J Immunol* 44:16-22
- Anderson G, Anderson KL, Tchilian EZ, Owen JJ, Jenkinson EJ (1997) Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25+ CD44+ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. *Eur J Immunol* 27:1200-1206
- Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K (1993) Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362:761-763

- Ardavin C (1997) Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18:350-361
- Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, Klein L (2007) Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8:351-358
- Atibalentja DF, Byersdorfer CA, Unanue ER (2009) Thymus-blood protein interactions are highly effective in negative selection and regulatory T cell induction. *J Immunol* 183:7909-7918
- Atibalentja DF, Murphy KM, Unanue ER (2011) Functional redundancy between thymic CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and Sirp $\alpha$ <sup>+</sup> conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins. *J Immunol* 186:1421-1431
- Auerbach R (1960) Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. *Dev Biol* 2:271-284
- Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N (2009) Crucial contribution of thymic Sirp $\alpha$ <sup>+</sup> conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol* 183:3053-3063
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252
- Barthélémy H, Pelletier M, Landry D, Lafontaine M, Perreault C, Tautu C, Montplaisir S (1986) Demonstration of OKT6 antigen on human thymic dendritic cells in culture. *Lab Invest* 55:540-545
- Bearman RM, Bensch KG, Levine GD (1975) The normal human thymic vasculature: an ultrastructural study. *Anat Rec* 183:485-497
- Bell JJ, Bhandoola A (2008) The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 452:764-767
- Bendriss-Vermare N, Barthélémy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Mouliau N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Brière F (2001) Human

thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107:835-844

Bennett AR, Farley A, Blair NF, Gordon J, Sharp L, Blackburn CC (2002) Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity* 16:803-814

Blackburn CC, Augustine CL, Li R, Harvey RP, Malin MA, Boyd RL, Miller JF, Morahan G (1996) The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5742-5746

Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Mönning JS, Boehm T (2006) Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441:992-996

Bockman DE, Kirby ML (1984) Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 223:498-500

Bockman DE, Kirby ML (1985) Neural crest interactions in the development of the immune system. *J Immunol* 135:766s-768s

Bockman DE, Kirby ML (1989) Neural crest function in thymus development. *Immunol Ser* 45:451-467

Boursalian TE, Golob J, Soper DM, Cooper CJ, Fink PJ (2004) Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol* 5:418-425

Boyd RL, Wilson TJ, Bean AG, Ward HA, Gershwin ME (1992) Phenotypic characterization of chicken thymic stromal elements. *Dev Immunol* 2:51-66

Brocker T (1997) Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186:1223-1232

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J



- (1994) B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-1847
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J (1996) CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 184:695-706
- Cejalvo T, Munoz JJ, Tobajas E, Alfaro D, García-Ceca J, Zapata A (2015) Conditioned deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or thymic epithelial cells alters the organization of thymic medulla and favors the appearance of thymic epithelial cysts. *Histochem Cell Biol* 143:517-529
- Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, Simpson E, Stauss HJ, Hori S, Sakaguchi S, Dyson J (2005) Regulatory T cells, derived from naïve CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* 79:1310-1316
- Clarke AG, Gil AL, Kendall MD (1994) The effects of pregnancy on the mouse thymic epithelium. *Cell Tissue Res* 275:309-318
- Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K, Waithman J, O'Keeffe M, Wu L, Wilson A, Shortman K (2003) The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* 170:4926-4932
- Cordier AC, Haumont SM (1980) Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 157:227-263
- Cordier AC, Heremans JF (1975) Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand J Immunol* 4:193-196
- Crouch E, Wright JR (2001) Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 63:521-554
- D'Amico A, Wu L (2003) The early progenitors of mouse dendritic cells and

plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 198:293-303

Dalloul AH, Patry C, Salamero J, Canque B, Grassi F, Schmitt C (1999) Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a- progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a+ differentiation pathway. *J Immunol* 162:5821-5828

Darnell DK, Zhang LS, Hannehalli S, Yaklichkin SY (2014) Developmental expression of chicken FOXP1 and putative target genes during feather development. *Int J Dev Biol* 58:57-64

de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Aït-Yahia S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C (1998) The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160:1666-1676

deWaal RM, Semeijn JT, Cornelissen MH, Ramaekers FC (1984) Epidermal Langerhans cells contain intermediate-sized filaments of the vimentin type: an immunocytologic study. *J Invest Dermatol* 82:602-604

Dieterlen-Lièvre F, Le Douarin NM (2004) From the hemangioblast to self-tolerance: a series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mech Dev* 121:1117-1128

Dieterlen-Lièvre F, Martin C (1981) Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev Biol* 88:180-191

Dooley J, Erickson M, Farr AG (2005a) An organized medullary epithelial structure in the normal thymus expresses molecules of respiratory epithelium and resembles the epithelial thymic rudiment of nude mice. *J Immunol* 175:4331-4337

Dooley J, Erickson M, Roelink H, Farr AG (2005b) Nude thymic rudiment lacking functional foxn1 resembles respiratory epithelium. *Dev Dyn* 233:1605-1612

Dudakov JA, Hanash AM, Jenq RR, Young LF, Ghosh A, Singer NV, West ML, Smith OM, Holland AM, Tsai JJ, Boyd RL, van den Brink MR (2012) Interleukin-22

- drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 336:91-95
- Dustin AP (1909) Contribution a l'etude du thymus des Reptiles. *Arch Zool Exp Gen.* 42:43-227
- Eckert F, Schmid U (1989) Identification of plasmacytoid T cells in lymphoid hyperplasia of the skin. *Arch Dermatol* 125:1518-1524
- Evans VA, Cameron PU, Lewin SR (2008) Human thymic dendritic cells: regulators of T cell development in health and HIV-1 infection. *Clin Immunol* 126:1-12
- Farr AG, Anderson SK (1985) Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J Immunol* 134:2971-2977
- Farr AG, Dooley JL, Erickson M (2002) Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. *Immunol Rev* 189:20-27
- Farr AG, Nakane PK (1983) Cells bearing Ia antigens in the murine thymus. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 111:88-97
- Farr AG, Rudensky A (1998) Medullary thymic epithelium: a mosaic of epithelial "self"? *J Exp Med* 188:1-4
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F (2006) A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311:83-87
- Fohrer H, Audit IM, Sainz A, Schmitt C, Dezutter-Dambuyant C, Dalloul AH (2004) Analysis of transcription factors in thymic and CD34+ progenitor-derived plasmacytoid and myeloid dendritic cells: evidence for distinct expression profiles. *Exp Hematol* 32:104-112
- Foster K, Sheridan J, Veiga-Fernandes H, Roderick K, Pachnis V, Adams R, Blackburn C, Kioussis D, Coles M (2008) Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J Immunol* 180:3183-3189

- Franchini A, Marchesini E, Ottaviani E (2004) Corticosterone 21-acetate in vivo induces acute stress in chicken thymus: cell proliferation, apoptosis and cytokine responses. *Histol Histopathol* 19:693-699
- Frazier JA (1973) Ultrastructure of the chick thymus. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 136:191-205
- Frommer F, Waisman A (2010) B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells. *PLoS One* 5:e15372
- Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C, Steeber DA, Tedder TF (2002) CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* 108:755-767
- Gameiro J, Nagib PR, Andrade CF, Villa-Verde DM, Silva-Barbosa SD, Savino W, Costa FT, Verinaud L (2010) Changes in cell migration-related molecules expressed by thymic microenvironment during experimental *Plasmodium berghei* infection: consequences on thymocyte development. *Immunology* 129:248-256
- Garcia-Morales C, Rothwell L, Moffat L, Garceau V, Balic A, Sang HM, Kaiser P, Hume DA (2014) Production and characterisation of a monoclonal antibody that recognises the chicken CSF1 receptor and confirms that expression is restricted to macrophage-lineage cells. *Dev Comp Immunol* 42:278-285
- García-Ceca J, Alfaro D, Montero-Herradón S, Tobajas E, Muñoz JJ, Zapata AG (2015) Eph/Ephrins-Mediated Thymocyte-Thymic Epithelial Cell Interactions Control Numerous Processes of Thymus Biology. *Front Immunol* 6:333
- García-Ceca J, Jiménez E, Alfaro D, Cejalvo T, Chumley MJ, Henkemeyer M, Muñoz JJ, Zapata AG (2009) On the role of Eph signalling in thymus histogenesis; EphB2/B3 and the organizing of the thymic epithelial network. *Int J Dev Biol* 53:971-982
- Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G (2008) Blood monocytes: distinct subsets, how they

relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86:398-408

Gill J, Malin M, Holländer GA, Boyd R (2002) Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 3:635-642

Gillard GO, Dooley J, Erickson M, Peltonen L, Farr AG (2007) Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J Immunol* 178:3007-3015

Gordon J, Bennett AR, Blackburn CC, Manley NR (2001) Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mech Dev* 103:141-143

Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, Manley NR, Blackburn CC (2004) Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol* 5:546-553

Guillemot FP, Oliver PD, Peault BM, Le Douarin NM (1984) Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J Exp Med* 160:1803-1819

Gulati P, Chan AS, Leong SK (1995) Ultrastructural localisation of NADPH-diaphorase in the chick thymic medulla. *Cell Tissue Res* 279:405-409

Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, Nguyen L, Ghodsi A, Adler S, Butcher EC (2012) Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36:438-450

Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (1989) The effect of tenascin and embryonic basal lamina on the behavior and morphology of neural crest cells in vitro. *Dev Biol* 132:14-25

Hamazaki Y, Fujita H, Kobayashi T, Choi Y, Scott HS, Matsumoto M, Minato N (2007) Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique

- lineage derived from cells expressing claudin. *Nat Immunol* 8:304-311
- Hammond WS (1954) Origin of thymus in the chick embryo *J Morpho* 95(3):501-521
- Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W, Liu YJ (2010) Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 184:2999-3007
- Hansell C, Zhu XW, Brooks H, Sheppard M, Withanage S, Maskell D, McConnell I (2007) Unique features and distribution of the chicken CD83+ cell. *J Immunol* 179:5117-5125
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38:792-804
- Hassall AH, (1846) *Microscopic Anatomy of the Human Body in Health and Disease*, Highly, London
- Henry L, Durrant TE, Anderson G (1992) Pericapillary collagen in the human thymus: implications for the concept of the 'blood-thymus' barrier. *J Anat* 181 (Pt 1):39-46
- Heusermann U, Stutte HJ, Müller-Hermelink HK (1974) Interdigitating cells in the white pulp of the human spleen. *Cell Tissue Res* 155:415-417
- Hume DA (2008a) Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol* 1:432-441
- Hume DA (2008b) Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 181:5829-5835
- Hwang WS, Ho TY, Luk SC, Simon GT (1974) Ultrastructure of the rat thymus. *A*



transmission, scanning electron microscope, and morphometric study. *Lab Invest* 31:473-487

Häusser G, Ludewig B, Gelderblom HR, Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Meyerhans A (1997) Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage. *Immunobiology* 197:534-542

Igyártó BZ, Nagy N, Magyar A, Oláh I (2008) Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poult Sci* 87:351-355

Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM (1993) Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3038-3042

Irino S, Takasugi N, Murakami T (1981) Vascular architecture of thymus and lymph nodes, blood vessels, transmural passage of lymphocytes, and cell-interactions. *Scan Electron Microsc* 89-98

Ishidate M, Metcalf D (1963) The Pattern Of Lymphopoiesis In The Mouse Thymus After Cortisone Administration Or Adrenalectomy. *Aust J Exp Biol Med Sci* 41:637-649

Isler H (1976) Fine structure of chicken thymic epithelial vesicles. *J Cell Sci* 20:135-147

Itoi M, Tsukamoto N, Yoshida H, Amagai T (2007) Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells. *Int Immunol* 19:953-964

Janeway CA, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216

Jenkinson WE, Jenkinson EJ, Anderson G (2003) Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J Exp Med* 198:325-332

- Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G (2007) PDGFR $\alpha$ -expressing mesenchyme regulates thymus growth and the availability of intrathymic niches. *Blood* 109:954-960
- Jeurissen SH, Claassen E, Janse EM (1992) Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology* 77:75-80
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-155
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000) Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127:1607-1616
- Kaiserling E, Lennert K (1974) [Interdigitating reticulum cell in the human lymph node. A specific cell of the thymus dependent region (author's transl)]. *Virchows Arch B Cell Pathol* 16:51-61
- Kashihara M, Ueda M, Horiguchi Y, Furukawa F, Hanaoka M, Imamura S (1986) A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87:602-607
- Kato S, Schoefl GI (1987) The vasculature of the guinea-pig thymus: topographic studies by light and electron microscopy. *Arch Histol Jpn* 50:299-314
- Kato S, Schoefl GI (1989) Microvasculature of normal and involuted mouse thymus. Light- and electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)* 135:1-11
- Keir ME, Stoddart CA, Linquist-Stepps V, Moreno ME, McCune JM (2002) IFN- $\alpha$  secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus. *J Immunol* 168:325-331
- Kelly KA, Lucas K, Hochrein H, Metcalf D, Wu L, Shortman K (2001) Development of dendritic cells in culture from human and murine thymic precursor cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:43-54

- Kendall MD (1980) Avian thymus glands: a review. *Dev Comp Immunol* 4:191-209
- Kendall MD, Frazier JA (1979) Ultrastructural studies on erythropoiesis in the avian thymus. I. Description of cell types. *Cell Tissue Res* 199:37-61
- Khosla S, Ovalle WK (1986) Morphology and distribution of cystic cavities in the normal murine thymus. *Cell Tissue Res* 246:531-542
- Kiertscher SM, Roth MD (1996) Human CD14<sup>+</sup> leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 59:208-218
- Klein L, Klein T, R  ther U, Kyewski B (1998) CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med* 188:5-16
- Kleindienst P, Chretien I, Winkler T, Brocker T (2000) Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo. *Blood* 95:2610-2616
- Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ, Richie ER (1998) Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11822-11827
- Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, Richie ER (2002) Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* 169:2842-2845
- Koble C, Kyewski B (2009) The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med* 206:1505-1513
- Kocsis K, Benyeda Z, B  di I, Molnár D, Nagy N, Fejszák N, Palya V, Ol  h I (2012) Chicken dendritic cells and type II pneumocytes express a common intracellular epitope. *Br Poult Sci* 53:397-400
- Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL (2001) Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11:520-526

- Kostowiecki M (1967) Development of the so-called double-walled blood vessels of the thymus. *Z Mikrosk Anat Forsch* 77:406-431
- Krutsay M (1980) Szövettani technika. Medicina, Budapest
- Kuratani S, Bockman DE (1990a) Impaired development of the thymic primordium after neural crest ablation. *Anat Rec* 228:185-190
- Kuratani S, Bockman DE (1990b) The participation of neural crest derived mesenchymal cells in development of the epithelial primordium of the thymus. *Arch Histol Cytol* 53:267-273
- Kuratani S, Bockman DE (1991) Capacity of neural crest cells from various axial levels to participate in thymic development. *Cell Tissue Res* 263:99-105
- Kyewski BA, Rouse RV, Kaplan HS (1982) Thymocyte rosettes: multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5646-5650
- Ladi E, Schwickert TA, Chtanova T, Chen Y, Herzmark P, Yin X, Aaron H, Chan SW, Lipp M, Roysam B, Robey EA (2008) Thymocyte-dendritic cell interactions near sources of CCR7 ligands in the thymic cortex. *J Immunol* 181:7014-7023
- Lafontaine M, Landry D, Montplaisir S (1997) Human thymic dendritic cells. *Microsc Res Tech* 38:267-275
- Langerhans P. (1868) Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv Pathol Anat Physiol Klinisch Med*, 44(2-3):325-337
- Lannes-Vieira J, Dardenne M, Savino W (1991) Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *J Histochem Cytochem* 39:1539-1546
- Le Douarin N (1967) Early determination of the anlagen of the thyroid and thymus glands in the chick embryo. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 264:940-942

- Le Douarin NM, Dieterlen-Lièvre F, Oliver PD (1984) Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am J Anat* 170:261-299
- Le Douarin NM, Jotereau FV (1975) Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* 142:17-40
- Le Lièvre CS, Le Douarin NM (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34:125-154
- Lee EN, Park JK, Lee JR, Oh SO, Baek SY, Kim BS, Yoon S (2011) Characterization of the expression of cytokeratins 5, 8, and 14 in mouse thymic epithelial cells during thymus regeneration following acute thymic involution. *Anat Cell Biol* 44:14-24
- Lee SH, Lillehoj HS, Jang SI, Lee KW, Baldwin C, Tompkins D, Wagner B, Del Cacho E, Lillehoj EP, Hong YH (2012) Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken CD83. *Vet Immunol Immunopathol* 145:527-533
- Liu K, Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234:45-54
- Lo AS, Gorak-Stolinska P, Bachy V, Ibrahim MA, Kemeny DM, Maher J (2007) Modulation of dendritic cell differentiation by colony-stimulating factor-1: role of phosphatidylinositol 3'-kinase and delayed caspase activation. *J Leukoc Biol* 82:1446-1454
- Lousberg EL, Diener KR, Fraser CK, Phipps S, Foster PS, Chen W, Uematsu S, Akira S, Robertson SA, Brown MP, Hayball JD (2011) Antigen-specific T-cell responses to a recombinant fowlpox virus are dependent on MyD88 and interleukin-18 and independent of Toll-like receptor 7 (TLR7)- and TLR9-mediated innate immune recognition. *J Virol* 85:3385-3396
- Luche H, Ardouin L, Teo P, See P, Henri S, Merad M, Ginhoux F, Malissen B (2011) The earliest intrathymic precursors of CD8  $\alpha$  (+) thymic dendritic cells

correspond to myeloid-type double-negative 1c cells. *Eur J Immunol* 41:2165-2175

Löning T, Caselitz J, Seifert G, Weber K, Osborn M (1982) Identification of Langerhans cells: simultaneous use of sera to intermediate filaments, T6 and HLA-DR antigens on oral mucosa, human epidermis and their tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 398:119-128

MacDonald KP, Rowe V, Bofinger HM, Thomas R, Sasmono T, Hume DA, Hill GR (2005) The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol* 175:1399-1405

Magner WJ, Chang AC, Owens J, Hong MJ, Brooks A, Coligan JE (2000) Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. *Dev Immunol* 7:179-193

Mahrle G, Bolling R, Osborn M, Weber K (1983) Intermediate filaments of the vimentin and prekeratin type in human epidermis. *J Invest Dermatol* 81:46-48

Mandel T (1968) Ultrastructure of epithelial cells in the medulla of the guinea-pig thymus. *Aust J Exp Biol Med Sci* 46:755-767

Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL (2001a) Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci* 938:167-173; discussion 173-164

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2001b) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97:3333-3341

Martín P, del Hoyo GM, Anjuère F, Ruiz SR, Arias CF, Marín AR, Ardavín C (2000) Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* 96:2511-2519

Mayer S. (1888) Zur Lehre von der Schilddrüse und Thymus bei den Amphibien. *Anat Anz.* 3:97-103



- McKenna HJ (2001) Role of hematopoietic growth factors/flt3 ligand in expansion and regulation of dendritic cells. *Curr Opin Hematol* 8:149-154
- Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM (1990) The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 171:1753-1771
- Milićević NM, Nohroudi K, Milićević Z, Westermann J (2008) Activation of cortical and inhibited differentiation of medullary epithelial cells in the thymus of lymphotoxin-beta receptor-deficient mice: an ultrastructural study. *J Anat* 212:114-124
- Minkó K, Oláh I (1996) Expression of intermediate filaments and N-cadherin adhesion molecule in the thymus of domesticated birds. *Acta Biol Hung* 47:323-340
- Moore AJ, Anderson MK (2013) Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story. *Adv Hematol* 2013:949513
- Morrison-Graham K, Schatteman GC, Bork T, Bowen-Pope DF, Weston JA (1992) A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells. *Development* 115:133-142
- Moussion C, Girard JP (2011) Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479:542-546
- Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K (2007) Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316:1349-1353
- Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-737
- Müller SM, Stolt CC, Terszowski G, Blum C, Amagai T, Kessaris N, Iannarelli P, Richardson WD, Wegner M, Rodewald HR (2008) Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. *J Immunol* 180:5344-5351

- Münz C (2008) Projection of an immunological self shadow to developing T cells via macroautophagy. *Cell Res* 18:1084-1086
- Nagy N, Magyar A, Oláh I (2001) A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anat Embryol (Berl)*. 204(2):123-34.
- Nagy N, Magyar A, Tóth M, Oláh I (2004) Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat Embryol (Berl)* 208:97-107
- Nagy N, Oláh I (2007) Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *J Anat* 211:407-411
- Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A, Kwak JY, Wu L, Shortman K (2007) Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8:1217-1226
- Nakamura H, Ayer-Le Lièvre C (1986) Neural crest and thymic myoid cells. *Curr Top Dev Biol* 20:111-115
- Nakano KE, Nakamura H (1985) Origin of the irideal striated muscle in birds. *J Embryol Exp Morphol* 88:1-13
- Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L (2008) Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455:396-400
- Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz R, Schüddekopf K, Smith AJ, Boehm T (1996) Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 272:886-889
- Neves H, Dupin E, Parreira L, Le Douarin NM (2012) Modulation of Bmp4 signalling in the epithelial-mesenchymal interactions that take place in early thymus and parathyroid development in avian embryos. *Dev Biol* 361:208-219

- Noden DM (1978) The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. *Dev Biol* 67:296-312
- Noden DM (1983) The embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues. *Am J Anat* 168:257-276
- Nowell CS, Bredekamp N, Tetélin S, Jin X, Tischner C, Vaidya H, Sheridan JM, Stenhouse FH, Heussen R, Smith AJ, Blackburn CC (2011) Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet* 7:e1002348
- Odaka C, Loranger A, Takizawa K, Ouellet M, Tremblay MJ, Murata S, Inoko A, Inagaki M, Marceau N (2013) Keratin 8 is required for the maintenance of architectural structure in thymus epithelium. *PLoS One* 8:e75101
- Oh J, Shin J-S (2015) The role of dendritic cells in central tolerance. *Immune Netw.* 15(3):111-120
- Okada T, Lian ZX, Naiki M, Ansari AA, Ikehara S, Gershwin ME (2003) Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33:1012-1019
- Olah I, Glick B (1978) Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. *Experientia* 34:1642-1643
- Olah I, Glick B (1979) Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies. *Poult Sci* 58:195-210
- Olah I, Kendall C, Glick B (1991) Endogenous peroxidase- and vimentin-positive cells accumulate at the corticomedullary border of the chicken thymus. *Poult Sci* 70:1144-1152
- Olah I, Kendall C, Glick B (1992) Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. *Anat Rec* 233:111-120
- Olah I, Nagy N, Vervelde L, (2014) Structure of the avian lymphoid system. in Davison

- F, Kaspers B, Schat K.A. (szerk.), *Avian Immunology*, Elsevier Ltd., 11-44
- Oliver PD, LeDouarin NM (1984) Avian thymic accessory cells. *J Immunol* 132:1748-1755
- Oláh I, Dunay C, Röhlich P, Törö I (1968) A special type of cells in the medulla of the rat thymus. *Acta Biol Acad Sci Hung* 19:97-113
- Oláh I, Glick B (1994) Anti-vimentin monoclonal antibodies differentiate two resident cell populations in chicken spleen. *Dev Comp Immunol* 18:67-73
- Oláh I, Glick B (1995) Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *Anat Rec* 243:384-389
- Onai N, Obata-Onai A, Ohteki T (2007) Developmental pathway of dendritic cell subsets. *Seikagaku* 79:1143-1148
- Ors U DA, Kaymaz FF, Müftüoğlu SF (1999) Cysts in human thymus: maturational forms of Hassal's corpuscles? *Okajimas Folia Anat Jpn* 76:61-69
- Paessens LC, Fluitsma DM, van Kooyk Y (2008) Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes. *J Pathol* 214:96-103
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC (1998) Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 160:4587-4595
- Papoudou-Bai A, Bai M, Doukas M, Stefanaki K, Spyridonos P, Karatzias G, Barbouti A, Galani V, Kanavaros P (2012) Immunohistological characterization of thymic dendritic cells. *In Vivo* 26:985-992
- Patterson S, Knight SC (1987) Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 68 ( Pt 4):1177-1181
- Pelletier M, Tautu C, Landry D, Montplaisir S, Chartrand C, Perreault C (1986) Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology*

58:263-270

- Pereira G, Clermont Y (1971) Distribution of cell web-containing epithelial reticular cells in the rat thymus. *Anat Rec* 169:613-626
- Perera J, Huang H (2015) The development and function of thymic B cells. *Cell Mol Life Sci* 72:2657-2663
- Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stöckl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W (1996) Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14<sup>+</sup> peripheral blood monocytes. *J Immunol* 157:3850-3859
- Poltorak MP, Schraml BU (2015) Fate mapping of dendritic cells. *Front Immunol* 6:199
- Proietto AI, van Dommelen S, Wu L (2009) The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol Cell Biol* 87:39-45
- Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR (1999) Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1036-1041
- Raica M, Cimpean AM, Encica S, Motoc A (2005) Lymphocyte-rich Hassall bodies in the normal human thymus. *Ann Anat* 187:175-177
- Raica M, Encică S, Motoc A, Cîmpean AM, Scridon T, Bârsan M (2006) Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann Anat* 188:345-352
- Raviola E, Karnovsky MJ (1972) Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med* 136:466-498
- Raviola E, Raviola G (1967) Striated muscle cells in the thymus of reptiles and birds: an electron microscopic study. *Am J Anat* 121:623-645
- Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J (1992) Interactions of tumor necrosis

factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol* 149:2681-2688

Res P, Martínez-Cáceres E, Cristina Jaleco A, Staal F, Noteboom E, Weijer K, Spits H (1996) CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 87:5196-5206

Res PC, Couwenberg F, Vyth-Dreese FA, Spits H (1999) Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 94:2647-2657

Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD (1999) Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29:2769-2778

Rodewald HR (2008) Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 26:355-388

Rodewald HR, Paul S, Haller C, Bluethmann H, Blum C (2001) Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature* 414:763-768

Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180:83-93

Rosai J, Levine GD (1976) Tumors of the thymus 2nd series, *Atlas of Tumor Pathology*. Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology pp.26-30

Rossi SW, Chidgey AP, Parnell SM, Jenkinson WE, Scott HS, Boyd RL, Jenkinson EJ, Anderson G (2007) Redefining epithelial progenitor potential in the developing thymus. *Eur J Immunol* 37:2411-2418

Röpke C, Van Soest P, Platenburg PP, Van Ewijk W (1995) A common stem cell for murine cortical and medullary thymic epithelial cells? *Dev Immunol* 4:149-156



Sainte-Marie G, Leblond Cp (1964) Cytologic Features And Cellular Migration In The Cortex And Medulla Of Thymus In The Young Adult Rat. *Blood* 23:275-299

Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-1118

Saunders D, Lucas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shortman K (1996) Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 184:2185-2196

Savagner P, Bauvois B, Deugnier MA, Imhof BA, Thiery JP (1988) Aspects of haemopoietic cell dynamics: ontogeny and targeted migration. *Ann Inst Pasteur Immunol* 139:409-431

Savino W, Dalmau SR, Dealmeida VC (2000) Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol* 7:279-291

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V (2002) Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* 23:305-313

Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM (2004) Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 75:951-961

Savino W, Villa-Verde DM, Lannes-Vieira J (1993) Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today* 14:158-161

Sawanobori Y, Ueta H, Dijkstra CD, Park CG, Satou M, Kitazawa Y, Matsuno K (2014) Three distinct subsets of thymic epithelial cells in rats and mice defined by novel antibodies. *PLoS One* 9:e109995

Schlenner SM, Rodewald HR (2010) Early T cell development and the pitfalls of

potential. *Trends Immunol* 31:303-310

Schmitt N, Cumont MC, Nugeyre MT, Hurtrel B, Barré-Sinoussi F, Scott-Algara D, Israël N (2007) Ex vivo characterization of human thymic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 212:167-177

Seifert R, Christ B (1990) On the differentiation and origin of myoid cells in the avian thymus. *Anat Embryol (Berl)* 181:287-298

Shakib S, Desanti GE, Jenkinson WE, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G (2009) Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J Immunol* 182:130-137

Sheridan J, Gray D (2015) Reinforcing the 'gauntlet' of thymic negative selection via exosomal transfer of self-antigens. *Immunol Cell Biol* 93:679-680

Shezen E, Okon E, Ben-Hur H, Abramsky O (1995) Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell Tissue Res* 279:221-231

Shortman K, Caux C (1997) Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* 15:409-419

Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161

Shortman K, Vremec D, Corcoran LM, Georgopoulos K, Lucas K, Wu L (1998) The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol Rev* 165:39-46

Shortman K, Vremec D, Lees RK, MacDonald HR (1991) Does negative selection involve accumulation of self-reactive thymocytes in thymic rosettes? *Immunol Lett* 28:201-205

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837

- Skogberg G, Gudmundsdottir J, van der Post S, Sandström K, Bruhn S, Benson M, Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Telemo E, Ekwall O (2013) Characterization of human thymic exosomes. *PLoS One* 8:e67554
- Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3:673-680
- Staines K, Young JR, Butter C (2013) Expression of chicken DEC205 reflects the unique structure and function of the avian immune system. *PLoS One* 8:e51799
- Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162
- Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I (1999) Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 60:562-567
- Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA (1979) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 149:1-16
- Steinman RM, Pack M, Inaba K (1997) Dendritic cell development and maturation. *Adv Exp Med Biol* 417:1-6
- Su M, Hu R, Jin J, Yan Y, Song Y, Sullivan R, Lai L (2015) Efficient in vitro generation of functional thymic epithelial progenitors from human embryonic stem cells. *Sci Rep* 5:9882
- Sun L, Li H, Luo H, Zhang L, Hu X, Yang T, Sun C, Chen H, Zhao Y (2013) Phosphatase Wip1 is essential for the maturation and homeostasis of medullary thymic epithelial cells in mice. *J Immunol* 191:3210-3220

- Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ (2000) An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med* 191:1051-1056
- Surh CD, Gao EK, Kosaka H, Lo D, Ahn C, Murphy DB, Karlsson L, Peterson P, Sprent J (1992) Two subsets of epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med* 176:495-505
- Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM (1995) DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 165:302-311
- Szabolcs P, Avigan D, Gezelter S, Ciocon DH, Moore MA, Steinman RM, Young JW (1996) Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood* 87:4520-4530
- Tamiolakis D, Venizelos J, Kotini A, Karamanidis D, Boglou P, Papadopoulos N (2004) A stromal myoid cell line provokes thymic erythropoiesis between 16th to 20th weeks of intrauterine life. *East Afr Med J* 81:78-81
- Törö I, Oláh L (1967) Studies on the blood--thymus barrier. *Acta Biol Acad Sci Hung* 18:135-150
- Thorbecke GJ, Silberberg-Sinakin I, Flotte TJ (1980) Langerhans cells as macrophages in skin and lymphoid organs. *J Invest Dermatol* 75:32-43
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL (2000) Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290:2152-2154
- Tsai PT, Lee RA, Wu H (2003) BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood* 102:3947-3953
- Tschanz S, Schneider JP, Knudsen L (2014) Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Ann Anat*

196:3-11

- Tucker RP (2001) Abnormal neural crest cell migration after the in vivo knockdown of tenascin-C expression with morpholino antisense oligonucleotides. *Dev Dyn* 222:115-119
- Ushiki T (1986) A scanning electron-microscopic study of the rat thymus with special reference to cell types and migration of lymphocytes into the general circulation. *Cell Tissue Res* 244:285-298
- Ushiki T, Takeda M (1997) Three-dimensional ultrastructure of the perivascular space in the rat thymus. *Arch Histol Cytol* 60:89-99
- van Vliet SJ, den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y (2007) Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19:435-440
- Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K (2001) Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97:1733-1741
- Veldman JE (1970) Histophysiology and electron microscopy of the immune response. Thesis, University of Groningen.
- Venzke WG (1952) Morphogenesis of the thymus of chicken embryos. *Am J Vet Res* 13:395-404
- Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A (1997) TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7:291-301
- Vielkind S, Gallagher-Gambarelli M, Gomez M, Hinton HJ, Cantrell DA (2005) Integrin regulation by RhoA in thymocytes. *J Immunol* 175:350-357
- von Gaudecker B, Müller-Hermelink HK (1980) Ontogeny and organization of the stationary non-lymphoid cells in the human thymus. *Cell Tissue Res* 207:287-

- Vroegindeweyj E, Crobach S, Itoi M, Satoh R, Zuklys S, Happe C, Germeraad WT, Cornelissen JJ, Cupedo T, Holländer GA, Kawamoto H, van Ewijk W (2010) Thymic cysts originate from Foxn1 positive thymic medullary epithelium. *Mol Immunol* 47:1106-1113
- Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y, Kawamoto H (2008) Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452:768-772
- Wallin J, Eibel H, Neubüser A, Wilting J, Koseki H, Balling R (1996) Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development* 122:23-30
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu YJ (2005) Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436:1181-1185
- Webb SR, Sprent J (1990) Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur J Immunol* 20:2525-2528
- Weijer K, Uittenbogaart CH, Voordouw A, Couwenberg F, Seppen J, Blom B, Vyth-Dreese FA, Spits H (2002) Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood* 99:2752-2759
- Weiss L (1988) *Cell and tissue biology*, 6th ed. Urban and Schwarzenberg. Baltimore. Munich. PP. 481-491.
- White RG, in Wotstenholme GW, Knight J. (1963) The Immunologically competent cell. CIBA Foundation Study Group, vol 16. Churchill, London, p6.
- Witmer-Pack MD, Crowley MT, Inaba K, Steinman RM (1993) Macrophages, but not dendritic cells, accumulate colloidal carbon following administration in situ. *J Cell Sci* 105 ( Pt 4):965-973
- Wu L, Antica M, Johnson GR, Scollay R, Shortman K (1991) Developmental potential



- of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174:1617-1627
- Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K (2001) Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98:3376-3382
- Wu L, Shortman K (2005) Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 17:304-312
- Wu L, Vremec D, Ardavin C, Winkel K, Süß G, Georgiou H, Maraskovsky E, Cook W, Shortman K (1995) Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. *Eur J Immunol* 25:418-425
- Wu Z, Hu T, Butter C, Kaiser P (2010a) Cloning and characterisation of the chicken orthologue of dendritic cell-lysosomal associated membrane protein (DC-LAMP). *Dev Comp Immunol* 34:183-188
- Wu Z, Kaiser P (2011) Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. *Immunobiology* 216:1177-1183
- Wu Z, Rothwell L, Young JR, Kaufman J, Butter C, Kaiser P (2010b) Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 129:133-145
- Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, Gerdes N, Lutgens E, Ishimaru N, Busslinger M, Brors B, Kyewski B, Klein L (2015a) Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* 42:1048-1061
- Yamano T, Steinert M, Klein L (2015b) Thymic B Cells and Central T Cell Tolerance. *Front Immunol* 6:376
- Yamashita T, Sohal GS (1987) Embryonic origin of skeletal muscle cells in the iris of the duck and quail. *Cell Tissue Res* 249:31-37

- Yamazaki H, Sakata E, Yamane T, Yanagisawa A, Abe K, Yamamura K, Hayashi S, Kunisada T (2005) Presence and distribution of neural crest-derived cells in the murine developing thymus and their potential for differentiation. *Int Immunol* 17:549-558
- Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K (2001) Enhancement of stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology* 104:43-49
- Yu E, Lee I (1993) Reticular network of the human thymus. *J Korean Med Sci* 8:431-436
- Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H (2002) Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol* 168:2609-2617
- Zhang L, Sun L, Zhao Y (2007) Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: an update. *Cell Res* 17:50-55
- Zhou LJ, Tedder TF (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2588-2592

## **PUBLIKÁCIÓS LISTA**

### **A disszertációhoz kapcsolódó publikációk**

Nagy N, **Bódi I**, Oláh I (2015) Avian dendritic cells: phenotype and ontogeny in lymphoid organs Dev Comp Immunol **IF: 2, 815**

**Bódi I**, Minkó K, Molnár D, Nagy N, Oláh I (2015) A novel aspect of the structure of the avian thymic medulla. Cell Tissue Res 359:489-501. **IF: 3,565**

Kocsis K, Benyeda Z, **Bódi I**, Molnár D, Nagy N, Fejszák N, Palya V, Oláh I (2012) Chicken dendritic cells and type II pneumocytes express a common intracellular epitope. Br Poult Sci 53:397-400. **IF: 1,005**

### **A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk**

**Bódi I**, Nagy N, Sinka L, Igyártó BZ, Oláh I (2009) Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. Acta Vet Hung 57:239-246. **IF: 0,624**

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretném megköszönni Dr. Szél Ágoston professzor Úrnak, hogy lehetővé tette munkám befejezését a Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet dolgozójaként.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Oláh Imre professzor Úrnak, az útmutatásért nem csak a kutatás terén, de az élet nagy kérdéseinek megválaszolásában is.

Hálával tartozom Dr. Nagy Nándornak, a Fejlődésbiológiai és Immunmorfológiai Laboratórium vezetőjének, aki úgy segítette munkámat, mintha saját doktorandusz hallgatója lettem volna.

Köszönöm Dr. Röhlich Pál professzor Úrnak, aki segített elmélyülni az elektronmikroszkópia csodálatba ejtő világába, mely oly nagy hatással volt rám.

Hálámat szeretném kifejezni Dr. Magyar Attilának, aki időt szakított szakmai kérdéseim megvitatására, valamint bátorított és segített az Intézetben való helytállásért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Igyártó Botondnak és Dr. Hajdú Zoltánnak, akik segítségemre voltak a laboratóriumi élet kezdeti lépéseinek megtételében és köszönöm, hogy a nagy távolság ellenére meghallgatak, segítettek és vitatkozhattunk.

Hálásan köszönöm Dr. Minkó Krisztinának, hogy együtt dolgozhattunk, a másként gondolkodásért, a pozitív szemléletmódért, a lelki támogatásért és, hogy éjszakába nyúlóan is hajlandó volt munkám jobbá tételében segíteni.

Köszönöm Dr. Molnár Dávidnak a konfokális mikroszkópiában nyújtott segítségét valamint, hogy bármely kérdésben számíthattam rá.

Köszönöm a Fejlődésbiológiai és Immunmorfológiai Laboratórium valamennyi munkatársának Dr. Kocsis Katalinnak, Dr. Barad Csillának, Dr. Dóra Dávidnak, Fejszák Nórának segítségét. Külön köszönet illeti Fölker Orsolyát, Fügedi Jutkát, Vidra Györgyné Zsuzsit, Orbán Editet és Bakó Máriát, akik munkájukkal hozzájárultak kutatási céljaim megvalósításához.

Köszönettel tartozom Keresztes Dávidnak, Dr. Dávid Csabának és Dr. Almási Zsuzsának a morfometriás mérésekben nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok néhai Édesapámnak, hogy mindvégig bízott bennem és köszönöm családomnak, különösen kislányaimnak a türelmüket!

**AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK**  
**KÜLÖNLENYOMATAI**