







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

**"Διερεύνηση της ανοσοτοπογραφικής κατανομής πρωτεϊνών της απόπτωσης  
και του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με την εκτελεστική δυνατότητα της  
απόπτωσης, σε φυσιολογικό θύμο και σε λεμφοζιδιακή υπερπλασία θύμου"**

**ΜΙΧΑΗΛ Γ. ΔΟΥΚΑΣ**  
ΙΑΤΡΟΣ  
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**





«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)».



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Δούκα Μιχαήλ:** 20-2-2002

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 467<sup>α</sup>/2-4-2002

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 16-4-2002

*«Διερεύνηση της ανοσοτοπογραφικής κατανομής πρωτεϊνών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με την εκτελεστική δυνατότητα της απόπτωσης σε φυσιολογικό θύμο και σε λεμφοζιδιακή υπερπλασία θύμου»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 718<sup>α</sup>/12-7-2011

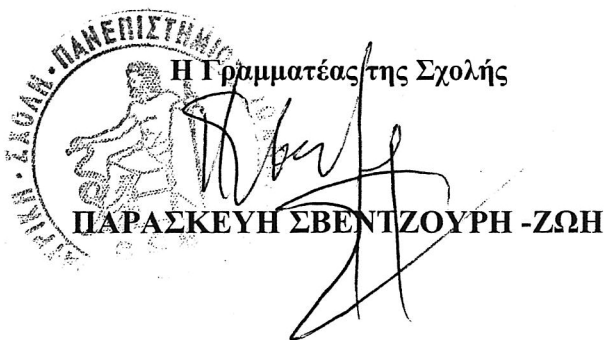
|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Αγνάντη Νίκη</b>         | Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                        |
| <b>Καναβάρος Παναγιώτης</b> | Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία - Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| <b>Μπάη Μαρία</b>           | Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                                |
| <b>Γαλάνη Βασιλική</b>      | Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας -Ιστολογίας - Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων         |
| <b>Κιτσούλης Παναγιώτης</b> | Επίκουρος Καθηγητής Ανατομίας -Ιστολογίας - Εμβρυολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων        |
| <b>Χαρχαντή Αντωνία</b>     | Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας -Ιστολογίας - Εμβρυολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων        |
| <b>Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα</b> | Λέκτορας Ανατομίας -Ιστολογίας -Εμβρυολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                    |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-7-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

  
Η Γραμματέας της Σχολής  
**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΙΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ**



*Στη μνήμη του πατέρα μου*

*Στη σύζυγό μου*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε υπο την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Καναβάρου Παναγιώτη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θα ήθελα αρχικά να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή κ. Καναβάρο Παναγιώτη για την συνεχή επιστημονική του καθοδήγηση, τη βοήθειά του στην κατανόηση της ιστολογίας του θύμου και των εννοιών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου, τη βοήθειά του στην ιστολογική ανάλυση των περιστατικών και στη συζήτηση των ευρημάτων, τη βοήθειά του στην ανάλυση της βιβλιογραφίας, τη συνεχή συνεργασία μαζί του κατά τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής και την αμέριστη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Θερμά ευχαριστώ επίσης την Καθηγήτρια κ. Μπάη Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια και ουσιαστική συμβολή στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Είμαι ευγνώμων για τις πολλές ώρες που αφιέρωσε στη μικροσκόπηση των περιστατικών της μελέτης μαζί μου, τις πολύτιμες διδακτικές παρατηρήσεις της και τη συνεχή υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, αλλά και για την άριστη συνεργασία με το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Όλα αυτά, μαζί με τη μεστή επιστημονική της σκέψη, συνέβαλαν ουσιαστικά στην τελική σύνταξη του κειμένου της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστίες απευθύνω και στην Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Αγνάντη Νίκη για τις εύστοχες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις σε αρκετά από τα θέματα της μελέτης. Η συμβολή της ήταν πολύ σημαντική για μένα στη διάρκεια της εκπαίδευσής μου, στην επιστημονική μου κατάρτιση και τη σταδιοδρομία. Το ενδιαφέρον της ήταν αδιάλειπτο καθόλη τη διάρκεια αυτής της ερευνητικής προσπάθειας.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ροντογιάννη Δήμητρα, Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Ευαγγελισμού, την κ. Στεφανάκη Καλλιόπη, Διευθύντρια στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία» και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κ. Γαλάνη Βασιλική για την πολύτιμη συνεργασία και τις επιστημονικές συμβουλές. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα, Λέκτορα Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας για τη βοήθειά της σε θέματα ορολογίας.

Ευχαριστώ ακόμη τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις επιστημονικές παρατηρήσεις τους στην παρούσα μελέτη.

Με αφορμή την παρούσα διατριβή, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω τα εκλεκτά μέλη των εργαστηρίων μας Αλεξίου Μιχάλη, Χριστοδούλου Άντα, Γκρέπη Κωνσταντίνα, Πάτρα Ειρήνη, Παπασπύρου Γιούλη, Ευσταθοπούλου Κωνσταντίνα και Πήχα Απόστολο για την ουσιαστική βοήθεια και την εξαιρετική συνεργασία.

Να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες των εργαστηρίων μας, Σκύρλα Άγγελο, Χατζηστέργο Κώστα, Λάμπρη Λίτσα Παπούδου-Μπαή Αλεξάνδρα, Χονδρογιάννη Γεώργιο και Κασταμούλα Μιχάλη για την βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τους ζητήθηκε, αλλά και την άριστη συνεργασία όλο αυτό το διάστημα που η μελέτη ήταν σε εξέλιξη.

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στην πρόθυμη βοήθεια που μου προσέφερε ο Μάντζαρης Κώστας και το χρόνο που αφιέρωνε κάθε φορά που ανέκυπτε ένα νεοεμφανιζόμενο πρόβλημα στην ηλεκτρονική διαμόρφωση του κειμένου και της παρουσίασης. Η e-υποστήριξή του ήταν θεμελιώδης. Ειλικρινά είμαι ευγνώμων.

Δε θα μπορούσα να μη πώ ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια από την οποία προέρχομαι, τους υπέροχους γονείς μου και την αδερφή μου, για τη συμπαράστασή τους, τον αγώνα τους, την αδιάλειπτη ηθική και υλική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν οι άνθρωποι που με στήριζαν και έπαιζαν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της προσωπικότητάς μου. Η συμπεριφορά τους αποτελούσε πάντα φωτεινό παράδειγμα για εμένα, ενώ με την εν γένει τους στάση αποτελούσαν πηγή έμπνευσης για νέους στόχους.

Τέλος, θα ήταν αδύνατο να οργανώσω και να φτάσω στην περάτωση αυτής της διατριβής, χωρίς τη συμπαράσταση και αφοσίωση της δικής μου μικρής πυρηνικής οικογένειας, και ιδιαιτέρως της συζύγου μου, Ζώη Βασιλικής. Είναι ο άνθρωπος που βρίσκεται συνεχώς δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια με μεγάλη υπομονή και δίνοντάς μου πάντα κουράγιο να συνεχίσω. Την ευχαριστώ θερμά από τα βάθη της καρδιάς μου και της ζητάω συγγνώμη, αν κάποιες φορές η ιατρική «έκλεβε» περισσότερο χρόνο από το λιγοστό δικό μας προσωπικό χρόνο. Ανεκτίμητη η βοήθεια και η ηθική υποστήριξή της.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |     |
|--|-----|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....   | I   |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....  | III |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....   | 1   |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....   | 3   |
| 1) ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ .....  | 3   |
| <i>Τοπογραφική Ανατομία</i> .....  | 3   |
| <i>Εμβρυολογία</i> .....   | 3   |
| <i>Περιγραφική Ανατομία και Ιστολογία</i> .....  | 5   |
| <i>Αλλαγές σε σχέση με την ηλικία</i> .....  | 15  |
| 2) ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ .....  | 18  |
| ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ GRAVIS .....  | 22  |
| 3) ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ .....  | 24  |
| 3Α) ΑΠΟΠΤΩΣΗ .....   | 24  |
| <i>Εξωγενές Μονοπάτι</i> .....   | 25  |
| <i>Ενδογενές Μονοπάτι</i> .....  | 28  |
| ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΗ ΦΑΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ .....   | 32  |
| <i>Κασπάσες</i> .....  | 32  |
| <i>Αναστολείς Κασπασών</i> .....   | 34  |
| <i>Η οικογένεια Bcl-2</i> .....  | 36  |
| <i>FLIPs</i> .....   | 44  |
| 3Β) ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ .....  | 45  |
| <br>   |     |
| ΣΚΟΠΟΣ .....   | 51  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΣΚΟΠΟ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....  | 51  |
| ΣΚΟΠΟΣ .....   | 55  |
| <br>   |     |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....   | 57  |
| ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....  | 59  |
| ΥΛΙΚΟ .....  | 59  |
| ΜΕΘΟΔΟΙ .....  | 59  |
| <i>Ανοσοϊστοχημεία</i> .....   | 59  |
| <i>Μέθοδος in situ σήμανσης TUNEL</i> .....  | 63  |
| <br>   |     |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....   | 67  |
| Α) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ .....   | 68  |
| ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΤΑ ΘΥΜΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (TECs) ..... | 68  |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bim/BOD και bid</i> .....  | 68  |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin και FLIP<sub>s/L</sub></i> .....                        | 74  |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση του υποδοχέα θανάτου Fas/CD95 και του συνδέτη του FasL</i> .....  | 80  |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κασπάσης-3 και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3</i> .....   | 80  |

|  |            |
|--|------------|
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη-A, κυκλίνη-B1, κυκλίνη-E, κυκλίνη-D2, κυκλίνηD3, κυκλίνη D1</i> .....   | 85         |
| ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΤΑ ΘΥΜΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....   | 91         |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bim/BOD και bid</i> 91   |            |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin και FLIP<sub>S/L</sub></i> .....  | 97         |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση του υποδοχέα θανάτου Fas/CD95 και του συνδέτη του FasL</i> .....  | 103        |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κασπάσης-3 και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3</i> .....   | 103        |
| <i>Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη-A, κυκλίνη-B1, κυκλίνη-E, κυκλίνη-D1, κυκλίνηD2, κυκλίνηD3</i> .....  | 107        |
| ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....   | 113        |
| ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ P53, RB-1 ΚΑΙ HDM2 .....   | 115        |
| <b>Β) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΥΠΟ .....</b>  | <b>116</b> |
| 1. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....   | 116        |
| <i>α) Υποκαψικά</i> .....  | 116        |
| <i>β) Φλοιικής Μοίρας</i> .....  | 116        |
| <i>γ) Μυελικής Μοίρας</i> .....  | 117        |
| <i>δ) Σωμάτια Hassall</i> .....  | 118        |
| 2. ΛΕΜΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....   | 119        |
| <i>α) Φλοιού</i> .....   | 119        |
| <i>β) Μυελού</i> .....   | 119        |
| <b>Γ) ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ .....</b>  | <b>121</b> |
| <br>   |            |
| <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>   | <b>131</b> |
| <b>A) ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ ...</b>  | <b>133</b> |
| A1) ΘΥΜΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (TECs).....  | 133        |
| A2) ΘΥΜΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ (ΤΗΥΜΟΚΥΤΕΣ/ΤΗΥΜΙΚ ΛΥΜΦΟΚΥΤΕΣ).....  | 136        |
| <b>B) ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ ...</b>  | <b>149</b> |
| B1) ΦΛΟΙΚΗ ΖΩΝΗ .....  | 149        |
| B2) ΜΥΕΛΙΚΗ ΖΩΝΗ.....  | 156        |
| <b>Γ) ΣΧΕΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ DNA-DAMAGE RESPONSE.....</b>   | <b>162</b> |
| <b>Δ) ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ (Π.Χ. ΘΥΜΩΜΑΤΑ) ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ (Π.Χ. ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ GRAVIS).....</b> | <b>168</b> |
| <br>   |            |
| <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ .....</b>  | <b>173</b> |
| <br>   |            |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>   | <b>177</b> |
| <b>SUMMARY IN ENGLISH / ABSTRACT .....</b>   | <b>185</b> |
| <b>BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>  | <b>191</b> |

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **1) ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ**

Ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών αποτελούν τα πρωτογενή ή κεντρικά λεμφοποιητικά όργανα<sup>1-18</sup>. Τα λεμφοκύτταρα που διαφοροποιούνται σε αυτά τα όργανα, τα οποία αποτελούν τις κύριες θέσεις λεμφοποίησης, αποικίζουν τις δευτερογενείς ή περιφερικές περιοχές του σώματος, όπου ο λεμφικός ιστός βρίσκεται διάχυτος, “τυλιγμένος” σε κάψα ή σχηματίζει όργανα<sup>17,18</sup>.

### **ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ**

Ο θύμος αδένας ανατομικά βρίσκεται στο άνω-πρόσθιο μεσοθωράκιο και εκτείνεται από το θυρεοειδή αδένα έως το επίπεδο του 4<sup>ου</sup> πλευρικού χόνδρου. Σε σχέση με τις γειτονικές ανατομικές δομές, βρίσκεται πίσω από την προτραχειακή περιτονία, το στερνοϋοειδή και στερνοθυρεοειδή μυ και το στέρνο, ενώ εντοπίζεται μπροστά από την ανώνυμη φλέβα και ανάμεσα από τον τοιχωματικό υπεζωκότα και το εξωπλευρικό λίπος. Έρχεται σε επαφή με το περικάρδιο (εφάπτεται επ’ αυτού), με την ανιούσα αορτή και το αορτικό τόξο πίσω του, ενώ ο ισθμός του εφάπτεται επάνω στην τραχεία. Παράλληλα με τον αδένα, σε κάθε του πλευρά βρίσκονται τα φρενικά νεύρα, τα οποία συγκλίνουν στη μεσότητα αυτού<sup>19</sup>.

Στην κλασική του μορφή, ο θύμος αποτελείται από δύο λοβούς. Μια ποικιλία επεκτάσεων των άνω τμημάτων των λοβών έχει περιγραφεί σε σχέση με την ανώνυμη φλέβα, καθώς επίσης, αντί της αναμενόμενης θέσης του οργάνου, έκτοπος θυμικός ιστός μπορεί να βρεθεί σε αρκετά άτομα μέσα στο μεσοθωρακικό λίπος. Αυτό, είναι πλέον αποδεκτό χειρουργικά ως φυσιολογική ανατομική του θύμου, το οποίο ορίζεται ως “ποικιλία στην ανατομική εντόπιση” και όχι ως “έκτοπος θυμικός ιστός”<sup>20</sup>.

### **ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ**

Ο θύμος αδένας προέρχεται από την ενδοδερμική επιθηλιακή επικάλυψη του κοιλιακού κολπώματος/πτερυγίου. Αναπτύσσεται την 6<sup>η</sup> εμβρυϊκή εβδομάδα από το 3<sup>ο</sup> φαρυγγικό κόλπωμα/θύλακο (με πιθανή συμμετοχή και του 4<sup>ου</sup>), σε κάθε πλευρά του σώματος, σαν πρόδρομος της τελικής του δίλοβης ανατομικής δομής. Η θυμική μάζα από την κάθε πλευρά μετακινείται προς την αντίθετη και στη μέση γραμμή έρχονται σε άμεση επαφή οι δύο λοβοί, χωρίς να συγχωνεύονται, παραμένοντας έτσι από την 8<sup>η</sup> εμβρυϊκή εβδομάδα σαν δύο συνδεδεμένοι λοβοί. Στη συνέχεια, ο αδένας

κατέρχεται, κατά τη διάρκεια της 8<sup>ης</sup> εμβρυϊκής εβδομάδας, από την περιοχή του τραχήλου στο πρόσθιο τμήμα του μεσοθωρακίου, όπου και παίρνει την τελική του θέση. Κατά την κάθοδο αυτή, το ουραίο τμήμα του οργάνου λεπτύνεται και επιμηκύνεται, “σπάζοντας” σε πολλά μικρά κομμάτια, τα οποία συνήθως εξαφανίζονται, αλλά μπορεί και να παραμείνουν στους μαλακούς ιστούς του τραχήλου.

Ο αδένας μοιράζεται κοινή προέλευση με τους κάτω παραθυρεοειδείς αδένες και τα μείζονα θωρακικά αγγεία. Για το λόγο αυτό, παραθυρεοειδικός ιστός μπορεί να βρεθεί μέσα στο θύμο, ενώ διαταραχή στη φυσιολογική ανάπτυξη του θύμου μπορεί να επηρεάσει και τους παραθυρεοειδείς αδένες (π.χ. σύνδρομο DiGeorge) ή τα μεγάλα θωρακικά αγγεία ή και τα δύο.

Το στρωματικό στοιχείο του θύμου είναι ένα σταθερό, μη αιμοποιητικό συστατικό του, που περιλαμβάνει δομικά στοιχεία, όπως ενδιάμεση ουσία (laminin, fibronectin, κολλαγόνο τύπου-IV) και βασικές μεμβράνες, αλλά και κυτταρικά συστατικά. Τα τελευταία συνίστανται κατά μείζονα λόγο από τα επιθηλιακά κύτταρα που δίνουν γένεση στα σωματίδια Hassall και τα δακτυλιοειδή επιθηλιακά κύτταρα που δημιουργούν ένα διάχυτο κυτταρικό δίκτυο<sup>21</sup>. Το επιθηλιακό στοιχείο του οργάνου στις υποκαψικές και μυελικές περιοχές, πιστευόταν πως προέρχεται από το εκτόδερμα, ενώ αυτό της φλοιικής μοίρας είναι ενδοδερμικής προέλευσης<sup>22</sup>. Ωστόσο όμως, νέα πειραματικά δεδομένα από χιμαιρικές όρνιθες, δείχνουν πως η προέλευση όλων των επιθηλιακών κυττάρων του θύμου αδένος είναι από ένα βλαστικό δέρμα αντί δύο, και αυτό είναι το ενδόδερμα<sup>23</sup>. Ο συνδετικός ιστός του αδένος προέρχεται από το μεσόδερμα. Ο λεκιθικός ασκός και το εμβρυικό ήπαρ και στη συνέχεια και ο μυελός των οστών χορηγούν τα λεμφοκύτταρα που αποικίζουν τον αδένος<sup>24-30</sup>.

Στο τέλος της 9<sup>ης</sup> εμβρυϊκής εβδομάδας ο θύμος έλκει τα αρχέγονα λεμφικά κύτταρα από την αιματική κυκλοφορία και δημιουργεί ένα επιθηλιακό μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο θυμοκύτταρα μπορούν να εξελιχθούν σε ώριμα T λεμφοκύτταρα. Στο ορτύκι αυτό γίνεται την 5<sup>η</sup> εμβρυϊκή ημέρα, στις όρνιθες την 6,5 και στα ποντίκια τη 10<sup>η</sup><sup>31</sup> ή 11<sup>η</sup>-12<sup>η</sup><sup>32</sup> και στο λιγότερο μελετημένο κουνέλι τη 13<sup>η</sup>-15<sup>η</sup><sup>33</sup>. Τα πρόδρομα ενδοδερμικά κύτταρα που αποίκισαν τον αδένος, εμπλουτίζονται από λεμφοκύτταρα από το εμβρυϊκό ήπαρ και το μυελό των οστών μετά δε την 22<sup>η</sup> εβδομάδα αποκλειστικά από το μυελό των οστών<sup>34-36</sup>. Αυτά, γίνονται ο πολυπληθέστερος κυτταρικός πληθυσμός του οργάνου και το τελευταίο διαμορφώνει τη φλοιική και μυελική περιοχή, οι οποίες είναι σαφώς εμφανείς από τη 12<sup>η</sup> εμβρυϊκή

εβδομάδα<sup>37</sup>. Επαρκής ανάπτυξη του επιθηλιακού στοιχείου του αδένου κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης περιόδου είναι πολύ σημαντική, καθώς διαταραχή αυτής, οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας του θύμου να έλκει αρχέγονα λεμφικά κύτταρα. Μικρές, σωληνώδεις δομές αποτελούμενες από επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζονται αυτό το χρονικό διάστημα<sup>38,39</sup> και αργότερα δίνουν τη γέννηση των σωμάτων Hassall. Τα σώματα αυτά είναι εμφανή όταν η λεμφοποίηση έχει ήδη εγκαθιδρυθεί και η μυελική και φλοιική περιοχή του θύμου είναι αναγνωρίσιμες<sup>40</sup>. Στα τρωκτικά οι δομές αυτές είναι σπάνιες συγκρινόμενες με τον άνθρωπο<sup>41</sup>.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, πλήρης ή μερική αποτυχία του αδένου να κατέλθει στο μεσοθωράκιο, οδηγεί αντίστοιχα σε πλήρη ή μερική παρουσία θυμικού ιστού σε θέσεις άλλες από την αρχικά αναμενόμενη<sup>13</sup>. Το γεγονός αυτό δημιουργεί σημαντικές τεχνικές δυσκολίες στη χειρουργική προσέγγιση/προσπέλαση του αδένου. Ωστόσο, οι περισσότερες περιπτώσεις αυτού του έκτοπου τραχηλικού ή μεσοθωρακικού ιστού αντιστοιχούν σε κυστικό, μη λειτουργικό τμήμα του αδένου. Επιπλέον, διαταραχές στην εμβρυολογική ανάπτυξη του οργάνου μπορούν να γίνουν προάγγελοι συγγενών διαταραχών και μορφολογικών ανωμαλιών.

## ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ και ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ο θύμος αδένου ποικίλει σε βάρος και μέγεθος ανάλογα με την ηλικία του ατόμου. Στον ενήλικα έχει βάρος γύρω στα 25gr και καταλαμβάνει όγκο ίσο με 25cm<sup>3</sup>. Στα πρώτα χρόνια της ζωής έχει σχήμα πυραμίδας, σταδιακά όμως μέχρι την εφηβεία αλλάζει και αποκτά σχήμα σαν το γράμμα “H” Αποτελείται από δύο ασύμμετρους λοβούς, χρώματος ηωσινόφιλου κατά την παιδική ηλικία, λόγω της έντονης αιμάτωσης και κιτρινόφαιου κατά την εφηβεία, λόγω της εναπόθεσης λιπώδους ιστού.

Ο θύμος αδένου περιβάλλεται από ινώδη κάψα που αποτελείται από εξωτερική και εσωτερική ζώνη κολλαγόνου και δικτυωτών ινών, η οποία τον διαχωρίζει από τους περιβάλλοντες ιστούς. Δοκίδες αποτελούμενες από ινοβλάστες και δοκίδες πλούσιες σε κολλαγόνο τύπου-1, προερχόμενες από την κάψα και συγκεκριμένα από την εσωτερική ζώνη, χωρίζουν τον κάθε λοβό σε πολλαπλές μικρές δομές, τα λόβια, τα οποία δεν είναι τελείως ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Έτσι, ο θύμος γίνεται ένα πολυλοβωτό όργανο, με το κάθε λόβιο να έχει μέγεθος μεταξύ 0,5-2mm. Τα λόβια αποτελούνται από ένα εξωτερικό πυκνοχρωματικό τμήμα, το φλοιό, ο οποίος περιλαμβάνει επιθηλιακά κύτταρα ενδοδερμικής προέλευσης και

λεμφοκύτταρα τα οποία δε σχηματίζουν οζίδια, και από ένα αραιοχρωματικό εσωτερικό τμήμα, το μυελό, ο οποίος περιλαμβάνει επιθηλιακά κύτταρα ενδοδερμικής προέλευσης και λεμφοκύτταρα που συνιστούν μόνο το 5% περίπου του συνολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στο θύμο. Αυτά τα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν μία δομή σκελετού στον αδένα, αντί του μεσεγγύματος που συναντούμε στα υπόλοιπα λεμφοειδή όργανα και μπορούν να ταξινομηθούν μορφολογικά σε έξι υπότυπους, τέσσερις στο φλοιό και δύο στο μυελό.

Τα λόβια είναι δυναμικές δομές, καθώς λεμφοκύτταρα παράγονται συνεχώς στο φλοιό, και αν και πολλά υφίστανται απόπτωση και απομακρύνονται με τα μακροφάγα, αρκετά μεταναστεύουν στο μυελό και εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία μέσω μετατριχοειδικών φλεβιδίων.

Ο θύμος αδένας δεν έχει πύλη και οι αρτηρίες για την αιμάτωσή του, που προέρχονται από τις κάτω θυρεοειδικές και έσω μαστικές αρτηρίες, εισέρχονται στο όργανο μέσω της φλοιομυελικής ζώνης, αφού πρώτα ακολουθήσουν την πορεία των διαφραγματίων συνδετικού ιστού που χωρίζει τα λόβια. Η αιμάτωση της φλοιώδους ζώνης γίνεται μόνο από τριχοειδή και κανένα άλλο τύπο αγγείων. Η φλεβική αποχέτευση είναι κυρίως κεντρική, μέσω φλεβικών στελεχών στην οπίσθια επιφάνεια του αδένα, που καταλήγουν απευθείας στην ανώνυμη φλέβα. Προσαγωγή λεμφαγγεία δεν υπάρχουν και το όργανο δεν αποτελεί ηθμό για τη λέμφο, ενώ τα απαγωγά λεμφαγγεία παροχετεύουν σε μεσοθωράκιους, παραστερνικούς και πυλαίους λεμφαδένες. Η ενεύρωση του αδένα γίνεται από συμπαθητικές και φρενικές νευρικές ίνες.

Έχει προταθεί ότι ο θύμος χωρίζεται σε δύο μεγάλα λειτουργικά τμήματα. Το μυελό και το φλοιό από τη μια, που συνιστούν το αληθές θυμικό παρέγχυμα και το εξωπαρεγχυματικό τμήμα από την άλλη, που αποτελείται από το περιαγγειακό διάστημα.

Τα αγγεία του θύμου περιβάλλονται από ένα στίχο επιθηλιακών κυττάρων. Τα φλοιικά τριχοειδή έχουν συνεχές ενδοθήλιο, ενώ αυτά του μυελού και των διαφραγματίων του στηρικτικού ιστού είναι θυριδωτά. Αυτή η ανατομική διαμόρφωση, οδήγησε στην υπόθεση του αιματο-θυμικού φραγμού. Έχει αποδειχτεί πως αν και μερικά μακρομόρια που βρίσκονται στο αίμα μπορούν να διηθήσουν το θύμο, η κατανομή τους περιορίζεται στο μυελό, δείχνοντας πως η παρουσία του φραγμού εντοπίζεται στο επίπεδο του φλοιού. Ο περιαγγειακός χώρος, κυρίως αποτελείται από συνδετικό ιστό. Μακροφάγα, πλασματοκύτταρα και ηωσινόφιλα



συναντώνται συχνά σε αυτή την περιοχή. Εκεί υπάρχει ο αιματο-θυμικός φραγμός, ο οποίος αποτρέπει εξωτερικά μακρομόρια να εισέλθουν στον αδένα<sup>42</sup>. Ο φραγμός αυτός αποτελείται από τις ακόλουθες δομές: 1) το τοίχωμα των τριχοειδών με τα ενδοθηλιακά του κύτταρα και τη βασική μεμβράνη, 2) ένα μικρό ποσό περιαγγειακού συνδετικού στηρικτικού ιστού που περιέχει μερικά κύτταρα (π.χ. μακροφάγα), 3) τα επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα με τη βασική τους μεμβράνη<sup>43</sup>. Έτσι, ο θύμος δεν έρχεται άμεσα αντιμέτωπος με κυκλοφορούντα αντιγόνα και συνεπώς αποτρέπει την ενεργοποίηση των ανώριμων T-κυττάρων που υπάρχουν σε αυτόν. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες<sup>44</sup>, αντικρούουν την ανωτέρω θεωρία και υποστηρίζουν πως η φλοιική μοίρα του θύμου μπορεί να είναι διαπερατή για μόρια ανοσοσφαιρίνης που βρίσκονται στα εξωαγγειακά τμήματα του θύμου. Παρ' όλα αυτά, άλλοι υποστηρίζουν πως ακόμη και αν αυτό συμβεί, αυτές οι ποσότητες του υλικού που θα κατορθώσουν να διεισδύσουν στο φλοιό, φαγοκυτταρώνονται γρήγορα από τα μακροφάγα.

Η βασική δομική μονάδα του θύμου αδένα, το λόβιο, απαρτίζεται από δύο μορφολογικά ξεχωριστά τμήματα, το φλοιό και το μυελό, καθένα από τα οποία αποτελείται από ποικίλη αναλογία θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και θυμικών λεμφοκυττάρων<sup>45</sup> (**Εικόνες 1-7**). Σε τρωκτικά έχει υπολογιστεί ότι ο μυελός καταλαμβάνει περίπου 1/3 του λοβιακού όγκου και πως η φυσιολογική αναλογία φλοιού:μυελού είναι κοντά στο 2:1<sup>46</sup>. Στο φλοιό, ο αραιός επιθηλιακός κυτταρικός πληθυσμός επισκιάζεται από τα πολυάριθμα, πυκνά διατασσόμενα και ταχέως πολλαπλασιαζόμενα (μιτωτικός πολλαπλασιασμός 5-10 φορές υψηλότερος απ' ό,τι σε άλλα λεμφικά όργανα), μικρού μεγέθους λεμφοκύτταρα. Ο μυελός, αντίθετα, αποτελείται από μεγαλύτερο αριθμό επιθηλιακών κυττάρων και λιγότερα λεμφοκύτταρα<sup>47</sup>.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου έχουν παραδοσιακά χωριστεί σε αυτά που συναντώνται στη φλοιική μοίρα και σε αυτά που συναντώνται στη μυελική μοίρα. Μερικά από τα τελευταία διατάσσονται σε κερατινοποιημένες δομές σχήματος σφαιριδίου, γνωστά ως σωμάτια Hassall<sup>48</sup> (**Εικόνες 2-7**). Στη βρεφική ηλικία, τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα είναι “φουσκωμένα”, με στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα. Το κυτταρόπλασμά τους και ειδικά στην περίπτωση των επιθηλιακών κυττάρων που εντοπίζονται στη φλοιική μοίρα, χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες λεπτές κυτταροπλασματικές προσεκβολές, οι οποίες επεκτείνονται στο παρέγχυμα του αδένα και έρχονται σε επαφή, μέσω δεσμοσωμάτων<sup>49</sup>, με τις αντίστοιχες των

γειτονικών κυττάρων, σχηματίζοντας ένα πραγματικό δίκτυο που περιβάλλει αθροίσεις Τ-λεμφοκυττάρων και τα απομονώνει από τα τριχοειδή. Αυτό το γνώρισμα οδήγησε στο χαρακτηρισμό τους και ως δικτυοεπιθηλιακά κύτταρα (δικτυωτά επιθηλιακά κύτταρα, μορφολογία δενδριτικών κυττάρων). Γενικά, χαρακτηρίζονται από άφθονο κυτταρόπλασμα, φυσαλιδώδη ωοειδή πυρήνα, διάσπαρτη χρωματίνη και μικρό πυρήνιο. Τα επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα του θύμου αδένα, διαφέρουν από όλα τα άλλα δικτυοκύτταρα, γιατί έχουν όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, επιθηλιακή και όχι μεσεγγυματική προέλευση και γι' αυτό και δεν αποκτούν φαγοκυτταρικές ιδιότητες. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα δικτυοεπιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν εκκριτικά κοκκία και κυστίδια, προφανώς για την έκκριση θυμοσίνης. Τα διάφορα είδη επιθηλιακών κυττάρων στο θύμο, έχουν σημαντικό και ενεργό ρόλο στην Τ-κυτταρική ωρίμανση, είτε μέσω διαλυτών ουσιών, είτε μέσω άμεσης επαφής με τα θυμοκύτταρα, καθώς τα περιβάλλουν κατά ομάδες και τα απομονώνουν από τα αντιγόνα που κυκλοφορούν<sup>50</sup>.

Μία κατηγορία επιθηλιακών κυττάρων που έχουν κύρια τοπογραφική εντόπιση στο φλοιό, ονομάζονται τροφικά κύτταρα (Nurse Cells). Στην πραγματικότητα πρόκειται για δύο υπότυπους επιθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στο φλοιό, οι οποίοι αποτελούν το κύριο μέρος της δικτυοεπιθηλιακής δομής του οργάνου και ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία των βοηθητικών (nurse) κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο τύπος-2 επιθηλιακών κυττάρων εντοπίζεται στο έξω και μέσο τμήμα του δικτύου και χαρακτηρίζεται από κύτταρα με μεγάλο πυρήνα (μεγ. διαμ. 10-12 μm) και έντονο πυρήνιο, ενώ ο τύπος-3 επιθηλιακών κυττάρων, εντοπίζεται βαθύτερα στο φλοιό και τα κύτταρα έχουν ανώμαλου σχήματος πυρήνα και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τόσο ο πυρήνας, όσο και το κυτταρόπλασμα, εμφανίζουν μεγάλο εύρος “ηλεκτρονικής” πυκνότητας. Τα βοηθητικά κύτταρα σχηματίζουν δίκτυο/δομές που περικλείει πολυάριθμα Τ-λεμφοκύτταρα (30 ή και περισσότερα)<sup>51</sup>. Πιστεύεται ότι αυτά τα βοηθητικά κύτταρα προσφέρουν ένα ειδικό μικροπεριβάλλον κατάλληλο για Τ-κυτταρική ωρίμανση, διαφοροποίηση και επιλογή. Έχει βρεθεί ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα διαθέτουν μόρια MHC<sup>a</sup> κλάσης I και II στην επιφάνειά τους<sup>52</sup> και πιστεύεται πως έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της “θετικής” επιλογής, ενώ η απόκτηση ικανότητας αυτό-ανοχής από τα λεμφοκύτταρα οφείλεται

<sup>a</sup> Major Histocompatibility Complex

στην πολύ στενή επαφή τους με αυτά τα επιθηλιακά κύτταρα κατά τη διαφοροποίησή τους.

Οι δύο ανωτέρω υπότυποι επιθηλιακών κυττάρων που σχηματίζουν το τρισδιάστατο υποστηρικτικό δίκτυο του αδένου, περιβάλλονται από έναν άλλο τύπο επιθηλιακών κυττάρων. Ακριβώς κάτω από την κάψα, τα κύτταρα του τύπου αυτού είναι παρόντα σχεδόν σε συνεχόμενη γραμμή, που εκτείνεται προς το εσωτερικό του θύμου, περιβάλλοντας τα διαφραγμάτια και τα εισερχόμενα και εξερχόμενα από το όργανο αγγεία. Χαρακτηρίζονται από πυρήνα με ανώμαλο περίγραμμα και έντονο πυρήνιο. Αυτά είναι τα τύπου-1 επιθηλιακά κύτταρα ή γενικά υποκαψικό-περιαγγειακό επιθήλιο.

Στο μυελό όπως και στο φλοιό υπάρχουν διάφοροι τύποι επιθηλιακών κυττάρων. Διάσπαρτα επιθηλιακά κύτταρα τύπου-4 ανευρίσκονται στο βαθύτερο τμήμα του φλοιού, αλλά είναι περισσότερο άφθονα στο μυελό και χαρακτηρίζονται από πιο βαθυχρωματική χρώση σε σχέση με τους άλλους τρεις τύπους επιθηλιακών κυττάρων που υπάρχουν στο φλοιό. Ο πυρήνας εμφανίζει ανώμαλο περίγραμμα και στο κυτταρόπλασμα ανευρίσκονται άφθονα κυστίδια, μερικά από τα οποία περιέχουν υλικό μέτριας “ηλεκτρονικής” πυκνότητας. Αυτά τα σκουρόχρωμα κύτταρα σχηματίζουν το κυτταρικό δίκτυο του μυελού<sup>53</sup>.

Τύπου-5 επιθηλιακά κύτταρα ανευρίσκονται σε μικρές αθροίσεις στην περιοχή του φλοιομυελικού ορίου, καθώς και διάσπαρτα μεμονωμένα στο μυελό. Εμφανίζουν πυρήνα με ανώμαλο περίγραμμα ή με επίμηκες σχήμα και συμπύκνωση της χρωματίνης στην περιφέρεια. Επιπλέον, αναγνωρίζεται η παρουσία έντονου πυρήνιου, έχουν λιγότερο κυτταρόπλασμα σε σχέση με άλλα δικτυωτά κύτταρα και πιστεύεται πως είναι σχετικά αδιαφοροποίητα κύτταρα. Μεγαλύτερα, αραιοχρωματικά τύπου-6 επιθηλιακά κύτταρα περιορίζονται στη μυελική ζώνη και χαρακτηρίζονται από ευχρωματικό πυρήνα με έντονο πυρήνιο. Μερικά είναι στρογγύλου σχήματος, ενώ άλλα αποπλατυσμένα και τείνουν να “τυλίγονται” το ένα γύρω από το άλλο. Αυτά τα κύτταρα πιστεύεται πως εμπλέκονται στο σχηματισμό των σωματίων Hassall<sup>54</sup>.

Τα σωματία Hassall (HCs<sup>b</sup>) με διάμετρο 10-150μm, συνιστούν το πιο εύκολα αναγνωρίσιμο ιστολογικό συστατικό στοιχείο του θύμου κατά τη μικροσκόπηση με το οπτικό μικροσκόπιο. Περιορίζονται στο μυελό και χαρακτηρίζονται από

---

<sup>b</sup> Hassall Corpuscles

συγκεντρικό πρότυπο κερατινοποίησης, με την κερατίνη να είναι υψηλού μοριακού βάρους (επιδερμικού τύπου). Αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα του μυελού και εναποθέσεις/υλικό εκφυλισμένων κυττάρων. Έχει προταθεί πως αντιπροσωπεύουν θέση ωρίμανσης των μυελικών θυμοκυττάρων<sup>55</sup>. Άλλες μελέτες προτείνουν πως τα HCs είναι ενεργά διότι εκεί λαμβάνει χώρα ενεργός σηματοδότηση μονοπατιών όπως των MAP κινασών<sup>56-59</sup>. Όπως φαίνεται, αν και η σημασία τους δεν είναι ξεκάθαρη, διαθέσιμα στοιχεία καταδεικνύουν συμμετοχή στη φυσιολογική λειτουργία του αδένου. Αυτές οι δομές αυξάνουν σε μέγεθος και αριθμό σε όλη τη ζωή και μπορεί να εμφανίσουν μια ποικιλία στη μορφολογική τους εμφάνιση, κυρίως ως αποτέλεσμα αντιδραστικών αλλαγών δευτεροπαθών σε φλεγμονή. Οι αλλαγές περιλαμβάνουν την κυστική εκφύλιση με συσσώρευση κυτταρικών αποτρίμματων, τη δυστροφική ασβέστωση και τη διήθηση από λεμφοκύτταρα, αφρώδη μακροφάγα και ηωσινόφιλα. Πιστεύεται ότι οι περισσότερες πολύχρωμες κύστει του θύμου δεν είναι συγγενείς ανωμαλίες, αλλά αποτέλεσμα κυστικής διόγκωσης των σωματίων Hassall στη βάση επίκτητων φλεγμονωδών αλλαγών του οργάνου. Δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο ακόμη, αν οι έξι τύποι επιθηλιακών κυττάρων που έχουν περιγραφεί στο θύμο είναι όντως ξεχωριστοί ή αν ο αριθμός τους είναι μικρότερος, καθώς μερικοί από αυτούς ενδέχεται να αποτελούν διαφορετικό λειτουργικό στάδιο του ίδιου κυτταρικού τύπου.

Ο κυρίαρχος κυτταρικός πληθυσμός της φλοιικής μοίρας του θύμου είναι τα λεμφοκύτταρα που μπορεί να εμφανίζονται ως μεγάλου, μεσαίου ή μικρού μεγέθους. Χαρακτηριστικά λόγω της μεταβολής στο μέγεθός τους, τα λεμφοκύτταρα του φλοιού έχουν ομαλό περίγραμμα και πολυεδρική μορφή. Μεγάλοι, μιτωτικά ενεργοί λεμφοβλάστες, αποτελούν περίπου το 15% των λεμφοειδών κυττάρων και βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην υποκαψική περιοχή του φλοιού. Αυτά τα λεμφοκύτταρα έχουν μεγάλο στρογγύλο ή ωοειδή πυρήνα (συνήθως σπειροειδή), ένα ή δύο εμφανή πυρήνια και σχετικά άφθονο, ισχυρά βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Μια ροπή προς μικρότερα, λιγότερο μιτωτικά ενεργά κύτταρα υπάρχει όσο κινείται κανείς από την έξω μοίρα της φλοιικής ζώνης προς τη φλοιομυελική συμβολή και σε μικρότερο βαθμό στη μυελική ζώνη. Η πλειονότητα των θυμικών λεμφοκυττάρων που συναντώνται στην υποκάψια περιοχή και το βαθύτερο τμήμα του φλοιού έχουν μικρή διάρκεια ζωής και πεθαίνουν. Αυτό οδηγεί σε λεμόλυση και φαγοκυττάρωση, ένα χαρακτηριστικό που επηρεάζει μορφολογικά αυτές τις περιοχές και τους δίνει μια εικόνα έναστρου ουρανού.

Στη μυελική μοίρα τα T-λεμφοκύτταρα είναι ώριμα, μεσαίου μεγέθους και σε μικρότερη πυκνότητα απ' ότι στη φλοιική μοίρα. Τα ώριμα λεμφοκύτταρα φεύγουν από το θύμο και εισέρχονται στην κυκλοφορία μέσω των μετατριχοειδικών φλεβιδίων και σχηματίζουν τον πληθυσμό των T κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.

Εκτός από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα θυμοκύτταρα, ο θύμος αδένας περιέχει μια ποικιλία άλλων κυτταρικών δομών. Β-λεμφοκύτταρα μπορούν να βρεθούν είτε σε λεμφοειδείς αθροίσεις, είτε ως διάσπαρτα μεμονωμένα κύτταρα. Τα μεμονωμένα Β-λεμφοκύτταρα συναντώνται τόσο στο έμβρυο, όσο και στο φυσιολογικό ενήλικα θύμο, διασκορπισμένα κατά μήκος της κάψας και των διαφραγματίων, σε στενή σχέση με τα μικρά αγγεία της φλοιομυελικής ζώνης και του μυελού<sup>62</sup>.

Επιπλέον, στο θύμο συναντώνται μακροφάγα κύτταρα ευρισκόμενα κυρίως στο φλοιό, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εκκαθάριση των νεκρωμένων λεμφοκυττάρων, δακτυλιοειδώς αναστωμούμενα (δενδριτικά) κύτταρα ευρισκόμενα κυρίως στο μυελό, αλλά και τη φλοιομυελική ζώνη, τα οποία εμφανίζουν ταχύ ρυθμό ανανέωσης (2-3 εβδομάδες), ενεργούν ως εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα μεσολάβησης στην “αρνητική επιλογή” απ' ότι τα επιθηλιακά κύτταρα<sup>25</sup>, ενώ συμμετέχουν και στην επαγωγή της κεντρικής ανοχής<sup>60,61</sup>. Τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ποντίκια έχουν βρεθεί τρεις υποπληθυσμοί δενδριτικών κυττάρων (πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα/pDCs<sup>c</sup> και δύο υπότυποι συμβατικών μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων/cDCs<sup>d</sup>)<sup>63</sup>.

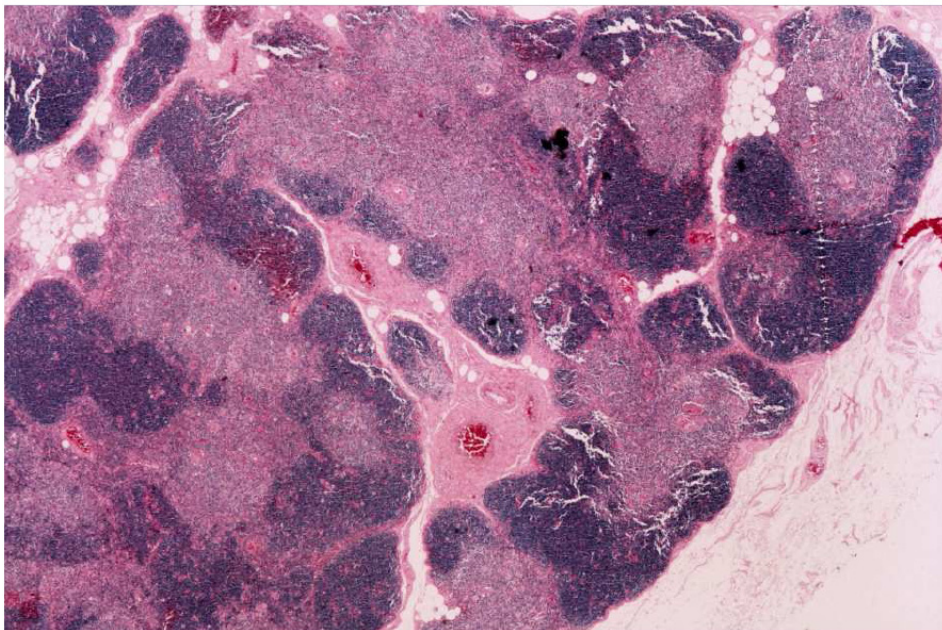
Άλλοι τύποι κυττάρων είναι τα κύτταρα Langerhans που επίσης βρίσκονται στο μυελό, ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα που συναντώνται κυρίως στα διαφραγμάτια του συνδετικού ιστού ή στο μυελό. Μαστοκύτταρα μπορούν να αναγνωρισθούν κυρίως σε περιαγγειακές θέσεις, πλασματοκύτταρα είναι σπάνια και αν τα παρατηρήσει κανείς βρίσκονται στα διαφράγματα συνδετικού ιστού. Τα νευροενδοκρινικά κύτταρα είναι πλέον ευρέως αποδεκτό, πως αποτελούν ένα σταθερό συστατικό του κυτταρικού πληθυσμού του θύμου αδένος. Έχει υποστηριχθεί δε, πως μερικά από αυτά τα κύτταρα μπορεί να είναι μορφολογικά και λειτουργικά ανάλογα των κυττάρων C του θυροειδούς αδένος. Επιπρόσθετα, στο θύμο αδένος των

<sup>c</sup> plasmacytoid Dendritic Cells

<sup>d</sup> common Dendritic Cells

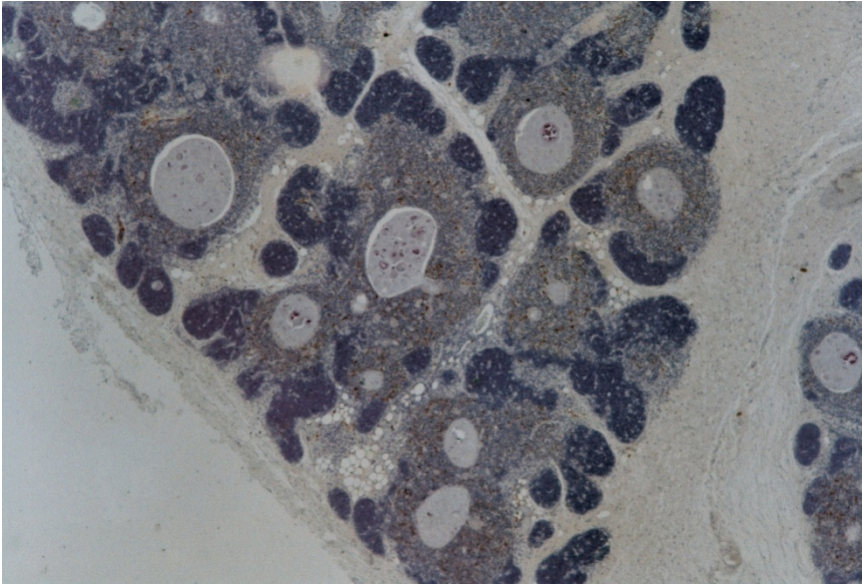
τροφικών και των πουλιών και σπάνια στα θηλαστικά και στη μετεμβρυϊκή ζωή του θύμου στον άνθρωπο<sup>62</sup>, στη μυελική ζώνη, συναντάται ένας ακόμη κυτταρικός τύπος, τα μυοειδή κύτταρα του Hammar, τα οποία πιστεύεται πως αποτελούν εμβρυϊκά υπολείμματα και έχουν υπερηχογραφικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά γραμμωτού μυός (θετική ανοσοχρώση σε δεσμίνη, μυοσίνη).

Ο θύμος παράγει διάφορους πρωτεϊνικούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν τα T-λεμφοκύτταρα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Τέσσερις από αυτούς τους παράγοντες έχουν ανακαλυφθεί: η θυμοσίνη-α, η θυμοποιητίνη, η θυμουλίνη και ο θυμικός χυμικός παράγοντας. Η θυμοσίνη-α εμπλέκεται στα όψιμα στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης. Η θυμοποιητίνη και ο θυμικός χυμικός παράγοντας είναι σημαντικοί στην ενίσχυση της λεμφοκυτταρικής αντιδραστικότητας<sup>64</sup>.

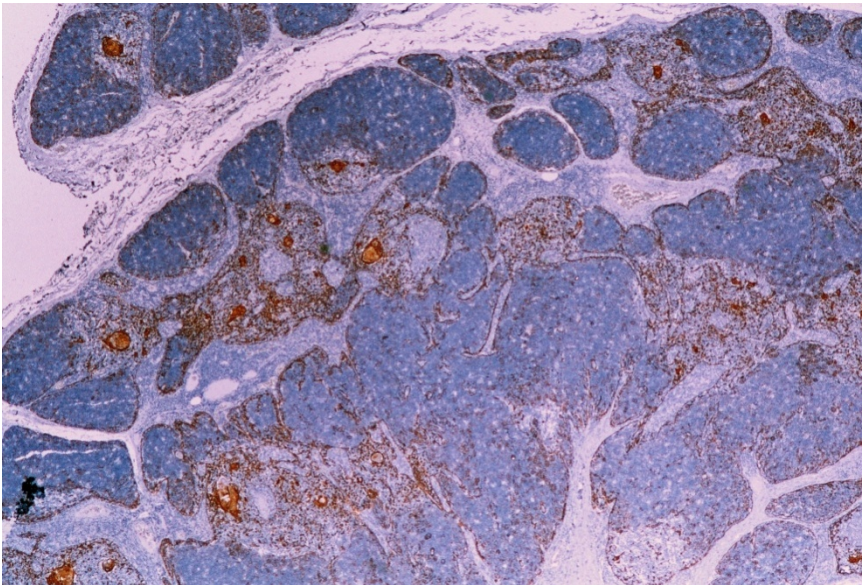


**Εικόνα 1:** Θύμος: διακρίνονται οι αραιοχρωματικές περιοχές του μυελού και οι πυκνοχρωματικές περιοχές του φλοιού (H-E X100).

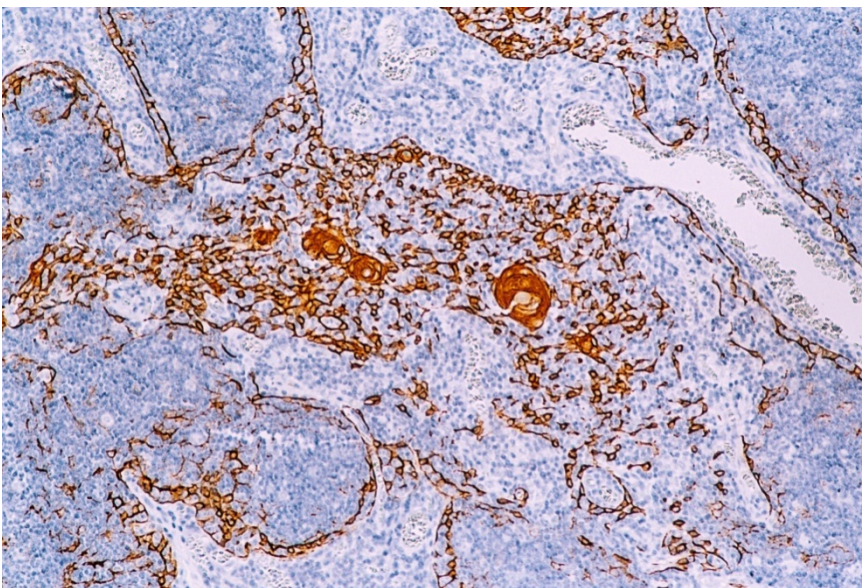




**Εικόνα 2:** Θύμος:  
ανοσοχρώση  
S-100 (X100).  
Διακρίνονται ο φλοιός,  
ο μυελός και τα  
σωμάτια Hassall.

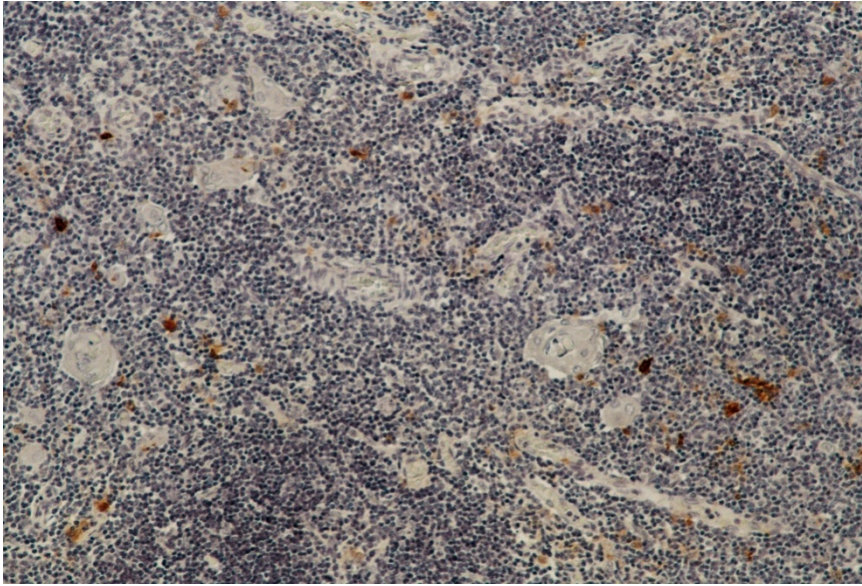


**Εικόνα 3:** Θύμος:  
ανοσοχρώση  
πανκρεατίνης MNF116  
(X100).  
Διακρίνονται ο φλοιός,  
ο μυελός και τα  
σωμάτια Hassall.

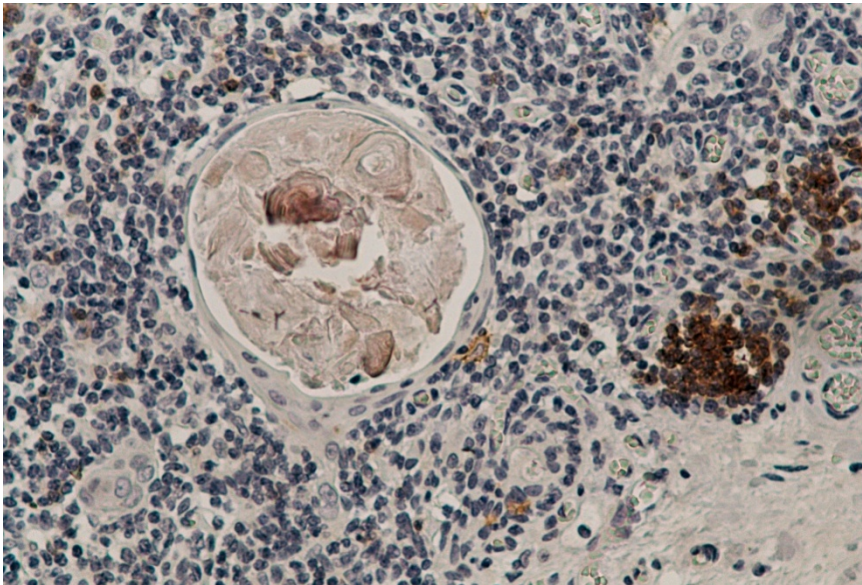


**Εικόνα 4:** Θύμος:  
ανοσοχρώση  
πανκρεατίνης MNF116  
(X250).  
Διακρίνονται τα  
υποκαψικά, τα φλοιικά,  
τα μυελικά θυμικά  
επιθηλιακά κύτταρα και  
τα σωμάτια Hassall.

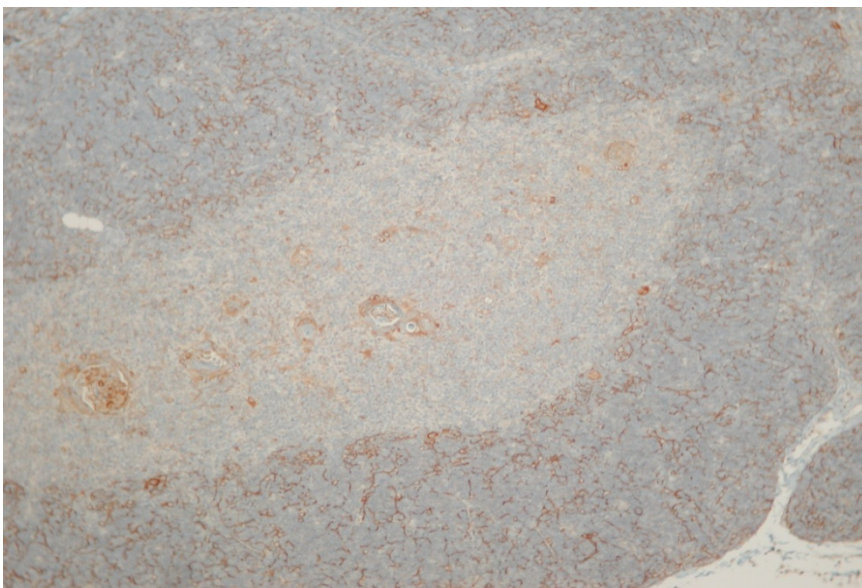




**Εικόνα 5:** Θύμος:  
ανοσοχρώση  
CD207 (X250).  
Διακρίνονται τα  
σωμάτια Hassall.



**Εικόνα 6:** Θύμος:  
ανοσοχρώση  
CD1a (X400).  
Διακρίνονται ένα  
εκφυλισμένο  
σωμάτιο Hassall  
και CD1a θετικά  
λεμφοκύτταρα.



**Εικόνα 7:** Θύμος:  
ανοσοχρώση  
τουμπουλίνης IV  
(X100).  
Διακρίνονται ο φλοιός,  
ο μυελός και τα  
σωμάτια Hassall.



## ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ

### ΔΟΜΙΚΕΣ

Ο θύμος αδένας είναι πλήρως αναπτυγμένος στη γέννηση και ζυγίζει περίπου 10-35gr. Αυξάνει σε βάρος μέχρι την ηλικία των 2 ετών, οπότε και σταθεροποιείται και αρχίζει να αυξάνεται σε βάρος ξανά ανάμεσα στις ηλικίες 7-12. Τότε το βάρος του διπλασιάζεται και το σχήμα του γίνεται στενότερο και πιο επίμηκες<sup>19</sup>. Στη συνέχεια και μέχρι την ενηλικίωση υπάρχει μια προοδευτική αντικατάσταση της πλειονότητας των περιαγγειακών θέσεων από λιπώδη και ινώδη ιστό, έτσι ώστε στην ηλικία των 50 ετών, το λίπος να αναλογεί στο 80% περίπου του συνολικού όγκου του αδένου<sup>65</sup>. Άλλοι ερευνητές προτείνουν πως η υποστροφή του αδένου ξεκινάει ήδη από τη γέννηση και συμβαίνει με μια ποσοστιαία αναλογία 3% του λειτουργικού ιστού/έτος μέχρι τη μέση ηλικία, οπότε και το ποσοστό ελάττωσης του λειτουργικού ιστού κατ' έτος μειώνεται στο 1%<sup>66</sup>. Με αυτές τις αναλογίες ο θύμος πρόκειται να εξαφανιστεί ως όργανο στην ηλικία των 120 χρόνων<sup>67-70</sup>. Τέλος, υπάρχει και μία τρίτη άποψη στη βιβλιογραφία που υποστηρίζει πως η υποστροφή (involution) του θύμου αδένου, ξεκινά λίγο μετά το πρώτο έτος της ζωής, οπότε και το όργανο έχει φτάσει σε μέγιστο μέγεθος (25cm<sup>3</sup>) και συνεχίζει ως το υπόλοιπο της ζωής<sup>71-73</sup>.

Στα πρώτα στάδια, οι αλλαγές αποτελούνται από μια μείωση κυρίως του αριθμού των ανώριμων φλοιικών θυμοκυττάρων<sup>37</sup> με σχετική διατήρηση των επιθηλιακών στοιχείων. Σε πιο προχωρημένα στάδια, χάνεται η τυπική λοβώδης αρχιτεκτονική<sup>37</sup>, το παρέγχυμα του θύμου αδένου επανέρχεται σε μια πιο αρχέγονη εμφάνιση και αντικαθίσταται από νησίδια επιθηλιακών κυττάρων χωρίς λεμφοκύτταρα, μερικώς κυστικά, κοντινά αθροιζόμενα σωματίδια Hassall και άφθονο ενδιάμεσο λιπώδη ιστό. Σε πειραματόζωα έχει παρατηρηθεί πως τα επιθηλιακά κύτταρα του μυελού γίνονται υπερπλαστικά με την πάροδο της ηλικίας<sup>29</sup>. Επιπλέον, παρατηρείται μείωση σε όλους τους δείκτες των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων<sup>74</sup>, με ταυτόχρονη αύξηση της ίνωσης<sup>75</sup> και αποδιοργάνωσης της φλοιομυελικής ζώνης. Αυτά συνδυάζονται και με την αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων. Η “σχέση” ανάμεσα στα θυμοκύτταρα και τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, είναι αμφίδρομη, καθώς η ανάπτυξη και διατήρηση μιας μοναδικής θυμικής αρχιτεκτονικής για την παραγωγή ανοσοϊκανών T-λεμφοκυττάρων, εξαρτάται και επηρεάζεται από αμφότερες τις ανωτέρω κατηγορίες κυττάρων.

Η αντικατάσταση του αδένου από λιπώδη ιστό, καθιστά δύσκολο το διαχωρισμό από τον περιβάλλοντα μεσοθωρακικό λιπώδη ιστό και τα όριά του

μπορούν να προσδιοριστούν μόνο μέσω της κάψας του. Αυτή η απώλεια λειτουργικού αδενικού ιστού εισήγαγε στην ιατρική τον όρο που έχει περιγραφεί ως εκφύλιση/υποστροφή (involution)<sup>76</sup> και οδηγεί σε ένα ελάχιστο τμήμα φλοιού και μυελού να εναπομένει στον αδένα του ενήλικου, το οποίο είναι οργανωμένο δομικά σαν το λεμφοζίδιο<sup>77</sup>. Η συγκεκριμένη υποστροφή συνήθως δεν οδηγεί σε αλλαγή του ολικού μεγέθους του αδένα, αλλά μόνο στον πραγματικό θυμικό ιστό. Είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία και εξαρτάται από ένα σημαντικό αριθμό παραγόντων όπως οι γοναδικές και θυμικές ορμόνες, κυτταρικές και ορμονικές αλληλεπιδράσεις, τα επίπεδα των κορτικοστεροειδών, το έντονο stress, εγκυμοσύνη, HIV λοίμωξη<sup>78</sup>, φλεγμονή, ακτινοβολία<sup>79-81</sup> κ. α. Ταχεία υποστροφή οφειλόμενη σε οξύ stress ή κάποιο ατύχημα (π.χ. φαρμακευτικός παράγοντας) οδηγεί σε έντονη καρυορρηξία των λεμφοκυττάρων με ενεργό φαγοκυττάρωση από μακροφάγα, κάτι που δημιουργεί εικόνα έναστρου ουρανού χαρακτηριστικά αναπτυσσόμενη στην περιοχή του φλοιού του αδένα και έχει παρατηρηθεί και σε πειραματόζωα (π.χ. κουνέλια)<sup>29</sup>.

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ

Δεδομένου ότι ο θύμος είναι η κύρια ανατομική περιοχή παραγωγής T ώριμων κυττάρων, καθώς και της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού κατά τη διάρκεια της ζωής, οι αλλαγές που επισυμβαίνουν στο όργανο με το πέρασμα του χρόνου είναι ποσοτικές και όχι ποιοτικές και ο θύμος στον ενήλικα διατηρεί την ικανότητα της συνεισφοράς στην T-κυτταρική επαναφορά<sup>82-85</sup>. Όμως πρόσφατες μελέτες<sup>86</sup> υποστηρίζουν πως τα θυμοκύτταρα που εξέρχονται του θύμου σε ηλικιωμένους, παρουσιάζουν ενδογενείς λειτουργικές διαταραχές, καθώς κάποια ή και όλα τα στάδια διαφοροποίησης έχουν υποστεί μεταβολή λόγω της αυξημένης ηλικίας του ατόμου.

Παράλληλα, με την αύξηση της ηλικίας, τόσο στα ποντίκια, όσο και στους ανθρώπους<sup>87</sup> υπάρχει μια στροφή προς την κατεύθυνση της αύξησης του αριθμού των ενεργοποιημένων T-κυττάρων ή κυττάρων μνήμης και ταυτόχρονη μείωση των παρθένων T-κυττάρων. Η πολλαπλασιαστική ικανότητα των θυμοκυττάρων μειώνεται σημαντικά, ενώ η απόπτωση αυξάνεται προϊούσης της ηλικίας. Είναι όμως αδιευκρίνιστο αν αυτά τα “παθολογικά” αποτελέσματα προκύπτουν από την αδυναμία του θύμου να έλξει νέα προγονικά κύτταρα από την αιματική κυκλοφορία, ή από την αδυναμία του οργάνου να προάγει την λεμφοποιητική ωρίμανση στα προγονικά κύτταρα που υπάρχουν μέσα σε αυτό. Αυξανόμενα επιστημονικά στοιχεία

δείχνουν πως η αλλαγή στο μικροπεριβάλλον του ηλικιωμένου θύμου ασκεί καθοριστικό ρόλο στις αλλαγές στα T-λεμφοκύτταρα<sup>88-90</sup>. Μάλιστα υπάρχει μια σύγκλιση απόψεων πως οι κύριες λειτουργικές και φαινοτυπικές αλλαγές σε σχέση με την ηλικία συμβαίνουν στον υποπληθυσμό των διπλά αρνητικών (DN<sup>c</sup>) θυμοκύτταρων<sup>91,92</sup>.

Επιπλέον, στην περιφέρεια, παρατηρείται μια άθροιση κυττάρων τα οποία δεν μπορούν να ανταποκριθούν σε ερεθίσματα με την ευχέρεια που ανταποκρίνονται τα T-κύτταρα σε νέους σε ηλικία<sup>93</sup>. Όμως, παρόλη την ελάττωση του αριθμού των κυττάρων που εξέρχονται από το θύμο, υπάρχει ένα σταθερό επίπεδο περιφερικών T-κυττάρων<sup>94</sup>, το οποίο φαίνεται να ελέγχεται από ομοιοστατικούς μηχανισμούς<sup>95,96</sup>. Μάλιστα μελέτες<sup>97</sup> κάνουν λόγο ότι ο αδένας λειτουργεί επαρκώς, εκπληρώνοντας το ρόλο του στην καλύτερη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος ακόμη και στην 6<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής. Οι Steinmann και συν.<sup>68</sup> υποστηρίζουν πως και μετά τα 100 χρόνια θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παραμένουν μαζί με φλοιικά λεμφοκύτταρα παρόντα.

---

<sup>c</sup> Double Negative

## 2) ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ του ΘΥΜΟΥ

Η φυσιολογία του θύμου είναι ένα επιστημονικό πεδίο πολύπλοκο, που διευρύνεται συνεχώς με νέες πληροφορίες και το οποίο δεν είναι πλήρως κατανοητό ακόμη. Ο θύμος είναι ένα όργανο με ενδοκρινικές ιδιότητες, καθώς και η κύρια περιοχή T-κυτταρικής ωρίμανσης. Προσφέρει το κατάλληλο κυτταρικό και ορμονικό μικροπεριβάλλον για τη μετατροπή των ανώριμων φλοιικών θυμοκυττάρων σε ώριμα ανοσοϊκανά T-λεμφοκύτταρα<sup>25,35,98,99</sup>. Ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα από την εμβρυϊκή ζωή και εντεύθεν. Από την 9<sup>η</sup> εμβρυϊκή εβδομάδα το αρχέγονο επιθηλιακό στοιχείο του ανθρώπινου αδένου αποικίζεται από προ-θυμικά αρχέγονα κύτταρα που προέρχονται από τα αιμοποιητικά κέντρα. Η αντίστοιχη διαδικασία στα ποντίκια ξεκινά τη 10<sup>η</sup>-12<sup>η</sup> ημέρα της εμβρυογένεσης<sup>100,101</sup> και εκτιμάται ότι σε νεαρά ενήλικα ποντίκια περίπου 10-100 κύτταρα εισέρχονται στο θύμο αδένου κάθε μέρα<sup>102</sup>. Βιβλιογραφικά δεδομένα προτείνουν, πως αυτό είναι μια περιοδική και όχι μια συνεχόμενη διαδικασία<sup>103</sup>, κάτι που υποδηλώνει πως ο θύμος ενεργά προσελκύει νέα προγονικά κύτταρα από την περιφέρεια σαν απάντηση στις συνθήκες που το απαιτούν.

Υπό την επίδραση χημειοτακτικών ερεθισμάτων, αυτά τα πρόδρομα T-κύτταρα εισέρχονται στον αδένου μέσω των μετατριχοειδικών φλεβιδίων, στο όριο μυελού και φλοιού<sup>104,105</sup>, αναγνωρίζονται πρώτα στον περι-μυελικό φλοιό<sup>106</sup> και ευθύς μεταναστεύουν στο περιφερικό τμήμα του φλοιού, όπου υφίστανται μια διαδικασία ωρίμανσης μέχρι να μετακινηθούν με αντίθετη από πριν πορεία κατεύθυνσης, προς το μυελό<sup>107</sup>. Το “πρόγραμμα” διαφοροποίησης που υφίστανται περιλαμβάνει αλλαγές στο φαινότυπο της κυτταρικής επιφάνειας, στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και στη λειτουργικότητά τους. Σημεία “κλειδιά” σε όλη αυτή τη διαδικασία είναι: i) η δέσμευση προς κάποια κατεύθυνση κυτταρικής σειράς (lineage commitment) αφού τα πρόδρομα κύτταρα που εισέρχονται στον αδένου είναι πολυδύναμα και η επιλογή κυτταρικής σειράς γίνεται εντός του οργάνου, ii) οι διαδικασίες επιλογής (positive και negative selection) και iii) η μετανάστευση των κυττάρων.

Κατά την ωρίμανση, τα αιμοποιητικά κύτταρα που αποικίζουν το θύμο ακολουθούν την πορεία της T-κυτταρικής διαφοροποίησης μέσω της επίδρασης του μικροπεριβάλλοντος του θύμου. Από τη στιγμή που τα προγονικά κύτταρα θα βρεθούν μέσα στο θύμο, υφίστανται μία διάρκειας περίπου 2 εβδομάδων λεμφοποιητική διαδικασία, η οποία οδηγεί στην παραγωγή κυττάρων T-κυτταρικής

σειράς που εκφράζουν αμφότερους τους κυτταρικούς υποδοχείς της σειράς, το CD4 και το CD8 (CD4+CD8+ double positive, DP).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει πως το πρωιμότερο ενδοθυμικό προγονικό κύτταρο είναι το διπλά-αρνητικό σταδίου ένα (CD4-CD8- double negative stage 1, DN1), το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί και προς διάφορα κύτταρα μη-T-κυτταρικής σειράς<sup>108</sup>. Διαφοροποίηση στο επόμενο στάδιο, DN2 (double negative stage 2), συσχετίζεται με απώλεια της δυνατότητας προς B κυτταρική διαφοροποίηση ή προς κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), αν και διατηρείται η δυνατότητα για παραγωγή εκτός από T-κύτταρα και δένδριτικών κυττάρων<sup>109</sup>. Από τη στιγμή όμως που τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε DN3 (double negative stage 3), δεσμεύονται πλέον για διαφοροποίηση προς κύτταρα της T-κυτταρικής σειράς. Αυτό γίνεται μέσω αναδιάταξης (rearrangement), με τη μορφή των D-προς-J και V-προς-DJ αναδιατάξεων, των β γονιδίων που σχετίζονται με τον αντιγονικό T-κυτταρικό υποδοχέα (αβ-TCR)<sup>110,111</sup>. Ταυτόχρονα το παραγόμενο TCR-β συνδέεται με το pre-TCR-α (pTα) και μόρια της CD3 οικογένειας, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο έναν υποδοχέα ικανό να εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια (pre-TCR). Κατόπιν, υπάρχει ρύθμιση προς τα κάτω (downregulation) κάποιων υποδοχέων (π.χ. CD25, Rag-1, Rag-2) οπότε τα κύτταρα περνούν στο επόμενο στάδιο ωρίμανσης και ονομάζονται DN4<sup>112</sup> (double negative stage 4). Γενικά, μπορούμε να σημειώσουμε πως η υποδιαίρεση των DN πρώιμων T-κυττάρων σε τέσσερα στάδια, εν πολλοίς βασίζεται στον τρόπο που συνδυάζεται η έκφραση ή μη, κυρίως των CD44<sup>113</sup>, CD25 και CD117<sup>114</sup>, αλλά και των CD34 και CD1α<sup>115,116</sup>.

Τοπογραφικά τα DN1 κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στον περιμυελικό φλοιό, με τα DN2 κύτταρα να αναπτύσσονται στη μεσότητα του φλοιού και τα DN3 κύτταρα να κυριαρχούν στο περιφερικό τριτημόριο του φλοιού. Αφιξη των τελευταίων στην υποκαψική περιοχή, συνδυάζεται με τη διαφοροποίησή τους στο στάδιο των πρώιμα διπλά θετικών κυττάρων (pre-DP). Από εκεί ακολουθεί η μετανάστευσή τους πίσω στο φλοιό στην αντίθετη κατεύθυνση από ότι πριν<sup>117</sup>.

Τα κύτταρα “πεθαίνουν”, αν δεν ανασυνδυαστούν τα β γονίδια στον TCR και επομένως αν δεν εκφραστούν παράλληλα με τη μη-πολυμορφική προ-TCR α-αλυσίδα<sup>118</sup>. Η διαδικασία ονομάζεται β-επιλογή<sup>119,120</sup>. Ο TCR, ο οποίος δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί αν εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση ή αν ενεργά κατευθύνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων<sup>121</sup>, αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με πεπτιδικά τμήματα αντιγόνων που είναι ενωμένα με

τα HLA τάξης I μόρια (για τα κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα) ή τα τάξης II μόρια (για τα βοηθητικά CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα). Έπειτα από το στάδιο του προ-T κυττάρου, τα ανώριμα θυμοκύτταρα περνούν από μια εκρηκτική φάση πολλαπλασιασμού και εκφράζουν ταυτόχρονα στην επιφάνειά τους, τόσο τον υποδοχέα CD4 όσο και τον CD8, αλλά και το CD3, που αποτελεί ένα σύμπλεγμα συσχετιζόμενων πολύπεπτιδίων. Τα κύτταρα είναι πλέον διπλά θετικά TCR<sup>int</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Τα DP θυμοκύτταρα αποτελούν την πλειονότητα των υποπληθυσμών στο θύμο (περίπου 80%).

Κατόπιν στη διαδικασία της κυτταρικής ωρίμανσης, υπάρχουν κάποιες “επιλογές” (selection) που εξαρτώνται από λεμφο-στρωματικές αλληλεπιδράσεις στο θυμικό παρέγχυμα και έχουν ως στόχο να βεβαιώσουν πως τα ώριμα κύτταρα που θα εξέλθουν του οργάνου, θα είναι λειτουργικά και ανοσο-ικανά<sup>122-124</sup>. Τα κύτταρα που αναγνωρίζουν με μια, τουλάχιστον ενδιάμεση, συνάφεια (intermediate avidity) ίδια προς τον οργανισμό-HLA, επιλέγονται θετικά (positive selection)<sup>125</sup> από τα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού, ενώ θυμοκύτταρα χωρίς ειδικότητα ή με πολύ χαμηλή συνάφεια για ίδια προς τον οργανισμό-HLA πεθαίνουν by neglect<sup>126</sup> (>80% του συνόλου). Με άλλα λόγια είναι αυτά τα κύτταρα που επί της ουσίας δεν κατόρθωσαν να δημιουργήσουν έναν υποδοχέα αβ-TCR με ικανοποιητική συνάφεια προς τα ίδια συμπλέγματα πεπτιδίων-MHCs.

Από τα κύτταρα που επιβιώνουν, τα βοηθητικά κύτταρα χάνουν την έκφραση του υποδοχέα CD8 και γίνονται μόνο CD4 θετικά (CD4 single positive/4SP), ενώ αντίθετα τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα γίνονται μόνο CD8 θετικά (CD8 single positive/8SP). Αυτοί οι δύο αποτελούν τους κυριότερους T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Αν και τα θυμοκύτταρα σε αυτό το στάδιο αποκτούν ώριμο φαινότυπο (CD3/TCR<sup>hi</sup>), η λειτουργική τους ωριμότητα φαίνεται να χρειάζεται μια αρκετά εκτεταμένη περίοδο μετά τη θετική επιλογή, που μπορεί να φτάνει έως και την εβδομάδα. Οι CD3 αλυσίδες σχετίζονται στενά με τον T-κυτταρικό υποδοχέα και βοηθούν στη μεταβίβαση ερεθισμάτων κατά τη σύνδεση με το HLA σύμπλεγμα. Υπάρχει η ιδέα πως η θετική και αρνητική επιλογή προέρχονται από διαφορετικά ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης<sup>127</sup>.

Μια από τις σημαντικότερες συνέπειες της θετικής επιλογής είναι η μετακίνηση των κυττάρων στο μυελό, όπου η τελική ωρίμανση λαμβάνει χώρα. Καθώς λοιπόν τα θυμοκύτταρα φτάνουν στη φλοιομυελική και μυελική περιοχή, οποιοδήποτε T-κύτταρο διατηρεί την ικανότητα αναγνώρισης και προσβολής ιδίων κυττάρων (σχέση υψηλής συνάφειας με αντιγονικούς επιτόπους του ίδιου του

οργανισμού), απορρίπτεται μέσω απόπτωσης<sup>128,129</sup>, μια διαδικασία που ονομάζεται αρνητική επιλογή<sup>130</sup> (negative selection) ή κεντρική ανοχή (central tolerance) και τα δενδριτικά και επιθηλιακά κύτταρα του μυελού ασκούν θεμελιώδη ρόλο. Έχει δε εκφραστεί η άποψη στη βιβλιογραφία πως τα MHC κλάσης-I θυμοκύτταρα μπορεί να μην υφίστανται την αρνητική επιλογή στο μυελό, αλλά στο φλοιό<sup>131</sup>. Ανεξάρτητα όμως από το τελευταίο, η αρνητική επιλογή έχει σαν συνέπεια τα T-κύτταρα που βγαίνουν στην κυκλοφορία να αναγνωρίζουν με ασθενή συνάφεια ίδια μόρια του οργανισμού. Παρόλα αυτά, έχει δειχθεί πως κάποια αυτοδραστικά T-κύτταρα διαφεύγουν της αρνητικής επιλογής<sup>132</sup>. Εκτός όμως από αυτά, πρόσφατα έχει εκφραστεί η άποψη από πειράματα σε ποντίκια, πως κάποια θυμοκύτταρα που ήταν να οδηγηθούν στον κυτταρικό θάνατο μέσω της αρνητικής επιλογής, τελικά δεν οδηγούνται, αλλά αντίθετα κάνουν προσαρμογή/επεξεργασία του TCR (TCR editing) υποδοχέα τους και επιβιώνουν<sup>133</sup>.

Στα ποντίκια ένα ποσοστό της τάξης του 1-2% του συνόλου των θυμοκυττάρων εξέρχεται ανά ημέρα από τον αδένα στην περιφέρεια. Στον άνθρωπο το 3-5% των κυττάρων που φτάνουν στο στάδιο των DP ωριμάζει και εξέρχεται στην περιφέρεια<sup>134</sup>. Στοιχεία δείχνουν, πως η λειτουργική ωρίμανση, καθορίζει την T-κυτταρική μετανάστευση, παρά μια παθητική διαδικασία, βασισόμενη στην ηλικία του θυμοκυττάρου<sup>135,136</sup>. Τα κυκλοφορούντα βοηθητικά (CD4+) και κατασταλτικά (CD8+) προερχόμενα από το θύμο T-κύτταρα, εξασκούν μια ποικιλία ρόλων στην κυτταρική ανοσία, που περιλαμβάνουν επαγωγή της κυτταροτοξικότητας, επιβραδυνόμενου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας και απόρριψη μοσχευμάτων. Τα βοηθητικά CD4+ κύτταρα χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, Th1<sup>f</sup> και Th2, αν και σε μελέτες<sup>137,138</sup> έχει αναφερθεί και τρίτη κατηγορία Th3, εκκρίνουν διαφορετικές κυτταροκίνες και με διαφορετικό τρόπο στο ανοσοποιητικό σύστημα<sup>139</sup>. Τέλος, ένα ποσοστό της τάξης του 5-10% των ώριμων CD4+ T-κυττάρων στο μυελό γίνονται CD25+ ρυθμιστικά T-κύτταρα (Tregs<sup>g</sup>). Πρόσφατη μελέτη όμως υποστηρίζει πως τα Tregs, είναι κύτταρα που έχουν μέτρια προς υψηλή συνάφεια με αντιγονικούς επιτόπους του ίδιου οργανισμού και που έχουν “ξεφύγει” της αρνητικής επιλογής<sup>140</sup>. Επιπλέον, άλλη πρόσφατη μελέτη προτείνει πως τα ανθρώπινα CD4+CD25+Treg κύτταρα δημιουργούνται στο μυελό του θύμου, σε στενή σχέση με τα DCs, τα οποία

---

<sup>f</sup> T-helper

<sup>g</sup> T-regulators

φαίνεται να ενεργοποιούνται από το TSLP<sup>h</sup> που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των HCs<sup>141</sup>.

Τα Tregs μπορούν να ελαττώσουν/καταστείλουν αντιδράσεις άλλων T-κυτταρικών ομάδων και να αποτρέψουν έτσι έναν υπέρμετρο πολλαπλασιασμό τους ή αυτοανοσία, συνεισφέροντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη διατήρηση της αυτό-ανοχής. Τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να έχουν ένα ρόλο στην επιλογή των Tregs<sup>142</sup>. Επίσης και εξωθυμικά αντιγονικά ερεθίσματα μπορούν να προκαλέσουν την *de novo* δημιουργία Tregs από naïve CD4+ T-κύτταρα<sup>143</sup>, που ποιοτικά δε διαφέρουν από τα παραγόμενα εντός του θύμου.

Στο θύμο στην περιοχή του φλοιού και του μυελού, το επιθηλιακό περιβάλλον είναι αυτό που βοηθά την ωρίμανση των θυμοκυττάρων. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι εκείνα που εκκρίνουν ορμόνες ή παρουσιάζουν ένα ειδικό πεπτιδικό “ρεπερτόριο”, συνεισφέροντας στη διαδικασία παραγωγής ανοσοϊκανών λεμφοκυττάρων. Όμως, εκτός από την αλληλεπίδραση μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και θυμοκυττάρων, ουσιαστικό ρόλο ασκούν και μεσολαβητές μη θυμικής προέλευσης όπως οι ιντερλευκίνες<sup>144</sup>. Συνεπώς οι ενδοκυττάρειες γονιδιακές αναδιοργανώσεις (rearrangements) και οι διακυττάρειες αλληλεπιδράσεις κατά τη διάρκεια της επιλογής, που συνοδεύονται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική επιβίωση και θάνατο και οδηγούν στην παραγωγή ώριμων T-κυττάρων<sup>145</sup>, ρυθμίζονται τόσο από ορμόνες που εκκρίνονται από τον ίδιο το θύμο όσο και από κυτταροκίνες<sup>146,147</sup>. Είναι εμφανές λοιπόν, πως τα θυμοκύτταρα και το θυμικό στρώμα βρίσκονται σε μια αμφίδρομη συμβιωτική σχέση.

## ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ GRAVIS

Η συσχέτιση μεταξύ ανωμαλίας στο θύμο αδένου και μυασθένειας Gravis έχει αναγνωριστεί εδώ και έναν περίπου αιώνα<sup>148</sup>. Η επίκτητη μορφή της νόσου οφείλεται σε αυτοαντισώματα είτε κατά του ίδιου του ακετυλοχολινικού μετασυναπτικού υποδοχέα (στις νευρομυϊκές συνάψεις), είτε κατά των γειτονικών ειδικών μυϊκών κινασών.

Έντονα βλαστικά κέντρα, στα πλαίσια λεμφοειδούς υπερπλασίας, υπάρχουν σε μικροσκοπικό επίπεδο, ένα γνωστό ιστολογικό χαρακτηριστικό που σχετίζεται με

---

<sup>h</sup> T S L P



την ασθένεια. Μεμονωμένα Β-λεμφοκύτταρα μπορούν να βρεθούν επίσης σε αυξημένο αριθμό στη νόσο, ένα στοιχείο που μερικοί ερευνητές θεωρούν πως είναι πιο ειδικό για τη συγκεκριμένη νόσο από ότι η παρουσία βλαστικών κέντρων. Επιπλέον, τα κύτταρα Langerhans καθώς και τα δακτυλιοειδώς αναστομούμενα κύτταρα αναγνωρίζονται σε αυξημένο αριθμό στη μυασθένεια Gravis, ενώ παρατηρούνται και αρκετά πλασματοκύτταρα και μυοειδή κύτταρα.

### 3) ΑΠΟΠΤΩΣΗ και ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

#### 3Α) ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί έχουν ενδογενείς μηχανισμούς για εκλεκτικό θάνατο ιδίων κυττάρων. Ο φυσιολογικός αυτός κυτταρικός θάνατος ονομάζεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Η απόπτωση αναγνωρίστηκε αρχικά το 1972<sup>149</sup> και πήρε το όνομά της από την ελληνική λέξη “πίπτω”. Διαφέρει από τη νέκρωση, αν και μερικές φορές μπορεί να συνυπάρχουν.

Η απόπτωση, είναι μια εξελικτικά διατηρημένη διαδικασία που παρατηρείται από τα νηματόδια ως τα θηλαστικά και οδηγεί στην ελάττωση μη αναγκαίων, διαταραγμένων, ηλικιωμένων και τοποθετημένων σε λάθος θέση κυττάρων, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της ιστικής ομοιόστασης<sup>150-152</sup>. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι το τελικό σημείο ενός ενεργειακά εξαρτώμενου καταρράκτη γεγονότων, που ξεκινούν από σήματα κυτταρικού θανάτου. Γενικά, τα γεγονότα αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις φάσεις, με αλληλοεπικάλυψη των συστατικών στοιχείων της κάθε φάσης<sup>153</sup>. Αρχικά, υπάρχει η πρόιμη ή εναρκτήρια φάση, όπου σήματα ενεργοποιούν την αποπτωτική αντίδραση. Αυτά τα προ-αποπτωτικά σήματα μπορεί να προέρχονται από το εξωτερικό κυτταρικό περιβάλλον και να παραλαμβάνονται από το κύτταρο μέσω ειδικών υποδοχέων ή μπορεί να προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου εξαιτίας της δράσης κάποιου φαρμάκου, τοξίνης ή ακτινοβολίας. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει τη μετάδοση του σήματος. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω ειδικών συνδετών (ligands) και επιφανειακών υποδοχέων (εξωγενές μονοπάτι ρύθμισης της απόπτωσης), οι οποίοι είναι ικανοί να παραλάβουν το σήμα κυτταρικού θανάτου από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον<sup>154</sup>. Η διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί επίσης από το εσωτερικό του κύτταρου μέσω ειδικών κυτταρικών υποδοχέων/αισθητήρων που εδράζουν στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (εσωτερικό μονοπάτι ρύθμισης της απόπτωσης). Ακολουθεί η εκτελεστική φάση, όπου ενεργοποιείται η απόπτωση στο κυτταρόπλασμα και τα κυτταρικά οργανίδια. Έτσι, αμφοτέρως οι ανωτέρω αποπτωτικές οδοί (εξωγενής και ενδογενής) ενώνονται σε ένα κοινό τελικό μονοπάτι που προκαλεί ενεργοποίηση, αφενός εκτελεστικών ενζύμων/πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες (caspases) και αφετέρου των ρυθμιστών θετικής και αρνητικής ανατροφοδότησης της διαδικασίας. Τελευταία, είναι η μετά τον κυτταρικό θάνατο φάση, όπου η κυτταρική χρωματίνη και το DNA αποδομούνται/διασπώνται. In vivo (αλλά όχι απαραίτητα και in vitro) τα νεκρά κύτταρα αναγνωρίζονται και φαγοκυτταρώνονται από άλλα κύτταρα. Η

αλληλουχία των μορφολογικών αλλαγών στα αποπτωτικά κύτταρα, μπορεί να παρατηρηθεί στο ηλεκτρονικό και οπτικό μικροσκόπιο.

Σε κυτταρικές καλλιέργειες τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης περιλαμβάνουν την κυτταρική συρρίκνωση, τη σπειροειδή διαμόρφωση της επιφάνειας, τη δημιουργία προσεκβολών και το σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων. Στην αιματοξυλίνη&ηωσίνη, το αποπτωτικό κύτταρο εμφανίζεται σαν μια στρογγυλή ή οβάλ μάζα με έντονα ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα με φυσαλιδώδη πυρήνα και συμπυκνωμένα τμήματα πυρηνικής χρωματίνης. Μη φυσιολογική ανοχή στην απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές όπως η αυτοανοσία ή ο καρκίνος. Αντίθετα, η αυξημένη απόπτωση επάγει οξείες νόσους όπως λοιμώξεις, ισχαιμία, θρομβώσεις καθώς και χρόνιες παθολογίες, όπως νευροεκφυλιστικές και νευρομυϊκές ασθένειες καθώς και το AIDS.

Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι από τους κεντρικούς ρυθμιστές της απόπτωσης, καθώς ενοποιούν διάφορα σήματα επιβίωσης και θανάτου, τα οποία δημιουργούνται εντός και εκτός του κυττάρου. Η οικογένεια αυτή, χωρίζεται σε δύο υπο-οικογένειες, Η πρώτη αποτελείται από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση) και η δεύτερη από τις προ-αποπτωτικές (πρωτεΐνες που προάγουν την απόπτωση). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών των δύο ομάδων, θέτουν το κριτικό όριο που καθορίζει αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο ή όχι.

#### • ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Η ενεργοποίηση του εν λόγω μονοπατιού της απόπτωσης, γίνεται μέσω της σύνδεσης ενός ειδικού πρωτεϊνικού συνδέτη (ligand) με ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας. Πιο συγκεκριμένα τα αποπτωτικά “σήματα” μεταφέρονται στο κύτταρο στόχος μέσω των μελών της υπεροικογένειας του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF<sup>i</sup>). Τα μέλη αυτά έρχονται σε επαφή με τους υποδοχείς θανάτου (death receptors, DRs) που βρίσκονται πάνω στην κυτταρική επιφάνεια και χαρακτηρίζονται από την παρουσία εξωκυττάριας κυστεϊνικής αλληλουχίας για την ένωση με το συνδέτη. Οι υποδοχείς αυτοί, ονομάζονται υποδοχείς της υπερ-οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF-R<sup>j</sup>). Τα μέλη της υπερ-οικογένειας αυτής αποτελούν έξι διαφορετικοί DRs. Έχουν

<sup>i</sup> Tumor Necrosis Factor

<sup>j</sup> Tumor Necrosis Factor - Receptor

αναγνωριστεί μέχρι σήμερα οι Fas, TNFR1, DR3, DR4 ή TRAIL<sup>k</sup>-R1, DR5 ή TRAIL-R2 και DR6. Γενικώς, όλοι οι υποδοχείς αποτελούνται από 3 ίδιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, και έχουν χαρακτηριστικά σύνδεσης και σηματοδότησης (signaling), τόσο κοινά μεταξύ τους, όσο και μοναδικά ο καθένας. Χαρακτηρίζονται από ένα ενδοκυττάριο τμήμα, που ονομάζεται τομέας θανάτου (death domain, DD) και απαιτείται για τη μετάδοση του αποπτωτικού σήματος<sup>155,156</sup>. Ο DD λειτουργεί μέσω συνδέσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, μετά από τη συσσώρευση διάφορων κυτταροπλασματικών μορίων που συγκροτούν το συγκεκριμένο αποπτωτικό μονοπάτι. Ο TRAIL, μέλος της υπεροικογένειας του παράγοντα νέκρωσης του όγκου/νευρικού αυξητικού παράγοντα (TNF/nerve growth factor), μπορεί να συνδεθεί με 5 διαφορετικούς υποδοχείς, όμως μόνο οι DR4 και DR5 είναι ικανοί να μεταβιβάσουν σήμα για κυτταρικό θάνατο<sup>157</sup>. Τόσο ο TRAIL, όσο και οι DR4 και DR5 είναι ευρέως εκφραζόμενοι στους ανθρώπινους ιστούς.

Οι συνδέτες των υποδοχέων της TNFR υπεριοικογένειας περιλαμβάνουν τις κυτταροκίνες TNFα, λεμφοτοξίνη-άλφα (LTα), Fas-συνδέτη (Fas-L), Apo3-συνδέτη (Apo3-L) και TRAIL. Οι συνδέτες αυτοί λειτουργούν με αυτοκρινικό ή παρακρινικό τρόπο και μέσω της σύνδεσης προκαλούν τριμερισμό του αντίστοιχου μεμβρανικού υποδοχέα, κάτι το οποίο είναι θεμελιώδες για την προαγωγή της αποπτωτικής σηματοδότησης<sup>158</sup>.

Όταν ενεργοποιηθούν, οι υποδοχείς θανάτου, συσσωρεύουν γύρω τους πρωτεΐνες προσαρμογείς (adaptor proteins), μέσω ομοφιλικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δικών τους DD και των DD από τις πρωτεΐνες προσαρμογείς. Ταυτόχρονα με την αλληλουχία DD, οι πρωτεΐνες προσαρμογείς έχουν επίσης μια αλληλουχία που ονομάζεται δραστικός τομέας θανάτου (DED<sup>l</sup>), ο οποίος εμπλέκεται στο επόμενο βήμα της αποπτωτικής σηματοδότησης του συγκεκριμένου μονοπατιού.

Έτσι, ο DED της πρωτεΐνης προσαρμογέα, αλληλεπιδρά με ομοφιλικό τρόπο με τον DED που υπάρχει στο ένζυμο που προάγει την απόπτωση, την προ-κασπάση-8 ή 10. Οι τελευταίες συσσωρεύονται/αθροίζονται στο σύμπλεγμα που μεταδίδει/προάγει το σήμα θανάτου (DISC<sup>m</sup>), το οποίο αποτελείται από τα εξής συστατικά στοιχεία: το DD του υποδοχέα, το DD ενός μορίου προσαρμογέα (π.χ. FADD) και από το πρόδρομο ανενεργό μόριο της κασπάσης-8. Στη συνέχεια οι προ-

<sup>k</sup> TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

<sup>l</sup> Death Effector Domain

<sup>m</sup> Death Inducing Signaling Complex

κασπάσες-8 και 10, ενεργοποιούνται, μετά από πρωτεόλυση, στις κασπάσες-8 και 10 και ενεργοποιούν τις εκτελεστικές κασπάσες στο κοινό κομμάτι της απόπτωσης (το τμήμα στο οποίο συγκλίνουν τα δύο μεγάλα αποπτωτικά μονοπάτια – εξωγενές και ενδογενές)<sup>108,156</sup>.

Από τους καλύτερα χαρακτηριζόμενους υποδοχείς επιφανείας είναι ο Fas, μια τύπου-1 διαμεμβρανική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 319 αμινοξέα, με ευρεία διασπορά τόσο σε κύτταρα του λεμφικού (π.χ. ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα), όσο και μη λεμφικού ιστού. Υπάρχουν 3 εξωκυττάρια περιοχές με κυστεϊνικές επαναλήψεις καθώς και μια περιοχή 80 αμινοξέων στο ενδοκυττάριο τμήμα, που ονομάζεται DD, εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο και είναι μια δομή λειτουργικά διατηρημένη σε όλους τους προαναφερόμενους υποδοχείς θανάτου της υπερ-οικογένειας TNF-R.

Στο ειδικό παράδειγμα του εξωγενούς μονοπατιού μέσω FasL-Fas οδού, το αποπτωτικό σήμα μεταφέρεται στα κύτταρα στόχος, όταν ο υποδοχέας Fas συνδεθεί με το φυσικό του συνδέτη, το FasL, ή από αγωνιστικά (ομοειδή) αντισώματα. Ο συνδέτης FasL είναι μια τύπου-2, ομοτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία πρωταρχικά εκφράζεται από ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα, καθώς και κύτταρα φυσικούς φονείς (NK<sup>n</sup>). Απελευθερώνεται σε διαλυτή μορφή μετά από αποχωρισμό της από τη μεμβρανική επιφάνεια με τη βοήθεια μεταλλοπρωτεϊνών, πριν φυσικά συνδεθεί με τον υποδοχέα Fas. Η Fas-FasL αλληλεπίδραση προκαλεί ολιγομερισμό (τριμερισμό) του υποδοχέα. Στη συνέχεια, ο DD του υποδοχέα συσσωρεύει τις πρωτεΐνες προσαρμογείς (adaptor), οι οποίες επίσης έχουν DDs. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η Fas συσχετιζόμενη με τον τομέα θανάτου (FADD)<sup>o</sup>, που έχει ένα DD στο C-τελικό της άκρο και ένα δεύτερο τομέα πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης που ονομάζεται DED στο N-τελικό άκρο. Ο DED της πρωτεΐνης προσαρμογέα συνδέεται μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων με το DED της προ-κασπάσης-8. Έτσι, το σύμπλεγμα που προάγει το σήμα θανάτου (DISC), σχηματίζεται, και η ενεργοποιημένη κασπάση-8 (και κασπάση-10 στους ανθρώπους)<sup>159</sup> ενεργοποιεί μια αλληλουχία κασπασών (εκτελεστικές κασπάσες) που συναντώνται στα επόμενα βήματα του σηματοδοτικού μονοπατιού, που έχει ως αποτέλεσμα την ενδονουκλεοτιδική κατάτμηση και την κατάτμηση δομικών και ρυθμιστικών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση. Το σύμπλεγμα της

<sup>n</sup> Natural Killers

<sup>o</sup> Fas Associated Death Domain

Fas-σηματοδότησης (Fas-signaling) προκαλεί αυτές τις αλλαγές τόσο σε B όσο και T λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και σε μη λεμφοειδείς πληθυσμούς.

Μία από τις κασπάσες που ενεργοποιούνται από την κασπάση-8 είναι η προ-κασπάση-3. Η ενεργοποιημένη της μορφή, κασπάση-3, στοχεύει τον αναστολέα της δεοξυριβονουκλεάσης της ενεργοποιημένης κασπάσης (I-CAD<sup>P</sup>), η οποία είναι μια ενδογενής ενδονουκλεάση. Ο I-CAD και η CAD συνυπάρχουν σαν ένα ανενεργό σύμπλεγμα. Ο αναστολέας του συμπλέγματος όμως κατατέμεται από την ενεργοποιημένη κασπάση και απελευθερώνει την CAD. Η τελευταία εισέρχεται στον πυρήνα και διασπά το χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου, οδηγώντας σε κατακερματισμό του DNA και κυτταρικό θάνατο.

Ένας αναστολέας του συγκεκριμένου μονοπατιού, μοριακού βάρους 55-Kd, πρωτεϊνικής σύστασης, ονομάζεται c-FLIP<sup>q</sup>. Αυτή η πρωτεΐνη είναι ένα ανενεργές ενζυμικό ανάλογο της κασπάσης-8, που περιέχει δύο DEDs και συνδέεται με το DED του FADD και της κασπάσης-8, μπλοκάροντας έτσι τη μεταβίβαση του Fas-επαγόμενου σήματος κυτταρικού θανάτου και επιμηκώνοντας με αυτό τον τρόπο την επιβίωση του κυττάρου<sup>160</sup>.

#### • ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ (αποπτωτικό μονοπάτι εξαρτώμενο από μιτοχόνδρια ή Bcl-2 ρυθμιζόμενο μονοπάτι)

Τα μιτοχόνδρια είναι η δομική μονάδα του κυττάρου, όπου γίνεται ο ευκαρυωτικός οξειδωτικός μεταβολισμός και η προμήθεια του κυττάρου με τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) μέσω του βιοχημικού μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και του κυτοχρώματος c. Τα κυτταροπλασματικά αυτά οργανίδια συμμετέχουν και η λειτουργία τους φαίνεται να είναι κριτική ή τουλάχιστον πολύ σημαντική, στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, καθώς έχουν κεντρικό ρόλο σε κάποια από τα αποπτωτικά μονοπάτια. Επιπλέον, η ενεργοποίηση αυτών των οργανιδίων είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για το συντονισμό και την ολοκλήρωση διαφόρων αποπτωτικών διαδικασιών που δρουν ανοδικά και καθοδικά.

Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται από διάφορες ενδοκυττάρειες και εξωκυττάρειες καταστάσεις stress, όπως βλάβη του DNA που προκαλείται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή ακτινοβολία, έλλειψη αυξητικών παραγόντων ή σημάτων κυτταρικής επιβίωσης<sup>161</sup>, ιογενή λοίμωξη, υποξία και επαγωγή

<sup>P</sup> Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease

<sup>q</sup> c-FLICE Inhibitory Protein

ογκογονιδίων. Τα σήματα που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα των καταστάσεων αυτών συγκλίνουν κυρίως στα μιτοχόνδρια. Μια σειρά βιοχημικών γεγονότων επάγονται, όπως η αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και η κυτταροπλασματική οξειδωση<sup>162</sup> των μιτοχονδρίων και οδηγούν στη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης<sup>163</sup>, μέσα από το άνοιγμα του συμπλέγματος πόρου διαπερατής μεταφοράς (permeability transition pore complex), με αποτέλεσμα διόγκωση του οργανιδίου και ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c και άλλων αποπτωτικών μορίων στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

Φυσιολογικά, το κυτόχρωμα c εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό διάστημα των δύο μεμβρανών που περιβάλλουν το μιτοχόνδριο. Έχει τη μορφή μιας σφαιρικής πρωτεΐνης<sup>164</sup> και είναι χαλαρά προσκολλημένο στην έξω επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c, προκαλεί συσσώρευση της πρωτεΐνης προσαρμογέα Araf-1<sup>†</sup>. Το τελευταίο μόριο έχει έναν τομέα συσσώρευσης κασπασών (CARD<sup>s</sup>) και οδηγεί στη συσσώρευση και ένωση με το ένζυμο που προκαλεί έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας, την προ-κασπάση-9. Μαζί, το κυτόχρωμα c, ο Araf-1, η dATP και η προ-κασπάση-9, δημιουργούν ένα ολοενζυμικό σύμπλεγμα που ονομάζεται αποπτώσωμα. Το τελευταίο έχει μια επταμερική δομή σε σχήμα τροχού<sup>165</sup> και λειτουργεί ως η μοριακή πλατφόρμα πάνω στην οποία ενεργοποιείται η κασπάση-9<sup>166-168</sup>. Μέσω της ενζυμικής δραστηριότητας της κασπάσης-9, ενεργοποιούνται οι εκτελεστικές κασπάσες<sup>169</sup>, όπως είναι η 3 και η 7, οδηγώντας στην κατάτμηση του DNA σε ενδονουκλεοτιδικά τμήματα. Επιπρόσθετα, έπειτα από την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, αλλά και της 8, μπορεί να συμβεί κατάτμηση και ενεργοποίηση επιπλέον κασπασών που βρίσκονται σε πιο πρώιμο χρονικά σημείο του αποπτωτικού μονοπατιού (κασπάσες 2,6,8,10)<sup>170</sup> στα πλαίσια αγκυλών ενίσχυσης του αρχικού σήματος. Έχει δε, τεθεί το ερώτημα, για το μέγεθος της μιτοχονδριακής βλάβης που απαιτείται προκειμένου να θανατωθεί το κύτταρο, καθώς κυτταρική επιβίωση μπορεί να επιτευχθεί με απομάκρυνση των διαταραγμένων οργανιδίων, χωρίς ωστόσο προς το παρόν να υπάρχει σαφής προσδιορισμός κάποιου ορίου<sup>171</sup>.

Μελέτες δε αναφέρουν<sup>172,173</sup>, πως εάν υπάρξει διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί, ο καταρράκτης

<sup>†</sup> Apop<sup>t</sup>otic protease activating factor-1

<sup>s</sup> CAspase Recruitment Domain

ενεργοποίησης κασπασών είναι μη αναστρέψιμος, έχει περιγραφεί και ως σημείο μη επιστροφής<sup>174</sup>, αν και συγκεκριμένοι κυτταρικοί τύποι (μερικοί νευρωνικοί πληθυσμοί και καρδιομυοκύτταρα) μπορούν να επιβιώσουν τουλάχιστον για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα, παρόλη την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c<sup>175,176</sup>. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν δείξει πως αν και αυτό το μονοπάτι οδηγεί κυρίως στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9<sup>177</sup>, τουλάχιστον σε κάποιους κυτταρικούς τύπους, η ενδογενής οδός μπορεί να προχωρήσει ακόμη και στην απουσία της κασπάσης-9 ή του ενεργοποιητή της Araf-1<sup>178</sup>.

Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όταν γίνεται διαπερατή για τις διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο διαμεμβρανικό τμήμα του οργανιδίου, συντελεί στην απελευθέρωση εκτός του κυτοχρώματος c και μιας πληθώρας άλλων παραγόντων προς το κυτταρόπλασμα του κυττάρου που θα προκαλέσουν απόπτωση<sup>179-181</sup>. Αυτοί είναι η Smac/DIABLO<sup>t</sup> πρωτεΐνη, η αδενυλική κινάση, η σερινική πρωτεάση OMI, ο παράγοντας που προάγει την απόπτωση (AIF<sup>u</sup>), η DDP<sup>v</sup>, η ενδονουκλεάση G και η κατατμημένη (cleaved) μορφή της OPA1. Μαζί με το κυτόχρωμα c, η Smac/DIABLO και ο AIF έχειδειχθεί πως είναι σημαντικοί για την ενεργοποίηση κασπασών. Η Smac/DIABLO είναι μια πρωτεΐνη που περιορίζει την ανασταλτική δράση των αναστολέων της απόπτωσης (IAPs<sup>w</sup>)<sup>182,183</sup>, οι οποίοι δρουν με απευθείας επαφή και αναστολή της δράσης των κασπασών 3, 7 και 9<sup>184,185</sup>. Η Smac/DIABLO ωστόσο, δε φαίνεται να προάγει την απόπτωση σε υγιή κύτταρα. Όσον αφορά τον AIF, είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που εκτός από την επίδραση στις κασπάσες, επιδρά απευθείας και στον πυρήνα και προκαλεί κατακερματισμό (fragmentation) του DNA<sup>186,187</sup>.

Η Bcl-2 οικογένεια πρωτεϊνών, είναι τοποθετημένη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, είναι πολύ σημαντική στην αποτροπή ή προαγωγή της απόπτωσης και καθοριστική στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Στην πραγματικότητα, όλες οι μιτοχονδριακές δραστηριότητες στην απόπτωση μπορούν να σταματήσουν με την υπερέκφραση της Bcl-2 ή της Bcl-xL πρωτεΐνης, καθώς αναστέλλουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και ενδοκυττάριας οξειδωσης και έτσι σταθεροποιούν το μεμβρανικό μιτοχονδριακό δυναμικό<sup>188-190</sup>. Όμως η υπερέκφραση είναι ένα πειραματικό δεδομένο, το οποίο μπορεί να μην ισχύει κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Αντίθετα η προσθήκη της Bax πρωτεΐνης σε μεμονωμένα

<sup>t</sup> Direct IAP Binding protein with LQw pl

<sup>u</sup> Apoptosis Inducing Factor

<sup>v</sup> Deafness Dystonia Polypepti

<sup>w</sup> Inhibitors of Apoptosis



μιτοχόνδρια, προκαλούσε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c<sup>191</sup>. Όσον αφορά τις BH3-only πρωτεΐνες στο μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι, δύο μοντέλα έχουν υιοθετηθεί<sup>192-194</sup> σχετικά με τη δράση τους. Έτσι, είτε δρούν μέσω άμεσης ένωσης και ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών Bax/Bak, είτε μέσω εξουδετέρωσης των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών και απελευθέρωση των Bax/Bak που προάγουν την απόπτωση<sup>195</sup>.

Οι δύο μεγάλες αποπτωτικές οδοί (εξωγενής και ενδογενής) επικοινωνούν μεταξύ τους. Σε μερικά κύτταρα, γνωστά ως τύπου-I κύτταρα η ποσότητα της ενεργοποιημένης κασπάσης-8 που παράγεται από το DISC, είναι ικανή να εκκινήσει την απόπτωση απευθείας, αλλά στα τύπου-II κύτταρα, η ποσότητα είναι αρκετά μικρή και τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται ως “ενισχυτές” του αποπτωτικού σήματος<sup>160,196</sup>. Η κασπάση-8, τεμαχίζει (cleaves) και ενεργοποιεί (μέσω πρωτεόλυσης) έναν προωθητή (promoter) της απόπτωσης, μέλος της Bcl-2 οικογένειας των πρωτεϊνών, που ονομάζεται Bid. Το τελευταίο στην ενεργοποιημένη του μορφή (tBid<sup>x</sup>), θεωρείται πως είναι ένας από τους υπεύθυνους παράγοντες για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, στα οποία μεταφέρεται όταν ενεργοποιηθεί και συμβάλλει έτσι στη δημιουργία του αποπτωσώματος<sup>197</sup>. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Bid μπορεί να προκαλέσει σε ελεύθερα κυτταρικά διαλύματα απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, είτε ενεργοποιώντας το Bax, είτε αναστέλλοντας τα αντι-αποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας από τη δράση επί των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak

Η εκτελεστική φάση, είναι η τελική φάση της απόπτωσης και αφορά σε ένα πρωτεολυτικό καταρράκτη, κατά τη διάρκεια του οποίου διάφοροι αρχικοί μηχανισμοί ή βιοχημικά μονοπάτια συγκλίνουν. Οι πρωτεάσες που μεσολαβούν στην εκτελεστική φάση της απόπτωσης παρουσιάζουν αυξημένη εξελικτική διατήρηση στα διάφορα είδη οργανισμών και ανήκουν στην οικογένεια των κασπασών.

---

<sup>x</sup> truncated Bid

## ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΗ ΦΑΣΗ και ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Οι αποπτωτικοί μηχανισμοί ελέγχονται στενά σε διάφορα επίπεδα και βήματα της διαδικασίας από μια ποικιλία πρωτεϊνών.

### • ΚΑΣΠΑΣΕΣ – CASPASES (Cysteine-dependent aspartate-specific acid proteases ή Cysteilyl Aspartate-Specific Proteases)

Οι κασπάσες είναι θεμελιώδους σημασίας μόρια για τη ρύθμιση και εκτέλεση της απόπτωσης<sup>198,199</sup>. Η κριτική εμπλοκή των κασπασών στην απόπτωση αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1993<sup>200,201</sup>. Αποτελούν μια οικογένεια ενδοκυττάρων κυστεϊνικών πρωτεασών που παράγονται ως ανενεργή ζυμογόνα, τα οποία στην ενεργή τους μορφή σχάζουν τα υποστρώματά τους σε σημεία πεπτιδικών δεσμών στο καρβόξυ-τελικό άκρο όξινων ασπαρτικών αλληλουχιών<sup>202,203</sup>. Ιεραρχικά οι κασπάσες διαστρωματώνονται σε ανάρρους εναρκτήριες και κατάρρους τελεστές.

Οι κασπάσες συντίθενται ως μονές πολυπεπτιδικές αλυσίδες με τρεις κοινούς τομείς/υπομονάδες: i) μία κεντρική μεγάλη (20-kDa) υπομονάδα στη μεσότητα της αλυσίδας (εσωτερικός τομέας, p20) που περιλαμβάνει ένα ενεργό σημείο που ονομάζεται DED, ii) μία μικρή (10-kDa) υπομονάδα στο c-τελικό άκρο (p10) που ονομάζεται τομέας συσσώρευσης κασπασών (CARD) και iii) μία NH<sub>2</sub>-τελική αλληλουχία (προ-τομέας) που περιλαμβάνει DD και εμπλέκεται σε γεγονότα πρώιμης σηματοδότησης. Ο DED και ο CARD είναι σημαντικοί για τα τελικά βήματα της αποπτωτικής διαδικασίας, καθώς συσσωρεύουν κασπάσες στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες πριν την ενεργοποίησή τους.

Στις κασπάσες κατά την ενεργοποίησή τους, η μεγάλη (p20) και η μικρή (p10) υπομονάδα απελευθερώνονται από το προ-ένζυμο. Αυτό γίνεται μετά από κατάτμηση σε Asp-X δεσμούς, ανάμεσα στον προ-τομέα και τη μεγάλη υπομονάδα. Ομοίως, η μεγάλη και η μικρή υπομονάδα χωρίζονται μεταξύ τους μέσω μιας δεύτερης κατάτμησης σε Asp-X δεσμούς που βρίσκονται ανάμεσά τους. Η παρουσία Asp αλληλουχιών σε εσωτερικά σημεία κατάτμησης επιτρέπει σε συγκεκριμένες κασπάσες την αυτό-ενεργοποίηση ή να ενεργοποιούνται από άλλες κασπάσες στα πλαίσια θετικής ενίσχυσης/θετικής ανατροφοδότησης του βιοχημικού καταρράκτη. Μετά από την εκτελεστική πρωτεολυτική διαδικασία οι κασπάσες παίρνουν τη μορφή ενεργών ετεροτετραμερών πρωτεασών<sup>204</sup>, οι οποίες αποτελούνται από δύο μεγάλες και δύο μικρές υπομονάδες και συνεπώς έχουν δύο ενεργείς περιοχές. Στα θηλαστικά η ενεργοποίησή τους γίνεται με τρεις ανεξάρτητους μηχανισμούς: α) κατάτμηση από

ενεργοποιημένες κασπάσες σε προηγούμενα σημεία της διαδικασίας, β) κατάτμηση από το μόριο granzyme-B και γ) αυτοκατάλυση, την οποία συνεπικουρούν άλλες πρωτεΐνες<sup>205</sup>.

Ανάλογα με τη δομή του προ-τομέα και τη λειτουργία τους, χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες: 1) κατηγορία-I ή φλεγμονώδεις κασπάσες: έχουν μεγάλες/ευρείες προ-περιοχές και συμμετέχουν στην ωρίμανση κυτταροκινών, όπως είναι οι ιντερλευκίνες 1β και 18, και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (κασπάσες-1, 4, 5 και 11)<sup>110</sup>, 2) κατηγορία-II ή εναρκτήριες κασπάσες: έχουν μεγάλου μήκους προ-τομείς (>90 αμινοξέα) και περιλαμβάνουν είτε DEDs (κασπάσες-8 και 10), είτε CARD (κασπάσες-2 και 9) και ενεργοποιούνται μέσω της σύνδεσής τους σε ειδικές μοριακές πλατφόρμες (DDs, DEDs, CARDS)<sup>206</sup> που προκύπτουν από πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και 3) κατηγορία-III ή εκτελεστικές κασπάσες: έχουν μικρού μήκους προ-τομείς (κασπάσες-3, 6 και 7)<sup>207-209</sup>.

Οι εναρκτήριες κασπάσες, ήτοι οι 8, 9 και 10, έχουν δύο κύριες λειτουργίες. Η πρώτη είναι μέσω του DED ή του CARD που διαθέτουν στη μοριακή τους δομή. Μέσω του DED συνδέονται με πρωτεΐνες προσαρμογείς από το DISC, ενώ μέσω του CARD συνδέονται με τον Araf-1 και σχηματίζουν το αποπτώσωμα. Η δεύτερη λειτουργία είναι μέσω του ενζυμικού τομέα που διαθέτουν, ο οποίος οδηγεί στην ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών, με μια αντίδραση καταρράκτη<sup>202</sup>. Αντίθετα, οι εκτελεστικές κασπάσες, ήτοι 3, 6 και 7, στερούνται DED και έτσι εξαρτώνται από τις εναρκτήριες κασπάσες για την ενεργοποίησή τους.

Η ενεργοποίηση των κασπασών ξεκινά από το αποπτωτικό σήμα που μεταφέρεται μέσω των υποδοχέων θανάτου και οδηγεί στην ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών-8 ή 10, ενώ μέσω του εσωτερικού/μιτοχονδριακού μονοπατιού αρχικά ενεργοποιείται η κασπάση-9. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται οι εκτελεστικές κασπάσες στα πλαίσια μιας διαδικασίας ενεργοποίησης τύπου καταρράκτη. Επιπλέον, οι εκτελεστικές κασπάσες μπορούν να προκαλέσουν κατάτμηση η μία της άλλης και έτσι να οδηγήσουν σε επιπλέον ενίσχυση του πρωτεολυτικού καταρράκτη. Οι εκτελεστικές κασπάσες είναι υπεύθυνες για τον κυτταρικό θάνατο δια της πρωτεόλυσης κυτταρικών υποστρωμάτων ή υποστρωμάτων θανάτου, όπως αναστολέων των νουκλεασών, του κυτταροσκελετού και σημαντικών κυτταρικών πρωτεϊνών<sup>210,211</sup>. Η πρωτεόλυση όλων αυτών των μορίων οδηγεί σε ενδονουκλεοσωμική DNA αποδόμηση και συνακόλουθα στις τυπικές μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στα κύτταρα που υφίστανται απόπτωση. Οι κασπάσες-

12, 13 και 14 δεν έχουν ακόμη κατηγοριοποιηθεί εξαιτίας της έλλειψης επαρκών δεδομένων. Ωστόσο, θεωρείται πως εμπλέκονται σε διαδικασίες που σχετίζονται με τις κυτταροκίνες. Αυτές οι κασπάσες έχουν μια αμινοξική αλληλουχία πλησιέστερη προς την κασπάση-1 απ' ό,τι με τις κασπάσες που εμπλέκονται στην απόπτωση.

Σχετικά με την ενεργοποίηση από το μόριο granzyme-B, αυτό είναι μια serine-πρωτεάση που βρίσκεται μέσα σε κυτταροπλασματικά κοκκία στα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς<sup>212</sup>. Προκαλεί κατάτμηση μορίων που έχουν ασπαρτικές αλληλουχίες και έτσι οι κασπάσες είναι στόχος για το granzyme-B. Έχει δειχθεί πως κύρια μοριακά υποστρώματα για το granzyme-B είναι οι κασπάσες 3 και 8<sup>213,214</sup>. Ωστόσο, το granzyme-B, μπορεί να επιδράσει άμεσα και στο μόριο Bid και να οδηγήσει σε ενεργοποίησή του (tBid) και μετέπειτα απελευθέρωση του κυττοχρώματος c<sup>215,216</sup>.

#### • ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΣΠΑΣΩΝ (Caspase inhibitors)

Η πρωτεόλυση είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία και οι κασπάσες έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν τη δυναμική των πρωτεολυτικών καταρρακτών. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η ενεργοποίηση και η δραστηριότητα των κασπασών είναι λειτουργίες προσεκτικά ρυθμιζόμενες σε διάφορα επίπεδα. Το ρόλο αυτό έχει αναλάβει μια οικογένεια κυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση (IAPs)<sup>217</sup>. Η οικογένεια περιλαμβάνει στα θηλαστικά εννιά μέλη, τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε διάφορους ιστούς. Χαρακτηρίζονται από μια αλληλουχία 70-80 αμινοξέων που ονομάζεται BIR<sup>y157</sup>. Στον άνθρωπο έχουν ανακαλυφθεί εννιά IAPs (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP, ILP2, KIAP, apollon και survivin), όμως δεν έχει φανεί να αναστέλλουν όλες οι πρωτεΐνες την απόπτωση, καθώς μερικές από αυτές πιθανώς να έχουν δράση άλλη από την αναστολή των κασπασών.

Οι IAPs δεν ενώνονται και δεν αναστέλλουν την κασπάση-8, αλλά το υπόστρωμα αυτής, την κασπάση-3. Έτσι, διακόπτουν τον πρωτεολυτικό καταρράκτη και παρέχουν προστασία από το μοριακό μονοπάτι της Fas/κασπάση-8 επαγομένης απόπτωσης<sup>184</sup>. Στο μιτοχονδριακό μονοπάτι, μέλη της IAP οικογένειας ενώνονται απευθείας με τη βασική κασπάση (προ-κασπάση-9). Με αυτό τον τρόπο αποτρέπουν την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-9<sup>218</sup>. Υπερέκφραση πρωτεϊνών της IAP

<sup>y</sup> Baculoviral IAP Repeat

οικογένειας αναστέλλει την επαγόμενη από το Bax και από άλλα προ-αποπτωτικά μόρια της Bcl-2 οικογένειας αποπτωτική διαδικασία<sup>219</sup>.

Ειδικά για τη survivin, η έκφρασή της έχει βρεθεί να είναι υψηλή στους περισσότερους ανθρώπινους όγκους, αλλά όχι στους φυσιολογικούς ιστούς ενηλίκων ανθρώπων<sup>220</sup>. Έλλειψη της survivin επάγει τον κυτταρικό θάνατο, ενώ η υπερέκφρασή της παρέχει αντίσταση σε αυτόν. Παρόλο που διαθέτει BIR αλληλουχία, ο ρόλος της στη ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας παραμένει αμφιλεγόμενος, καθώς δεν είναι σαφές αν δρα άμεσα ως αναστολέας της απόπτωσης ή αν έχει ένα ρόλο στην ολοκλήρωση της διαδικασίας του κυτταρικού κύκλου<sup>221,222</sup>.

Σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την πρωτεΐνη στα κύτταρα του δέρματος, η αντι-αποπτωτική της δραστηριότητα ήταν πιο έντονη από ότι ο ρόλος της στον κυτταρικό κύκλο. Σε *in vitro* μελέτες, η survivin ενώνεται με κασπάσες και αναστέλλει τη δραστηριότητά τους, όπως κάνουν και άλλα μέλη της IAP οικογένειας. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να ρυθμίζει την τοποθέτηση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 κατά την απόπτωση<sup>223</sup>. Ακόμη, έχει προταθεί ότι μια ποικιλία καταταμημένης survivin μπορεί να είναι τοποθετημένη στα μιτοχόνδρια και να ρυθμίζει έτσι το ενδογενές μονοπάτι<sup>224</sup>, αν και η υπόθεση αυτή στερείται άμεσης απόδειξης.

Ωστόσο, άλλες ενδείξεις αντικρούουν το ρόλο της survivin στη ρύθμιση της απόπτωσης. Δομικές αναλύσεις του μορίου καταδεικνύουν πως οποιαδήποτε επίδραση θα μπορούσε να έχει στις κασπάσες, αυτή θα ήταν έμμεση, αφού στερείται την αμινοξική αλληλουχία που είναι απαραίτητη στις άλλες IAPs για την ένωση με τις κασπάσες. Επιπλέον, ένας συμπαραγόμενος απαιτείται για την αναστολή της δραστηριότητας των κασπασών από τη survivin, κάτι που δεν απαιτείται από τις άλλες IAPs<sup>225</sup>. T-κύτταρα με έλλειψη της πρωτεΐνης παρουσιάζουν φυσιολογική ευαισθησία σε εξωτερικά αποπτωτικά ερεθίσματα και δε δείχνουν ελλείψεις στην αυθόρμητη επαγωγή της απόπτωσης *in vitro*<sup>113,226</sup>.

Έτσι λοιπόν, φαίνεται πως πρωτίστως η survivin δραστηριοποιείται στη ρύθμιση της μιτωτικής λειτουργίας, παρά στην απόπτωση. Το γονίδιο για τη survivin είναι διατηρημένο σε μια πληθώρα οργανισμών και εμπλέκεται στη μιτωτική ρύθμιση<sup>227,228</sup>. Επιπρόσθετα, η παραγωγή της πρωτεΐνης γενικά ρυθμίζεται με έναν τρόπο που είναι εξαρτώμενος από τον κυτταρικό κύκλο<sup>229,230</sup>. Στα κύτταρα των θηλαστικών η survivin είναι απαραίτητο συστατικό στοιχείο της ελεγκτικής διαδικασίας στο στάδιο δημιουργίας της μιτωτικής ατράκτου<sup>231,232</sup>.

**• Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ BCL-2<sup>z</sup>: ΠΡΟ- και ANTI- ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας, τα οποία ρυθμίζουν την αποπτωτική διαδικασία σε μιτοχονδριακό επίπεδο, είναι μια σημαντική κατηγορία των ρυθμιστών της απόπτωσης<sup>233,234</sup>.

Το ανθρώπινο bcl-2 είναι το πρώτο ογκογονίδιο που ανακαλύφθηκε να λειτουργεί προστατεύοντας τα κύτταρα από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Έγινε γνωστό νωρίς πως το Bcl-2 μόριο που συναντάται στα θηλαστικά, είναι το ομόλογο του ced-9, που είχε ήδη ανακαλυφθεί στο νηματόδιο *c. elegans*. Εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, καθώς επίσης και στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και του εξωτερικού πυρηνικού “φακέλου”. Υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στα B-κύτταρα, προκύπτει από χρωμοσωμική διαμετάθεση t(14:18) και οδηγεί σε λέμφωμα από B-κύτταρα<sup>235</sup>, καθώς αυτά επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται για ασυνήθιστα μεγάλο χρονικό διάστημα εξαιτίας της αναστολής του κυτταρικού τους θανάτου.

Η αντι-αποπτωτική Bcl-2-συσχετιζόμενη πρωτεΐνη x (Bax<sup>aa</sup>) είναι η πρώτη πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε να προάγει τον κυτταρικό θάνατο και να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Bcl-2. Αργότερα, βρέθηκε πως τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο, σχηματίζοντας ετεροδιμερή και κατά περιπτώσεις ομοδιμερή. Με την πάροδο του χρόνου, επιπλέον μόρια ανακαλύφθηκαν, τα οποία ανήκουν στην ίδια οικογένεια και η έκφρασή τους σε επίπεδο γονιδίου ή/και πρωτεΐνης έχει αποδειχθεί σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Στα θηλαστικά υπάρχουν τουλάχιστον δώδεκα κεντρικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, συμπεριλαμβανομένης της ίδιας της Bcl-2 και πρωτεϊνών που έχουν, είτε παρόμοια μεταξύ τους τρισδιάστατη δομή, είτε μια προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή παρόμοια με αυτή της Bcl-2 πρωτεΐνης. Αυτά οδήγησαν στην ταξινόμηση<sup>110</sup> των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

---

<sup>z</sup> B-Cell/Lymphoma-2 family

<sup>aa</sup> Bcl-2-associated X protein

| <b>Η Bcl-2 οικογένεια με τα μόρια που προάγουν και αναστέλλουν την απόπτωση<br/>(στα θηλαστικά)</b> |                                |   |  |
|---|--------------------------------|---|--|
| <b>Πρωτεΐνη</b>   | <b>Δράση στην<br/>Απόπτωση</b> | <b>Bcl-2 ομολογιακές<br/>αλληλουχίες (BH<sup>bb</sup> domains)</b>                    | <b>Διαμεμβρανική<br/>προσκόλληση<br/>(anchor)</b>          |
| Bcl-2<br>Bcl-xL<br>Mcl-1  | Αναστολή                       | BH1, BH2, BH3, BH4  | (+)  |
| A1<br>Bcl-w<br>Bcl-B  | Αναστολή                       | BH1, BH2, BH3, BH4<br>Ασθενής ομολογία σε σχέση<br>με το Bcl-2 στην αλληλουχία<br>BH4 | (+)  |
| Bax<br>Bak<br>Bok   | Προαγωγή                       | BH1, BH2, BH3, BH4 (?)  | (+)  |
| Bcl-XS  | Προαγωγή                       | BH3, BH4  | (+)  |
| Bik<br>Hrk<br>Bim<br>Blk<br>Puma<br>Noxa<br>Bmf   | Προαγωγή                       | BH3 αλληλουχία μόνο   | (+)  |
| Bad<br>Bid  | Προαγωγή                       | BH3 αλληλουχία μόνο   | (-)<br>Εμφανίζουν διάχυτη<br>κυτταροπλασματική<br>κατανομή |

Τα μέλη της οικογένειας ρυθμίζονται από κυτταροκίνες και από άλλα σήματα επιβίωσης ή θανάτου που συναντώνται σε διάφορα επίπεδα του αποπτωτικού

<sup>bb</sup> Bcl-2 Homology

μονοπατιού. Τρία μέλη της οικογένειας βρέθηκαν στα μυελικά λευκοκύτταρα: A1 και Mcl-1 στα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα<sup>236-238</sup>, ενώ τα A1 και Bcl-XL μπορούν να αυξορρυθμιστούν στα μακροφάγα από προφλεγμονώδη ερεθίσματα *in vitro*<sup>239</sup>.

Οι Hockenberg και συν.<sup>240</sup> ανακάλυψαν πως η Bcl-2 πρωτεΐνη αναστέλλει μια σειρά κυτταρικών αλλαγών, όπως τη διόγκωση της κυτταρικής μεμβράνης, τη συρρίκνωση του όγκου του κυττάρου, την πυρηνική συμπίκνωση και την ενδονουκλεοτιδική διάσπαση του DNA. Το σύνολο αυτών των αλλαγών συνιστούν ένα φαινόμενο που πρωτο-ονομάστηκε απόπτωση το 1987 από τον Wyllie<sup>241</sup>. Μέλη αυτής της οικογένειας, είτε αναστέλλουν, είτε προάγουν τον κυτταρικό θάνατο, και μαζί με τα μιτοχόνδρια, το κυτόχρωμα c, τον AIF, την παρουσία ενδοκυττάριας ισορροπίας του dATP ή του ATP και τις κασπάσες, εμπλέκονται στην έναρξη και εκτέλεση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Είναι πλήρως αποδεκτό πως η Bcl-2 πρωτεΐνη ελέγχει τη μιτοχονδριακή διαπερατότητα και υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής ή συγγενών μελών της οικογένειας, μπλοκάρει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του AIF και έτσι η συγκεκριμένη δράση επαγωγικά αναστέλλει το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι. Η ισορροπία μεταξύ προ- και αντι- αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 που εκφράζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, πιθανώς καθορίζουν πότε θα ξεκινήσει η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου ή πότε το κύτταρο θα επιβιώσει. Επιπλέον, μόρια κατασταλτικά του κυτταρικού θανάτου, όπως το Bcl-2, μπορεί να έχουν διαφορετικές επιδράσεις όταν στοχεύουν σε διαφορετικές ενδοκυττάριας μεμβράνες<sup>242</sup>.

Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών εμφανίζει ομολογία κάποιων ειδικών περιοχών, που ονομάζονται Bcl-2 αλληλουχίες με κοινή ομολογία (BH). Ορίζονται ως BH1, BH2, BH3 και BH4 και αντιστοιχούν σε τμήματα α-έλικας που υπαγορεύουν τη δομή και τη λειτουργία των τομέων. Ωστόσο, η γενική ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία είναι χαμηλή ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας, τα οποία ταξινομούνται με βάση τη λειτουργία και την οργάνωση της BH αλληλουχίας. Οι πρωτεΐνες, μέσω της BH αλληλουχίας τους αλληλεπιδρούν, σχηματίζοντας ολιγομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, εκφράζοντας τελικά την προαποπτωτική ή αντιαποπτωτική δράση τους. Επιπλέον, μέσω των BH εκτελούν τις διάφορες μοριακές λειτουργίες τους. Ωστόσο, δεν αντιδρούν όλα τα αντι-αποπτωτικά μόρια με τα προ-αποπτωτικά, αλλά υπάρχει μια εκλεκτική προτίμηση ανάμεσα σε κάποια μέλη από τις δύο οικογένειες. Στα ετεροδιμερή που αποτελούνται από προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μόρια (π.χ. Bcl-2 vs Bax ή Bid)<sup>243</sup>, φαίνεται πως υπάρχει μια



τιτλοποίηση της λειτουργικής δραστηριότητας του ενός μορίου προς το άλλο, κάτι το οποίο καταδεικνύει ότι η σχετική συγκέντρωση των μορίων της οικογενείας λειτουργεί ως μέτρο για την εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου ή όχι.

Αλληλεπίδραση μπορεί να υπάρξει και μεταξύ δύο προ-αποπτωτικών μορίων, συνήθως ενός BH3-only και ενός πολυτομεακού μορίου (π.χ. Bid vs Bax ή Bak). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές καθώς ενεργοποιούνται πολυτομεακά εκτελεστικά μόρια (π.χ. Bax, Bak) από BH3-only αισθητήρια μόρια<sup>244</sup>. Τρίτος τρόπος αλληλεπίδρασης είναι μέσω πολυμερισμού του ίδιου μορίου. Έχει παρατηρηθεί τόσο σε αντι-αποπτωτικά (π.χ. Bcl-2, Bcl-XL)<sup>245</sup> όσο και προ-αποπτωτικά μόρια (π.χ. Bax, Bak)<sup>246</sup>. Η ικανότητα του Bax ή του Bak να ολιγομερίζονται θεωρείται σημαντική για την επίδραση στο μιτοχονδριακό κανάλι και την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c.

Έχει ήδη αναφερθεί πως οι BH αλληλουχίες είναι αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών. Οι BH1 και BH2 αλληλουχίες των αντι-αποπτωτικών μορίων φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την BH3 αλληλουχία των προ-αποπτωτικών μορίων<sup>247-249</sup>. Παρόμοια, οι αλληλουχίες που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι η BH3 αλληλουχία του BH3-only μορίου και η BH1 ή/και BH2 του πολυτομεακού μορίου. Όμως και περιοχές εκτός των BH αλληλουχιών μπορεί να απαιτηθούν για κάποιες αλληλεπιδράσεις (π.χ. BNIP και Bcl-XL). Φαίνεται πως συγκεκριμένα αμινοξέα χρησιμοποιούνται εκλεκτικά σε κάθε μόριο προκειμένου να αλληλεπιδράσει με κάποιο άλλο και αυτό σχετίζεται με τη λειτουργία του.

Η υπο-οικογένεια όμως που αποτελείται από μόρια που αναστέλλουν την απόπτωση, περιλαμβάνει το Bcl-2, το Bcl-xL<sup>cc</sup> (το κυρίαρχο προϊόν ματίσματος του Bcl-x γονιδίου στα θυμοκύτταρα) και το Mcl-1<sup>dd</sup>, τα οποία έχουν τέσσερις διατηρημένες αλληλουχίες και όλες μοιάζουν πολύ με το Bcl-2. Δύο επιπλέον ανασταλτικές πρωτεΐνες, η A1 και η Bcl-w, έχουν επίσης τέσσερις διατηρημένες αλληλουχίες, αλλά έχουν ασθενή ομολογία σε σχέση με το Bcl-2 στην αλληλουχία BH4. Η BH4 αλληλουχία συνδέεται και με διάφορες άλλες πρωτεΐνες εκτός από τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας, όπως η καλσινευρίνη, που είναι μία εξαρτώμενη από το ασβέστιο πρωτεϊνική φωσφατάση. Η καλσινευρίνη συναντάται στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι της T-κυτταρικής ενεργοποίησης. Αυξάνει την έκφραση

<sup>cc</sup> Bcl-extra Large

<sup>dd</sup> Myeloid cell leukemia-1

του συνδέτη FasL/CD40L στην επιφάνεια των Τ-κυττάρων, οδηγώντας στην αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τα Β-κύτταρα. Εκτός από τους εξωκυτταριούς τομείς (domains), τα μέλη της υπο-οικογένειας έχουν επίσης διαμεμβρανικούς τομείς που τοποθετούν τις πρωτεΐνες στις ενδοκυτταριες μεμβράνες.

Η υπο-ομάδα που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών ΒΗ αλληλουχιών (ΒΗ1, ΒΗ2 και ΒΗ3) περιλαμβάνει το Βax, το Βak<sup>ec</sup> και το Βok<sup>ff</sup>, έχουν αβέβαιη παρουσία της ΒΗ4 αλληλουχίας και προάγουν την απόπτωση. Όλα τα μέλη της οικογένειας Βcl-2 περιλαμβάνουν αλληλουχία ΒΗ3, αλλά φαίνεται πως είναι λειτουργικά σημαντική για τις πρωτεΐνες που προάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα, το Βax αντιτίθεται στη δράση του Βcl-2 και επιταχύνει τον κυτταρικό θάνατο όταν υπερεκφράζεται στα κύτταρα των θηλαστικών. Επιπλέον, η ενδοκυτταρία μετακίνηση της μονομερούς πρωτεΐνης Βax από το κυτταρόπλασμα<sup>250</sup> στα μιτοχόνδρια όπου και ολιγομερίζεται, είναι απαραίτητη για την προαγωγή του κυτταρικού θανάτου<sup>251,252</sup>. Η πρωτεΐνη Βok επίσης μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια<sup>253</sup> κατά την απόπτωση, ενώ η Βak είναι από την αρχή προσκολλημένη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στα φυσιολογικά κύτταρα, όπου όπως έχει αναφερθεί<sup>254,255</sup> μπορεί να συνδεθεί με το Μcl-1 και το Βcl-xL. Μία άλλη πρωτεΐνη που προάγει την απόπτωση, η Βcl-xS, περιλαμβάνει 2 αλληλουχίες, την ΒΗ3 και την ΒΗ4.

Η επόμενη υποομάδα μοιράζεται μόνο την αλληλουχία ΒΗ3 (ΒΗ-3 only) και το πρώτο μέλος ανακαλύφθηκε το 1995<sup>256</sup>. Προάγει επίσης την απόπτωση και περιλαμβάνει τα εξής μόρια: Βik<sup>gg</sup>, Ηrk, Βim/BOD<sup>hh</sup>, Βlk<sup>ii</sup>, Βad<sup>jj</sup> (Βcl-2 associated protein d) και Βid<sup>kk</sup>. Στα δύο τελευταία μόρια δεν έχει ανακαλυφθεί διαμεμβρανικό τμήμα. Επίσης, είσοδο σε αυτή την κατηγορία έχουν κερδίσει μόρια που προκύπτουν από συγκεκριμένες κατατμήσεις πολυτομεακών μελών της Βcl-2 οικογένειας (π.χ. Μcl-1S, Βcl-GS). Τα μόρια της ΒΗ3-only υποομάδας φαίνεται να λειτουργούν σαν προαγωγοί του κυτταρικού θανάτου, κυρίως επί τη βάση της δημιουργίας ετεροδιμερών με παράγοντες που ευοδώνουν την επιβίωση του κυττάρου και ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Για παράδειγμα το Βim έχει βρεθεί πως μπορεί να

<sup>ec</sup> Βcl-2 homologous antagonist/killer

<sup>ff</sup> Βcl-2-related ovarian killer

<sup>gg</sup> Βcl-2 interacting killer

<sup>hh</sup> Βcl-2-interacting mediator of cell death/Βcl-2-related Ovarian Death gene

<sup>ii</sup> Βik-like killer

<sup>jj</sup> Βcl-2 associated protein d

<sup>kk</sup> ΒΗ3 interacting domain death agonist

προάγει την απόπτωση, μέσω σύνδεσης με τα αντι-αποπτωτικά μόρια Bcl-2, Bcl-xL και Mcl-1<sup>255</sup>. Ταυτόχρονα, ένας περιορισμένος αριθμός των BH-3 only πρωτεϊνών παρουσιάζει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με πολυτομεακές (BH1-3) προαποπτωτικές πρωτεΐνες (π.χ. Bim vs Bax)<sup>249,257</sup>. Οι Gavathiotis και συν.<sup>258</sup> είναι οι πρώτοι που έδειξαν με άμεση δομική μελέτη τον τρόπο σύνδεσης των παραπάνω μορίων. Μία μελέτη από τους Ayllon και συν.<sup>259</sup> με το μόριο της BH3-only υποομάδας Bad, έδειξε πως η πρωτεΐνη συνδέεται με λιπιδιακές μικροπεριοχές σε IL-4 επαγόμενα κύτταρα και θυμοκύτταρα, αλλά σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια σε κύτταρα με έλλειψη IL-4. Διάσπαση των λιπιδιακών rafts μετά από θεραπεία με μέθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη προκαλεί αποχωρισμό του Bad από τα λιπιδιακά rafts, κάτι που σχετίζεται με κυτταρική απόπτωση και καταδεικνύει πως το Bad ήταν ενεργό στη ρύθμιση της απόπτωσης. Τα λιπιδιακά rafts διαφέρουν από τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες στο ότι περιέχουν χοληστερόλη και μικροαλληλουχίες σφιγγολιπιδίων, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με ένα αριθμό υποδοχέων και σηματοδοτικών μορίων<sup>260</sup>. Θεωρείται πως δρούν ως πλατφόρμες που οργανώνουν την προαγωγή διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών και τις διαδικασίες της πρωτεϊνικής κυκλοφορίας. Όσον αφορά το προαποπτωτικό μόριο Bad, προτάθηκε πως η κατάληψη των μικροπεριοχών προκάλεσε αποφυγή τόσο της συσχέτισης με μόρια της ομάδας (π.χ. Bcl-2) όσο και της ικανότητας να ασκήσουν ένα ρόλο που προάγει την απόπτωση. Ενδιαφέρον ακόμη, είναι αυτό που έδειξαν οι Cottin και συν.<sup>261</sup>, πως δηλαδή οι αμινοξικές ακολουθίες που βρίσκονται στα DD του TNFR1 προάγουν την κατάλληλη τοποθέτηση αυτού του υποδοχέα στα λιπιδιακά rafts, εκτός από το ρόλο που ούτως ή άλλως έχει ως υποδοχέας σηματοδότησης.

Μια ομάδα των BH-3 only μορίων που περιλαμβάνει τα Bad, Bid, Bim, NOXA και PUMA, θεωρούνται μόρια φρουροί, καθώς εκλεκτικά αντιδρούν σε εγγύς σήματα θανάτου και επιβίωσης και απαιτούν τα μόρια Bax και Bak για να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο<sup>262,263</sup>. Οι Letai και συν.<sup>264</sup> σε μια μελέτη τους απέδειξαν πως υπάρχουν δύο υποκατηγορίες των παραπάνω BH3 πεπτιδίων. Η μία που τα μέλη της ονομάζονται “ενεργοποιητές”, περιλαμβάνει την BH3 αλληλουχία των Bid, Bim και με βάση δύο μελέτες και το PUMA<sup>265,266</sup>, τα οποία μπορούν άμεσα να ενεργοποιήσουν τα Bak, Bax προς ολιγομερισμό και να προκαλέσουν διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση του κυττοχρώματος c. Στην άλλη υποκατηγορία τα μέλη ονομάζονται “αισθητήρες” και ανήκουν τα Bad, Bik και NOXA. Τα μέλη σε αυτή η υποκατηγορία δεν ενεργοποιούν

άμεσα τα Bak και Bax, ούτε προκαλούν απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, αλλά αντίθετα συνδέονται με τα αντι-αποπτωτικά μόρια Bcl-2, Bcl-xL και Mcl-1 και απελευθερώνουν τα Bid-like πεπτίδια. Μεταφορά ενός σήματος τόσο από αισθητήριο BH3-πεπτίδιο (Bad-BH3), όσο και από ενεργοποιητικό BH3-πεπτίδιο (Bid-BH3) είχε συνεργική δράση στη θανάτωση του κυττάρου.

Με βάση την ενεργοποίηση των Bak και Bax οι Willis και Adams<sup>267</sup> πρότειναν δύο ξεχωριστά μοντέλα. Το άμεσο, όπου οι “ενεργοποιητές” και “αισθητήρες” συμπεριφέρονται όπως περιγράφηκαν από τους Letai και συν. και το έμμεσο, όπου όλες οι προ-αποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες ενώνονται με τα αντι-αποπτωτικά μόρια και επιδρούν σε αυτά αναστέλλοντας τη σύνδεση τους με τα Bak και Bax. Με αυτό τον τρόπο επιτρέπουν την απρόσκοπτη δράση των τελευταίων. Σε μια νέα πρόσφατη μελέτη οι Willis και συν.<sup>268</sup> κατέληξαν πως το μοντέλο που κυριαρχεί είναι αυτό της έμμεσης ενεργοποίησης και όχι της άμεσης. Άλλες όμως μελέτες<sup>269,270</sup>, πρότειναν ένα τρίτο μοντέλο ενεργοποίησης, το οποίο περιλαμβάνει στοιχεία και από τα δύο αρχικά μοντέλα και ονομάζεται μοντέλο σύνθεσης. Πρόσφατα δε, οι Giam και συν.<sup>146</sup> σε μία ανασκόπηση της συζήτησης πάνω στο θέμα των δύο μοντέλων, καταλήγουν πως οι διαφορές που υπάρχουν στα δύο μοντέλα, τελικά ίσως δεν είναι και τόσο σημαντικές, αφού αμφότερες αποτελούν ερμηνείες και εκτιμήσεις ίδιων δεδομένων. Απλά απαιτούνται πιο “φυσιολογικά” πειραματικά μοντέλα.

Γίνεται φανερό πως, ο μεγάλος αριθμός BH3-only μορίων, είναι ενδεικτικός εξειδίκευσης. Η μοναδικότητα της θέσης του καθενός μορίου μέσα στο κυτταρικό περιβάλλον, οι πρωτεϊνικές συνδέσεις-συσχετίσεις και οι μηχανισμοί ενεργοποίησής τους, καταδεικνύουν μια εξειδίκευση σχετικά με την αναγνώριση και προώθηση σημάτων θανάτου, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο μια διευρυμένη ικανότητα από πλευράς κυττάρου να αντιλαμβάνεται ετερόκλητα σήματα stress<sup>271</sup>.

Όταν υπάρχει απουσία σήματος θανάτου, οι Bcl-2 πρωτεΐνες είναι τοποθετημένες σε διάφορα ενδοκυττάρια τμήματα. Μετά την έλευση σήματος θανάτου, τα προ-αποπτωτικά μόρια μπορεί να αλλάξουν τη θέση τους μέσα στο κύτταρο και να υποστούν διάφορες προ- και μετά- μεταφραστικές τροποποιήσεις<sup>272</sup>. Έτσι, οι κυτταροπλασματικές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες αλλάζουν διάρθρωση, ενσωματώνονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και τα αντι-αποπτωτικά μόρια εξουδετερώνονται<sup>273</sup>. Τα τελευταία, είναι πρωτεΐνες ενσωματωμένες στη

μιτοχονδριακή μεμβράνη, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην πυρηνική μεμβράνη<sup>274,275</sup>.

Γενικά, τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 που σχετίζονται με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη δεν έχουν μόνο δραστηριότητα υποδοχέα-συνδέτη μέσω των BH αλληλουχιών, αλλά επίσης μπορούν να συνεισφέρουν στη μιτοχονδριακή ακεραιότητα επηρεάζοντας την κυκλοφορία των ATP ή dATP, το δυναμικό της μεμβράνης και το κανάλι ή πόρο μέσω του οποίου το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα<sup>276</sup>. Μεταλλάξεις οι οποίες αλλάζουν ή διασπών τις BH αλληλουχίες, καταστρέφουν την ικανότητα τόσο του ετεροδιμερισμού όσο και της προαγωγής του κυτταρικού θανάτου. Οι BH3 αλληλουχίες μόνες τους στα μόρια της Bcl-2 οικογένειας, είναι ικανές να ρυθμίσουν την ενεργοποίηση των κασπασών και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c.

Αρκετές μελέτες<sup>277,278</sup> υποστηρίζουν πως κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες παρόλο που στερούνται της BH3-αλληλουχίας, είναι ικανές να συνδεθούν με αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και να προκαλέσουν απόπτωση. Πρόσφατα δε<sup>279</sup>, προτάθηκε πως το p53 που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, λειτουργικά ομοιάζει σαν μία “super” BH3-only πρωτεΐνη, επειδή λειτουργεί τόσο σαν “αισθητήρας” όσο και σαν “ενεργοποιητής”.

#### ♦ Ρύθμιση πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας

Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι δράσεις των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ ζωής και θανάτου, τα κύτταρα διαθέτουν κανόνες ρύθμισης της έκφρασης και της δραστηριότητας αυτών των μορίων. Προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες εκφράζονται ακολουθώντας την επίδραση σημάτων θανάτου, ενώ αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες εκφράζονται μετά από σήματα επιβίωσης ή φλεγμονής.

Ένας τρόπος ρύθμισης των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας είναι μέσω ποικιλίας στην κατάτμηση. Ένας αριθμός πρωτεϊνών, τόσο προ-αποπτωτικών, όσο και αντι-αποπτωτικών, μπορεί να εκφραστεί με διάφορες ισομορφές. Για μερικές πρωτεΐνες οι ισομορφές αυτές έχουν αντίθετες λειτουργίες (π.χ. Bcl-xL vs Bcl-xS, Mcl-1S vs Mcl-1L)<sup>280,281</sup> ή μπορεί να μην αλλάξει η φύση της δράσης του προϊόντος, αλλά απλά η ισχύς της συγκεκριμένης δράσης (π.χ. Bim<sub>S</sub>, Bim<sub>L</sub>). Επακριβώς, τι προκαλεί τις εναλλακτικές κατατμήσεις δεν είναι γνωστό. Πιστεύεται όμως, πως εμπλέκονται μηχανισμοί που σχετίζονται με την ειδικότητα του ιστού ή με την ειδικότητα του σήματος.

Η μετά-μεταφραστική τροποποίηση είναι πολύ σημαντικός μηχανισμός που ρυθμίζει τις δραστηριότητες των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας. Μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση των μορίων με τροποποίηση στην τρισδιάστατη διάταξη του μορίου (π.χ. Bax)<sup>231</sup> με πρωτεολυτική κατάτμηση από μόρια κασπασών (π.χ. Bid)<sup>282</sup>, με βιοχημικές μεταβολές του μορίου λόγω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης (π.χ. Bad<sup>283</sup>, Bim<sup>284</sup>). Το κύριο αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η μετακίνηση των τροποποιημένων αγωνιστών θανάτου (π.χ. Bax, Bim, Bid και Bad) στα μιτοχόνδρια, η τροποποίηση της ευαισθησίας/σταθερότητας των πρωτεϊνών και του ορίου ενεργοποίησης από προ-αποπτωτικά ερεθίσματα (π.χ. Bim)<sup>285</sup>. Εκτός από την ενεργοποίηση τα μόρια της Bcl-2 οικογένειας μπορεί να υποστούν και απενεργοποίηση μέσω της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Αυτό μπορεί να συμβεί στα πλαίσια απάντησης σε ερεθίσματα θανάτου. Για παράδειγμα στα αντι-αποπτωτικά μόρια Bcl-2 και Bcl-xL, αυτό μπορεί να γίνει με φωσφορυλίωση που ελαττώνει την αντι-αποπτωτική τους ικανότητα<sup>286</sup>, καθώς και με πρωτεολυτική διάσπαση από μόρια κασπάσης. Σχετικά με το τελευταίο οι Hardwick και συν.<sup>287,288</sup> ανακάλυψαν πως η κασπάση-3 μπορεί να διασπάσει αυτά τα μόρια και εκτός από την απλή αντι-αποπτωτική απενεργοποίησή τους, να τους προσδώσει την ικανότητα να δράσουν προ-αποπτωτικά. Ακόμη, εκτός από τα αντι-αποπτωτικά μόρια, η φωσφορυλίωση μπορεί να επηρεάσει και τα προ-αποπτωτικά προκαλώντας και σε αυτά απενεργοποίηση της δραστηριότητάς τους (π.χ. Bid)<sup>289</sup>.

#### • FLIPs (FLICE<sup>II</sup>-inhibitory proteins)

Οι πρωτεΐνες αυτές παρεμβαίνουν στην έναρξη της απόπτωσης απευθείας στο επίπεδο των υποδοχέων θανάτου<sup>290</sup>. Δύο ποικιλίες κατάτμησης της πρωτεΐνης έχουν ανακαλυφθεί στα ανθρώπινα κύτταρα. Είναι η μεγάλη (FLIP<sub>L</sub>) και η μικρή (FLIP<sub>S</sub>) σε μήκος ισομορφή. Αμφότερες οι ποικιλίες μοιράζονται δομική ομολογία με την προ-κασπάση-8, στερούνται όμως την καταλυτική επιφάνεια που αυτή παρουσιάζει. Η δομή των FLIPs ωστόσο, τους επιτρέπει την ένωση με το σύμπλεγμα DISC, αναστέλλοντας έτσι την αποπτωτική διαδικασία και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8.

<sup>II</sup> FADD-Like Interleukin-1  $\beta$ -Converting Enzyme-like

Σε κυτταρικές σειρές από EBV+ λέμφωμα Burkitt, μια αυξημένη αναλογία FLIP σε σχέση με την κασπάση-8 (FLIP:κασπάση-8), συσχετίστηκε με αντοχή στη CD95 επαγόμενη αποπτωτική διαδικασία<sup>291</sup>.

### 3B) ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Η ικανότητα του κυττάρου για αναδιπλασιασμό συνίσταται από ένα πολύπλοκο μοριακό μηχανισμό ελέγχου, ο οποίος εμφανίζει σημαντικού βαθμού διατήρηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η διαταραχή στη ρύθμιση της κυτταρικής αναπαραγωγής οδηγεί σε κατάσταση γενετικής αστάθειας, η οποία με τη σειρά της προδιαθέτει σε νεοπλασματική εξαλλαγή.

Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται από πολλά ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα. Διάφορες μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες και πειραματόζωα, οδήγησαν στη διαπίστωση πως η ρύθμιση αυτή κυρίως επιτυγχάνεται μέσω μιας οικογένειας ολοενζυμικών συμπλεγμάτων κινασών σερίνης/θρεονίνης. Συγκεκριμένα τα συμπλέγματα αυτά αποτελούνται από μια ασταθή ρυθμιστική υπομονάδα, την κυκλίνη, η οποία ενώνεται και ενεργοποιεί τη δεύτερη, καταλυτική υπομονάδα, την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση (CDK<sup>mm</sup>)<sup>293,294</sup>. Τα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Έχουν απομονωθεί δεκατρείς διαφορετικές CDKs και τέσσερις ομάδες κυκλινών. Τα ενεργά συμπλέγματα κυκλίνης-CDK δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, κατά τη διάρκεια των οποίων φωσφορυλιώνουν κατάλληλα υποστρώματα.

Λειτουργικά οι κυκλίνες χωρίζονται σε δύο κύριες οικογένειες. Η G1/S οικογένεια που περιλαμβάνει τις κυκλίνες C, D1, D2, D3 και E, οι οποίες είναι σημαντικές για τη διόδο των κυττάρων από τη φάση G1 και την είσοδό τους στη φάση S. Η άλλη οικογένεια είναι η G2/M που περιλαμβάνει τις κυκλίνες A, B1 και B2. Η κυκλίνη A εμπλέκεται στη σύνθεση του DNA, στην ολοκλήρωση της φάσης S και στην προετοιμασία για μετάβαση στη μίτωση. Οι κυκλίνες B1 και B2 ρυθμίζουν τη μη αναστρέψιμη είσοδο του κυττάρου στη μίτωση, την αλληλουχία των γεγονότων κατά τη φάση αυτή και την ολοκλήρωσή της<sup>295-297</sup>.

Η έναρξη του κυτταρικού κύκλου του φυσιολογικού κυττάρου συνήθως πυροδοτείται από ένα εξωκυττάριο μιτογόνο ερέθισμα (π.χ. αυξητικό παράγοντα), το οποίο ενεργοποιεί μια σειρά από ενδοκυττάρια βιοχημικές μεταβολές, οι οποίες καλούνται “οδός μεταγωγής του σήματος”. Το κύτταρο δέχεται εξωκυττάρια μιτογόνα σήματα στην πρώιμη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Αποδέκτες αυτών των σημάτων είναι τα συμπλέγματα των κυκλινών D, με τις CDK4 ή CDK6. Τα

---

<sup>mm</sup> Cyclin Dependent Kinase



συμπλέγματα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της δραστηριότητας του περιοριστικού σημείου, το οποίο ρυθμίζει τη μετάβαση δια μέσου της προχωρημένης G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλεγμα κυκλίνης E/CDK2 δρα στο όριο των φάσεων G1 και S.

Το σύμπλεγμα κυκλίνης D1/CDK4, μέσω μερικής φωσφορυλίωσης της pRb, επιτρέπει στο μεταγραφικό παράγοντα E2F να επάγει κατά το τέλος της φάσης G1 την ενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης E και τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η σύνθεση του συμπλέγματος κυκλίνης E/CDK2 αρχίζει κατά το τέλος της φάσης G1 και συνεχίζεται σε μέγιστο βαθμό κατά τη μετάβαση G1-S. Το σύμπλεγμα αυτό είναι παράγοντας αναγκαίος και καθοριστικός για το ρυθμό που χαρακτηρίζει τη μετάβαση στη φάση S, καθώς οδηγεί σε περαιτέρω φωσφορυλίωση της pRb και συνεπώς απελευθέρωση του E2F. Έτσι, η συσσώρευση του συμπλέγματος κυκλίνης E/CDK2, εξαρτάται αφενός από τη δράση της E2F στο γονίδιο της κυκλίνης E και αφετέρου από την αποδόμηση της παραγόμενης πρωτεΐνης από την πρωτεολυτική οδό της ουμπικουϊτίνης (ubiquitin-dependent proteolysis). Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος pRb/E2F-DP, σηματοδοτεί το σημείο χωρίς επιστροφή προς τη φάση S του κυτταρικού κύκλου<sup>298,299</sup>. Όταν το κύτταρο εισέλθει στην φάση S, η κυκλίνη E αποδομείται και την ενεργοποίηση του CDK2 αναλαμβάνει η κυκλίνη A, με το σχηματισμό του συμπλόκου κυκλίνης A/CDK2. Η δημιουργία του τελευταίου είναι απαραίτητη για τη συνέχιση της φάσης S.

Η σύνθεση του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσιάζει πολλά διαφορετικά σημεία έναρξης της αντιγραφής του. Αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι αν υπήρχε ένα μόνο σημείο έναρξης της αντιγραφής, η διάρκεια της φάσης S θα ήταν υπερβολικά μεγάλη και οι πιθανότητες λάθους αυξημένες. Υπολογίζεται πως στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 106 ανεξάρτητα σημεία έναρξης της αντιγραφής. Στα σημεία αυτά σχηματίζεται προς το τέλος της φάσης G1, το προ-αντιγραφικό σύμπλεγμα (pre-RC<sup>nn</sup>), το οποίο είναι απαραίτητο για τη δράση των CDKs της φάσης S.

Το σύμπλοκο κυκλίνης A/CDK2 είναι σημαντικό τόσο για την έναρξη και διατήρηση της DNA σύνθεσης, όσο και για το ότι εμποδίζει τον εκ νέου σχηματισμό προ-αντιγραφικών συμπλεγμάτων. Κατά τη διάρκεια του τέλους της φάσης S, η

---

<sup>nn</sup> pre-Replication Complex

κυκλίνη A ενεργοποιεί τη CDK1, σηματοδοτώντας έτσι την ολοκλήρωση της φάσης S και την έναρξη της φάσης G2. Εφόσον ολοκληρωθεί η αντιγραφή, το κύτταρο αρχίζει να παράγει σταδιακά κατά τη διάρκεια της G2 φάσης κυκλίνη B, η οποία συνδέεται με τη CDK1. Η μετάβαση G2/M επάγεται από το σύμπλεγμα κυκλίνη B/CDK1. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελεί τον παράγοντα που προάγει τη μίτωση (MPF<sup>oo</sup>) και η δράση του θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη της μίτωσης. Η πλήρως ενεργοποιημένη CDK1 φωσφορυλιώνει μια σειρά από δομικές πρωτεΐνες (π.χ. ιστόνη H1, πυρηνικές λαμίνες, καλδεσμόνη), οι οποίες ασκούν σημαντικό ρόλο στη συσπείρωση μεταφασικών χρωμοσωμάτων, την αποδιάταξη των ενδιάμεσων ινιδίων, την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων και αποτελούν βιοχημικά γεγονότα απαραίτητα και καθοριστικά για τη μετάβαση στη φάση M. Επιπλέον, το σύμπλεγμα κυκλίνη B/CDK1 παρουσιάζει τη μέγιστη βιολογική του δραστηριότητα, μετά από τη μετακίνησή του προς τον πυρήνα, όπου και παραμένει μέχρι τη στιγμή της μετάβασης από τη μετάφαση στην ανάφαση κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

Η μίτωση αρχίζει με την πρόφαση και ακολουθείται από το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και του μεταφασικού δίσκου. Στο στάδιο αυτό οι μιτωτικές CDKs ενεργοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που προάγει την ανάφαση (APC<sup>pp</sup>), το οποίο καταλύει την πρωτεόλυση των αναστολέων της ανάφασης PDS1 και CUT2, μέσω της οδού της ουμπικουϊτίνης. Το σύμπλεγμα αυτό πρωτεολύει την κυκλίνη B, κάτι που είναι απαραίτητο για την έξοδο του κυττάρου από την τελόφαση<sup>300,301</sup>. Οι μηχανισμοί που έχουν αναφερθεί εξασφαλίζουν την αντιγραφή και την κατανομή του γενετικού υλικού, αλλά δε διασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής και της ισοκατανομής του γενετικού υλικού. Ακόμη, οι μηχανισμοί αυτοί ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό, αλλά δε δίνουν τη δυνατότητα μετά-μιτωτικής διαφοροποίησης στο κύτταρο. Έτσι, το κύτταρο ανέπτυξε αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, οι οποίοι του επιτρέπουν τόσο να μπορεί να διαφοροποιηθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες, όσο και να αμύνεται στο γενοτοξικό stress του περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να προκαλέσει είτε βλάβη του DNA, είτε διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Η δράση των κινασών στα συμπλέγματα κυκλινών και CDKs ρυθμίζεται αρνητικά από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKIs<sup>qq</sup>).

---

<sup>oo</sup> Mitosis-Promoting Factor

<sup>pp</sup> Anaphase Promoting Complex

<sup>qq</sup> Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors

Υπάρχουν δύο γνωστές οικογένειες CDKIs. Η μία είναι η INK4 οικογένεια, η οποία περιλαμβάνει τέσσερα γονίδια (p16/INK4A, p15/INK4B, p18/INK4C και p19 (p14/INK4D)). Οι πρωτεΐνες αυτές ενώνονται με τα CDK4 και CDK6 και αποτρέπουν την ένωση και ενεργοποίηση των D-τύπου κυκλινών, μέσω του μη σχηματισμού συμπλόκων. Η δεύτερη οικογένεια καλείται CIP/KIP και περιλαμβάνει τρία γονίδια (p21/CIP1, p27/KIP1 και p57/KIP2), τα οποία δρουν αναστέλλοντας κυρίως τις CDKs 2, 4 και 6.

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της προαγωγής του κυτταρικού κύκλου παίζουν τα ογκοκατασταλτικά μονοπάτια p53, Rb και p27<sup>302</sup>. Το p53 (p14-mdm2-p53-p21) μονοπάτι ρυθμίζει την παύση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2. Η p53-εξαρτώμενη G1/S παύση, συμβαίνει μέσω της p53-επαγωγής του p21, ενώ η p53-εξαρτώμενη G2/M παύση, συμβαίνει μέσω κατασταλτικής δράσης στα μόρια που προάγουν την κυκλίνη B1 και τη CDK1. Η δραστηριότητα και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 ρυθμίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες όπως η mdm2, η οποία δρα σαν λιγάση της ουβικιτίνης και επιτρέπει τη στόχευση της πρωτεΐνης p53 από το πρωτεολυτικό δίκτυο της ουμπικουΐτινης. Η ενζυματική δραστηριότητα της mdm2 ελέγχεται από το p14. Το σύμπλεγμα των mdm2/p14 πρωτεϊνών στερείται δραστηριότητας λιγάσης της ουβικιτίνης και συνεπώς σταθεροποιεί την πρωτεΐνη p53.

Κεντρικό σημείο του Rb (p16-κυκλίνη D-CDK4/6-Rb) μονοπατιού, αποτελεί η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της Rb πρωτεΐνης (pRb). Η pRb είναι μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των “rocket protein” που επιπλέον περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες p130/pRb2 και p107. Η υποφωσφορυλιωμένη pRb ενώνεται και απενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες, κυρίως τον E2F-DP, που είναι σημαντικός για τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S. Φωσφορυλίωση της pRb από τις CDK 4/6 κινάσες, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της E2F-DP και την επακόλουθη έναρξη της γονιδιακής μεταγραφής. Ένα από τα γονίδια που επάγονται από την E2F-DP είναι η κυκλίνη E, η οποία επίσης φωσφορυλιώνει την pRb. Αντίθετα η φωσφορυλίωση της pRb αναστέλλεται από τα μόρια p27 και p16, καθώς και από άλλους αναστολείς των CDKs. Κεντρικό ρόλο στο δίκτυο ρύθμισης της p27 (p27-κυκλίνη E-CDK2), έχει η CDKI p27, η οποία μπορεί να σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Η πρωτεΐνη p27 φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο κυκλίνη E-CDK2 και με αυτό τον τρόπο ενεργοποιείται η πρωτεοσωμική αποδόμησή της από την ουμπικουΐτινη.

**Κυτταρικός Κύκλος και απόπτωση<sup>303-305</sup>**

Η πρωτεΐνη p53 έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα και σε περίπτωση βλάβης του DNA αναστέλλει τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Το γονίδιο p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση ρυθμίζοντας την έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και bax και κατ' επέκταση την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Η αποπτωτική οδός μέσω της πρωτεΐνης p53 εμπλέκει και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες με σημαντικότερο τον E2F-1. Η έκφραση του E2F-1 επάγει την απόπτωση είτε μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου p53, είτε μέσω της καταστολής αντι-αποπτωτικών παραγόντων όπως ο NF-κB.

**NF-κB (Nuclear Factor κB)**

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB<sup>292</sup> παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Φυσιολογικά, ο NF-κB παραμένει συσσωρευμένος σε μια ανενεργή μορφή, λόγω της επίδρασης ενός κυτταροπλασματικού αναστολέα στις NF-κB πρωτεΐνες (IκB). Μια ποικιλία εξωτερικών ερεθισμάτων (κυτταροκίνες, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες κ. α. ) μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του NF-κB μετά από φωσφορυλίωση, ουβικιτιλίωση και επακόλουθη αποδόμηση του IκB. Οι υπομονάδες του NF-κB που συνδέονται με το DNA, “μεταναστεύουν” στον πυρήνα και ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων στόχων. Ανάλογα με τους χαρακτήρες του εναρκτήριου ερεθίσματος και του κυτταρικού περιβάλλοντος, ο NF-κB μπορεί να ενεργοποιήσει προ-αποπτωτικά γονίδια, όπως αυτά που κωδικοποιούν το CD95, τους CD95L και TRAIL υποδοχείς, και αντι-αποπτωτικά γονίδια, όπως αυτά που κωδικοποιούν τα IAPs και Bcl-xL.

## ΣΚΟΠΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΣΚΟΠΟ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες των επιπέδων έκφρασης και της ανοσοτοπογραφικής κατανομής πρωτεϊνών που εμπλέκονται στα δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και θανάτου, έχουν αποδειχθεί σημαντικές για την κατανόηση της ιστοφυσιολογίας των φυσιολογικών ιστών, αλλά και των μηχανισμών παθογένεσης διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (όπως νεοπλασία, φλεγμονή και αυτοανοσία). Ανάμεσα σε αυτές τις μελέτες εμπεριέχονται και αρκετές ανοσοϊστοχημικές μελέτες που έχουν διερευνήσει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στα βιοχημικά μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στο θύμο αδένα. Ο υπό μελέτη θυμικός ιστός προερχόταν από τον άνθρωπο ή από πειραματόζωα και βρισκόταν είτε στη φυσιολογική του μορφή, είτε παρουσίαζε παθολογικές αλλοιώσεις (νεοπλασία, αυτοανοσία).

Πιο συγκεκριμένα, οι Krajewski S. και συν.<sup>306</sup> σε νεκροτομικό υλικό από άνθρωπο ή υλικό που προερχόταν από ποντίκια (FVB και C57B16, ηλικίας 4-12 εβδομάδων), μελέτησαν σε τομές παραφίνης φυσιολογικού θύμου, την έκφραση των πρωτεϊνών bcl-X (bcl-xL και bcl-xS) με αντισώματα που παρασκεύασαν οι ίδιοι (polyclonal, anti-rabbit).

Οι Krajewski S. και συν.<sup>307</sup> επίσης σε φυσιολογικό θυμικό ιστό από ποντίκια (FVB και C57BI/6, ηλικίας 4-12 εβδομάδων), μελέτησαν σε τομές παραφίνης την έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 και bax. Τα αντισώματα που χρησιμοποίησαν στη μελέτη τους τα παρασκεύασαν οι ίδιοι (πολυκλωνικά anti-rabbit) και τα χρησιμοποίησαν με αραιώσεις 1:1000 έως 2000 για το bax και 1:800 έως 1500 για το bcl-2.

Οι Hockenbery D. και συν.<sup>308</sup> μελέτησαν την τοπογραφική έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 (monoclonal, 6C8 hamster) σε τομές κρυστάτη. Το υλικό είτε ήταν νεκροτομικό, είτε προερχόταν από χειρουργική εκτομή θύμου αδένα. Μετά από ιστολογική παρατήρηση επιλέχθηκαν τομές που ήταν ελεύθερες παθολογίας.

Οι Chen FF. και συν.<sup>309</sup> μελέτησαν την έκφραση των πρωτεϊνών mcl-1 και bcl-2 σε νεοπλασματικό θυμικό ιστό (θυμώματα και καρκινώματα του θύμου), φυσιολογικό θύμο (από έμβρυο, βρέφος και έφηβο) και θύμο με λεμφοζιδιακή υπερπλασία. Ο μη νεοπλασματικός θυμικός ιστός χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έγινε σε τομές παραφίνης, τα αντισώματα ήταν

πολυκλωνικά (anti-rabbit) και χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 1:500 το mcl-1 (S-19, Santa CruzBiotechnology) και 1:100 το bcl-2 (clone 124. 3, BioGenex).

Οι Spaulding B. και συν.<sup>310</sup> μελέτησαν ανοσοϊστοχημικά σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο, την έκφραση της survivin. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μονοκλωνικό (clone 12C, DakoCytochromation, M3624) σε συγκέντρωση 1,0 mg/ml.

Οι Resendes AR. και συν.<sup>311</sup> χρησιμοποίησαν ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης που ελήφθησαν μετά από ευθανασία σε υγιή πειραματόζωα (χοίρους) από διάφορες ηλικιακές ομάδες (6 ημέρες έως 5 μήνες). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 (cleaved caspase-3), πολυκλωνικό και σε αραιώση 1:25 έως 1:50 (anti-Asp175, Cell Signaling Inc. ).

Την ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 στο θύμο αδένα, μελέτησαν επίσης και οι Mikami O. και συν.<sup>312</sup>, σε τομές παραφίνης φυσιολογικού θύμου αδένα από πειραματόζωα (χοίρους). Το αντίσωμα (anti-cleaved caspase-3, Cell Signaling Technology) χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:100.

Οι Kobayashi Y. και συν.<sup>313</sup> μελέτησαν με ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο αδένα (ηλικίας 1 εβδομάδας έως 12 έτη) την έκφραση της πρωτεΐνης survivin (anti-goat, Santa Cruz).

Οι Zhou και συν.<sup>314</sup> μελέτησαν τομές παραφίνης από αρχαιακό νεκροτομικό υλικό (Primary Children's Medical Centre), το οποίο χωρίστηκε σε δύο ομάδες. Η μία είχε υποπλαστικό θύμο με σύνδρομο DiGeorge και η άλλη, που χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου, είχε φυσιολογικό θύμο αδένα. Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έγινε για τις πρωτεΐνες Fas/CD95 (Dako) και bcl-2 (Dako), σε αραιώσεις 1:10 και 1:20 αντίστοιχα.

Οι Strater J. και συν.<sup>315</sup> μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης FasL/CD95L (monoclonal G247-4, Pharmingen), σε αραιώση 1:50, σε τομές κρουστάτη και παραφίνης ανθρώπινου φυσιολογικού θύμου.

Οι Sentman C. και συν.<sup>316</sup> μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 σε πειραματόζωα (ποντίκια C3H/He Swiss και C57BL), τα οποία είτε είχαν υποστεί διαγονιδιακή τροποποίηση, είτε αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Το μονοκλωνικό αντίσωμα (6C8 hamster monoclonal) χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:40.

Οι Khoury T. και συν.<sup>317</sup> ερεύνησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών survivin (F1-124, Santa Cruz) και bcl-2 (clone 124, Dako) σε θυμικά νεοπλάσματα (θυμώματα και καρκινώματα). Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έγινε σε

TMA (Tissue MicroArrays) και οι αραιώσεις των αντισωμάτων ήταν 1:200 (survivin) και 1:100 (bcl-2).

Οι Rodriguez M. και συν.<sup>318</sup> διερεύνησαν την έκφραση των πρωτεϊνών κυκλίνη-D2 (M20, Santa Cruz Biotechnology) και κυκλίνη-D3 (C16, Santa Cruz Biotechnology), σε πειραματόζωα (διαγονιδιακά ποντίκια). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τομές παραφίνης και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυκλωνικά (mouse).

Οι Doglioni C. και συν.<sup>319</sup> μελέτησαν, μεταξύ των άλλων, και την έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη-D3 στο φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο αδένα. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης και το αντίσωμα ήταν μονοκλωνικό (DCS-22, Neomarkers) σε αραιώση 1:100.

Οι Kang MJ. και συν.<sup>320</sup> μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη-D3 (αραίωση 1:100) σε τομές παραφίνης φυσιολογικού θύμου από πειραματόζωα (κουνέλια).

Οι Roig MB και συν.<sup>321</sup> μελέτησαν μία νέα πρωτεΐνη που πρόσφατα ανακαλύφθηκε, την κυκλίνη-O (N1 και C2 αντισώματα). Η μελέτη έγινε με ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό θυμικό ιστό που ελήφθη από πειραματόζωα (ποντίκια).

Οι Park SH. και συν.<sup>322</sup> μελέτησαν την έκφραση των πρωτεϊνών Fas, FasL, και bcl-2, σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό ανθρώπινο θυμικό ιστό και θυμικά επιθηλιακά νεοπλάσματα. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων ήταν 1:100 για το Fas (polyclonal, Santa Cruz), 1:100 για το FasL (polyclonal, Santa Cruz) και 1:50 για το bcl-2 (monoclonal, Zymed).

Οι Στεφανάκη Κ. και συν.<sup>323</sup> μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τομές παραφίνης από ανθρώπινο θύμο αδένα, ο οποίος παρουσίαζε θυμικό επιθηλιακό νεόπλασμα (θύμωμα, καρκίνωμα), ενώ μη νεοπλασματικός θυμικός ιστός (ατροφικός ή υπερπλαστικός) χρησιμοποιήθηκε για την ομάδα ελέγχου. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν bcl-2 (Dako), p53 (Dako), p21 (Oncogene Sciences) και mdm2 (Oncogene Sciences), ήταν μονοκλωνικά και η αραιώση ήταν για όλα 1:100.

Οι Καναβάρος Π. και συν.<sup>324</sup> διερεύνησαν σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο αδένα και σε διάφορες ηλικιακές ομάδες, την ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση και τον

κυτταρικό κύκλο. Αυτές ήταν η p53 (Dako) σε αραιώση 1:50, η p21 (EA-10, Calbiochem) σε αραιώση 1:50, η Rb (Dako) σε αραιώση 1:20, η p16 (F-12, Santa Cruz) σε αραιώση 1:100, η cyclin D1 (DSC-6, Novocastra) σε αραιώση 1:20, η p27 (F-8, Santa Cruz) σε αραιώση 1:50, η cyclin A (6E6, Novocastra) σε αραιώση 1:10, η cyclin B1 (7A9, Novocastra) σε αραιώση 1:10, η bcl-2 (Dako 124) σε αραιώση 1:50, η bax (Dako, A3533) σε αραιώση 1:500 και η bak (Dako, A3538) σε αραιώση 1:250.

Οι Hiroshima K. και συν.<sup>325</sup> μελέτησαν με ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης θυμωμάτων την έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 (Dako), bax (Dako) και survivin (Alpha Diagnostic) σε αραιώσεις 1:800, 1:200 και 1:50 αντίστοιχα.

Οι Brocheriou I. και συν.<sup>326</sup> μελέτησαν ανθρώπινους θύμους αδένες που είχαν ιστολογική διάγνωση θυμώματος. Η μελέτη έγινε σε ιστολογικές τομές παραφίνης και η πρωτεΐνη που μελετήθηκε ήταν η bcl-2, με μονοκλωνικό αντίσωμα (Dako).

Οι Ramos P. και συν.<sup>327</sup> μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης CD95/Fas/Apo-1 receptor (polyclonal rabbit) σε ιστολογικό υλικό από πειραματόζωα (ποντίκια Balb/cJ και MRL/MpJ-lpr). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τομές κρυστάτη με φυσιολογικό θυμικό ιστό.

Οι Engel P. και συν.<sup>328</sup> μελέτησαν την ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 (clone124, Dako) σε υλικό που προερχόταν από φυσιολογικό εμβρυϊκό θύμο και από ανθρώπινο θύμο με νεόπλασμα (θύμωμα ή καρκίνωμα). Οι ιστολογικές τομές ήταν παραφίνης και η αραιώση του αντισώματος 1:10.

Οι Salakou S. και συν.<sup>329</sup> διερεύνησαν με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης, την έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 (Dako) και bax (SantaCruz) σε ανθρώπινο θύμο από ασθενείς με νόσο Gravis. Σαν ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός εμβρυϊκός θυμικός ιστός. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων bcl-2 και bax ήταν 1:40 και 1:1500 αντίστοιχα.

Οι Masunaga A. και συν.<sup>330</sup> μελέτησαν σε τομές κρυστάτη την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Fas (CH11 και UB2). Η αραιώση του αντισώματος ήταν 1:50 και ο ιστός προερχόταν από ανθρώπινους θύμους ατόμων με μυασθένεια Gravis. Φυσιολογικός θυμικός ιστός από νεογνά, χρησιμοποιήθηκε σαν ομάδα ελέγχου.

Οι Claudio Mineo T. και συν.<sup>331</sup> μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p27 (mouse sc-1641, Santa Cruz) και p21 (mouse sc-6246, Santa Cruz) σε ιστό θυμωμάτων. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μονοκλωνικά και η συγκέντρωση και για τα δύο 1:100.



Οι Robles A. και συν.<sup>332</sup> μελέτησαν σε τομές παραφίνης υπερπλαστικού θύμου από πειραματόζωα (διαγονιδιακά ποντίκια και φυσιολογικά ποντίκια ως ομάδα ελέγχου), την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης του κυτταρικού κύκλου, κυκλίνη-D1 (Upstate Biotechnology) με πολυκλωνικό αντίσωμα.

Οι Rich A. και συν.<sup>333</sup> μελέτησαν σε τομές παραφίνης από θυμώματα την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53.

Στη δική μας εργασία πραγματοποιήσαμε μια πολυπαραγοντική συνδυαστική μελέτη των επιπέδων έκφρασης και της ανοσοτοπογραφικής κατανομής πρωτεϊνών που παίζουν κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση. Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές δεν έχουν μέχρι στιγμής μελετηθεί, με βάση την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που πραγματοποιήσαμε, είτε στο υλικό που χρησιμοποιήσαμε, είτε με την τεχνική που πραγματοποιήσαμε την μελέτη. Αυτές είναι οι πρωτεΐνες bad, bim/BOD και FLIP<sub>SL</sub> που συναντώνται στα βιοχημικά μονοπάτια της απόπτωσης, καθώς και οι κύκλινες D2 και E που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Η μελέτη μας πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικό ανθρώπινο ιστό από θύμο αδένα, σε λεπτές τομές παραφίνης (4μm), οι οποίες εξασφαλίζουν αξιόπιστη ανοσομορφολογική ταυτοποίηση των διάφορων ομάδων του κυτταρικού πληθυσμού. Η ταυτόχρονη μελέτη επιπέδων έκφρασης και ανοσοτοπογραφικής κατανομής ενός πλήθους πρωτεϊνών (προ-αποπτωτικών, αντι-αποπτωτικών και κυτταρικού κύκλου) σε σχέση με τον κυτταρικό πληθυσμό που εκφράζεται η κάθε μία, δίνει τη δυνατότητα για μια συνδυαστική διερεύνηση του ανοσοτοπογραφικού προτύπου έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση στο θύμο. Η διερεύνηση αυτή επιτρέπει επίσης τη μελέτη της μεταβολής των ανοσοτοπογραφικών προτύπων πρωτεϊνικής έκφρασης σε σχέση με την ηλικία, καθώς οι υπό μελέτη θύμοι αδένες προέρχονται από διάφορες ηλικιακές ομάδες και επιπλέον η μελέτη αυτή επιτρέπει τη σύγκριση με περιπτώσεις θύμων που παρουσιάζουν λεμφοζιδιακή υπερπλασία.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συστηματική διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης και του ανοσοτοπογραφικού προτύπου έκφρασης πρωτεϊνών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου στο φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο σε σχέση με την ηλικία και σε θύμους με λεμφοζιδιακή υπερπλασία, καθώς και της παρουσίας αποπτωτικών κυττάρων. Η μελέτη των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης. Η μελέτη της απόπτωσης έγινε με

τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης και της *in situ* σήμανσης TUNEL. Επιπλέον, μελετήθηκαν θύμοι με ιστολογική εικόνα λεμφοζιδιακής υπερπλασίας. Στον άνθρωπο οι μέχρι τώρα μελέτες δεν είναι συστηματικές<sup>141,306,308-310,313,314,315,317,321-326,328-331,333,340,335</sup>, ενώ με την παρούσα εργασία επιχειρείται μια συνδυαστική πολυπαραγοντική ανοσομορφολογική ανάλυση σε σχέση με την ηλικία.

Συγκεκριμένα, σκοπός της μελέτης είναι η συστηματική διερεύνηση:

- 1) της ανοσοτοπογραφικής κατανομής και των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών bax, bak, bad, bim/BOD, bid, bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin, FLIP<sub>S/L</sub>, Fas, FasL, κασπάση-3, ενεργοποιημένη κασπάση-3, των κυκλινών A, B1, D2, D3 και E και των πρωτεϊνών p53, Rb1 και Hdm2.
- 2) των αποπτωτικών κυττάρων με τη μέθοδο της *in situ* σήμανσης TUNEL σε συνδυασμό με την κυτταρική μορφολογία και την έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3.

Στα πλαίσια της μελέτης θέσαμε τα ακόλουθα ερωτήματα:

- A) ποιοι κυτταρικοί πληθυσμοί και σε ποιο διαμέρισμα του θυμικού παρεγχύματος εκφράζουν τις ανωτέρω πρωτεΐνες και ποια είναι τα επίπεδα έκφρασης κάθε πρωτεΐνης σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς
- B) ποιες είναι οι μεταβολές έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και των θυμικών λεμφοκυττάρων
- Γ) ποιες είναι οι διαφορές έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών μεταξύ θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και θυμικών λεμφοκυττάρων.
- Δ) ποια είναι η εντόπιση των αποπτωτικών κυττάρων και
- E) ποιες είναι οι μεταβολές των επιπέδων έκφρασης και του ανοσοτοπογραφικού πρότυπου έκφρασης πρωτεϊνών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με την ηλικία

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΥΛΙΚΟ

32 θύμοι αδένες, μονιμοποιημένοι σε φορμόλη 10% και εγκλεισμένοι σε κύβους παραφίνης, από 15 ενήλικες, 3 εφήβους (12-18 ετών), 8 παιδιά και 6 νεογνά παραχωρήθηκαν από τα Αρχεία των Τμημάτων Παθολογικής Ανατομίας του Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών «Αγία Σοφία» και του Νοσοκομείου Αθηνών «Ευαγγελισμός». Σε 7 ενήλικες παρατηρήθηκε ιστολογική εικόνα υποστροφής θύμου και σε 1 έφηβο παρατηρήθηκε εικόνα αρχόμενης υποστροφής θύμου. Σε 9 περιπτώσεις (8 ενήλικες και 1 έφηβος) παρατηρήθηκε εικόνα λεμφοξιδιακής υπερπλασίας του θύμου.

Η επιλογή έγινε με βάση την ύπαρξη επαρκούς και κατάλληλου για ανοσοχρώσεις υλικού. Η αντιγονική καταλληλότητα των ιστών ελέγχθηκε με ανοσοχρώσεις παν-κερατίνης AE1-AE3 (DAKO) και βιμεντίνης (Novocastra).

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### Ανοσοϊστοχημεία

Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν κατά την ανοσοϊστοχημική ανάλυση, αφορούσαν τον κυτταρικό κύκλο (κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3 και κυκλίνη E), και την απόπτωση (προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες bax, bak, bad, bim/BOD, bid και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin και Flip<sub>S/L</sub>). Ακόμη, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες του υποδοχέα του κυτταρικού θανάτου Fas (CD95), μαζί με τον αντίστοιχο συνδέτη του (ligand) FasL που συμμετέχουν στο εξωγενές βιοχημικό μονοπάτι της απόπτωσης, καθώς και η εκτελεστική πρωτεΐνη κασπάση-3, στη μορφή της προκασπάσης (caspase-3) και στην ενεργοποιημένη της μορφή (cleaved caspase-3). Επίσης μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες p53, Rb-1 και Hdm2 που εμπλέκονται στους μηχανισμούς ρύθμισης κυτταρικού κύκλου και θανάτου. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη της έκφρασης των πρωτεϊνών ήταν αυτή της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (Labeled StreptAvidin Biotin, LSAB) υπεροξειδάσης.

Αναλυτικά τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Ιστικές τομές πάχους 4μm κόπηκαν σε ακολουθία από τους κύβους παραφίνης, τοποθετήθηκαν σε γυάλινα πλακίδια SuperFrost Plus ειδικά για

μικροσκοπηση (R. Langenbrick, Emmerdingen, Germany) και αφέθηκαν να στεγνώσουν ολονύχτια σε θερμοκρασία 37°C.

**Πίνακας 1.**

| Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης | Κλώνος                           | Συγκέντρωση   | Εταιρεία          |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------|-------------------|
| Bax (057)                     | A3533<br>(rabbit polyclonal)     | 1: 120        | DAKO              |
| Bak (00576)                   | RP078<br>(rabbit polyclonal)     | 1: 30 / 1: 40 | DBS <sup>††</sup> |
| Bad (c-7)                     | sc-8044<br>(mouse monoclonal)    | 1: 10 / 1: 15 | Santa Cruz        |
| Bim/BOD (Ab-1)                | RB-1612-P<br>(rabbit polyclonal) | 1: 150        | Neomarkers        |
| Bid (FL-195)                  | sc-11423<br>(rabbit polyclonal)  | 1: 2800       | Santa Cruz        |
| Bcl-2                         | c-124<br>(monoclonal mouse)      | 1: 20         | Dako              |
| Bcl-X <sub>L</sub>            | 2H12<br>(monoclonal mouse)       | 1: 70         | Zymed             |
| Mcl-1 (057)                   | A3534<br>(rabbit polyclonal)     | 1: 50         | Dako              |
| Survivin (Ab-6)               | RB1629-P<br>(rabbit polyclonal)  | 1: 1200       | Neomarkers        |
| FLIP <sub>S/L</sub> (H-202)   | sc-8347<br>(rabbit polyclonal)   | 1: 100        | Santa Cruz        |
| Fas/CD95 (Ab-5)               | RB-9012-P<br>(rabbit monoclonal) | 1: 300        | Neomarkers        |
| FasL                          | RB-9029-P<br>(rabbit)            | 1: 100        | Neomarkers        |
| Κασπάση-3 (E-8)               | sc-7272<br>(mouse monoclonal)    | 1: 50000      | Santa Cruz        |

<sup>††</sup> Diagnostic BioSystems

|                                      |                                |        |                   |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------|-------------------|
| Ενεργοποιημένη<br>κασπάση-3 (559565) | C92-605<br>(rabbit monoclonal) | 1: 100 | BD<br>Biosciences |
| (NCL-) Κυκλίνη-A                     | 6E6<br>(mouse monoclonal)      | 1: 10  | Novocastra        |
| (NCL-) Κυκλίνη-B1                    | 7A9<br>(mouse monoclonal)      | 1: 10  | Novocastra        |
| Κυκλίνη-D1                           | DCS-6<br>(mouse monoclonal)    | 1: 20  | Novocastra        |
| Κυκλίνη-D2 (c-17)                    | sc-181<br>(rabbit polyclonal)  | 1: 600 | Santa Cruz        |
| Κυκλίνη-D3 (M-7156)                  | DCS-22<br>(monoclonal mouse)   | 1: 50  | Dako              |
| Κυκλίνη-E (M-20)                     | sc-481<br>(rabbit polyclonal)  | 1: 200 | Santa Cruz        |
| p53                                  | DO-7<br>(mouse monoclonal)     | 1:50   | Dako              |
| Rb-1                                 | Rb-1<br>(mouse monoclonal)     | 1: 20  | Dako              |
| Hdm2                                 | IF2<br>(mouse monoclonal)      | 1: 20  | Oncogene          |

### Περιγραφή της μεθόδου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (LSAB) με τη χρήση αυτοποιημένου μηχανήματος

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος ανοσοϊστοχημείας (Ventana Benchmark, Strasbourg, France) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα και τις οδηγίες που το συνοδεύουν (Ventana Medical Systems, Inc. ).

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη χορήγηση και τοποθέτηση, με τη μορφή αυτοκόλλητης ταινίας, ενός γραμμοκώδικα (bar code), πάνω στο πλακίδιο που θα τοποθετηθεί στο μηχάνημα, προκειμένου αυτό να αναγνωρίζεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας που πρόκειται να ακολουθήσει και επιπλέον να μπορεί να ελέγχεται

κάθε χρονική στιγμή η πορεία της διαδικασίας σε αυτό. Στη συνέχεια ακολουθεί η πλήρως αυτοματοποιημένη, “κλειστή” λειτουργία του μηχανήματος.

Ο ιστός αρχικά θερμαίνεται και αποπαραφινώνεται σε μια διαδικασία που διαρκεί 60 λεπτά. Ακολούθως, γίνεται η αποκάλυψη του αντιγονικού επιτόπου με τη χρήση κατάλληλου κυτταρικού διαλύματος (CC1), για 60 λεπτά στους 99 °C. Κατόπιν, γίνεται ενζυματική προεπάση για τον περιορισμό της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης, για 4 λεπτά στους 37°C. Έπειτα η εξωγενής προσθήκη του πρωτοταγούς αντισώματος σε συγκέντρωση που προσδιορίστηκε με βάση το καλύτερο των δοκιμών/αποτελεσμάτων και η επώασή του σε θερμοκρασία 37°C για 62 λεπτά για όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια προστίθεται αυτόματα το δευτεροταγές βιοτινιόμενο αντίσωμα, το οποίο επώάζεται για 8 λεπτά στους 37°C. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη του ενζυμικού συμπλόκου αβιδίνη/στρεπταβιδίνης και την επώασή του για 8 λεπτά και πάλι στους 37°C. Τα δύο επόμενα και τελευταία στάδια στην επεξεργασία του ιστού από το μηχάνημα, είναι η προσθήκη του χρωμογόνου διαλύματος διαμινοβενζιδίνης (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) και επώαση για 4 λεπτά καθώς και η επίχρωση των τομών με αιματοξυλίνη. Σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια της ανωτέρω διαδικασίας γινόταν αυτόματη έκπλυση των ιστολογικών τομών με TBS (Triphosphate Buffered Saline, pH 7,6).

Μετά την ολοκλήρωση της ανωτέρω διαδικασίας, τα πλακίδια αφαιρέθηκαν από το μηχάνημα και εκπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 10 λεπτά, καθώς και με επαναλαμβανόμενες πλύσεις με απεσταγμένο νερό. Τέλος, τα πλακίδια οδηγήθηκαν σε ανιούσα αφυδάτωση (2 διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 96% αιθανόλη από 2 λεπτά έκαστη σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature), 2 διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 100% αιθανόλη από 2 λεπτά έκαστη σε RT, 2 διαδοχικές εμβαπτίσεις σε ξυλόλη από 3 λεπτά έκαστη σε RT), καλύφθηκαν με καλυπτρίδες και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ακολούθησε η συλλογή τους και η παρατήρηση και εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης σε οπτικό μικροσκόπιο.

Στο σύνολο των ανοσοχρώσεων που πραγματοποιήθηκαν, έγινε χρήση θετικών και αρνητικών μαρτύρων, οι οποίοι ήταν μονιμοποιημένοι σε διάλυμα φορμαδεύδης 4% και εμβυθισμένοι σε παραφίνη. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές αντιδραστικού λεμφαδένα, ενώ ως αρνητικοί, ιστολογικές τομές φυσιολογικού θύμου αδένα όπου δεν είχε γίνει η προσθήκη και επώαση του πρωτοταγούς αντισώματος.



### Ανάλυση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Για την εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, υιοθετήθηκε η χρήση του x40 αντικειμενικού φακού του οπτικού μικροσκοπίου και μετρήθηκαν τα ανοσοθετικά για κάθε πρωτεΐνη κύτταρα σε 10 επιλεγμένα οπτικά πεδία που περιείχαν κύτταρα που παρουσίαζαν έκφραση της υπό μελέτης πρωτεΐνης. Ο αριθμός αυτός των ανοσοθετικών κυττάρων, διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και μετατράπηκε σε ποσοστιαία % αναλογία (θετικά κύτταρα/συνολικός αριθμός κυττάρων X100).

Ο προσδιορισμός των ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης κάθε φορά πρωτεΐνης, έγινε με την ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας τις κατηγορίες του Πίνακα 2.

### Πίνακας 2.

| Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης | Κλίμακα έκφρασης    |
|--------------------------------|---------------------|
| Σπάνια μεμονωμένα κύτταρα <5%  | +/-                 |
| Ανοσοθετικά κύτταρα 5-25%      | + (χαμηλή έκφραση)  |
| Ανοσοθετικά κύτταρα 25-50%     | ++ (μέτρια έκφραση) |
| Ανοσοθετικά κύτταρα >50%       | +++ (υψηλή έκφραση) |

### Μέθοδος in situ σήμανσης TUNEL (Terminal digoxigenin UTP Nick-End Labeling)

Ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε άμεση σύγκριση με την κυτταρική μορφολογία (δείκτης απόπτωσης), πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση του peroxidase kit Aoptag<sup>®</sup> της εταιρείας Calbiochem (Onchor. Gaithenburg).

### Περιγραφή της μεθόδου TUNEL

Η τεχνική TUNEL συνδυάζει το βιοχημικό φαινόμενο του κατακερματισμού του DNA με τη μορφολογική παρατήρηση της απόπτωσης in situ. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (Terminal deoxynucleotidyl transferase, Tdt) συνδέεται ειδικά με το 3'-OH-τελικό άκρο κάθε τμήματος αποπτωτικού DNA (θραύσματα DNA) και στη συνέχεια γίνεται η

ενσωμάτωση τριφωσφορικής δεσοξουριδίνης συνδεδεμένης με βιοτίνη (βιοτινυλιωμένη dUTP) στις εγκοπές του DNA.

Πιο συγκεκριμένα, οι ιστολογικές τομές αρχικά υποβλήθηκαν σε αποπαραφίνωση και βαθμιαία ενυδάτωση. Η απομάκρυνση της παραφίνης έγινε με τοποθέτηση των πλακιδίων για μία ώρα περίπου σε κλίβανο στους 60°C και μετέπειτα εμβάπτισή τους για 20 λεπτά σε διάλυμα ζεστής ξυλόλης (60°C). Κατόπιν η διαδικασία ενυδάτωσης του αποπαραφινωμένου ιστού πραγματοποιήθηκε με κατιούσα σειρά αλκοολών (2 διαδοχικές εμβαπτίσεις σε ξυλόλη από 3 λεπτά έκαστη σε RT, 2 διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 100% αιθανόλη από 2 λεπτά έκαστη σε RT, 2 διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 96% αιθανόλη από 2 λεπτά έκαστη σε RT) και αμέσως μετά έγινε έπλυση με διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4). Ακολούθησε η πρωτεολυτική πέψη του ιστού με διάλυμα πρωτεϊνάσης K σε PBS (20 µg/ml, Oncor) για χρονικό διάστημα 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Με αυτό το στάδιο της διαδικασίας, γίνεται μερική πέψη των πρωτεϊνών του ιστού και έτσι τα θραύσματα DNA καθίστανται πλέον προσιτά στο ένζυμο Tdt. Κατόπιν πραγματοποιείται επώαση σε διάλυμα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έτσι επιτυγχάνεται η αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης πριν από την ενζυμική σήμανση. Η τελευταία γίνεται μετά την εφαρμογή ενός διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer) και περιλαμβάνει την επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 1 ώρα με διάλυμα που περιέχει το ένζυμο Tdt καθώς και βιοτινυλιωμένη dUTP (working-strength Tdt enzymes). Τερματίζεται δε με την επώαση σε προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα (working-strength stop/wash buffer) παραμένοντας στην ίδια θερμοκρασία. Έπειτα οι τομές εκπλύονται για 10 λεπτά με διάλυμα PBS.

Μετά την ολοκλήρωση των βημάτων που απαιτούνται για ενζυμική σήμανση, ακολουθεί η προσθήκη αντισώματος έναντι της βιοτινυλιωμένης dUTP, συζευγμένου με υπεροξειδάση ώστε να εντοπιστούν τα ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την προσθήκη του χρωμογόνου 3,3'-τετραχλωρικής διαμινοβενζιδίνης (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) για 45 δευτερόλεπτα και η επίχρωση με αιματοξυλίνη (Harris' hematoxylin) για 3 λεπτά. Στο τελευταίο κομμάτι της διαδικασίας, τα πλακίδια υφίστανται έκλυση με νερό βρύσης και εμβαπτίζονται σε διαδοχικά διαλύματα ανιούσας σειράς αλκοολών προκειμένου να αφυδατωθούν. Με την ολοκλήρωση της αφυδάτωσης, καλύπτονται με καλυπτρίδες, αφήνονται να στεγνώσουν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και

αμέσως μετά μικροσκοπούνται σε οπτικό μικροσκόπιο και μεγέθυνση x400. Ως TUNEL-θετικά κύτταρα (αποπτωτικά κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία της απόπτωσης) χαρακτηρίστηκαν τα κύτταρα στα οποία είχε επισημανθεί ο πυρήνας. Ένα πλακίδιο, στο οποίο έγινε επεξεργασία με ενδονουκλεάση, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα. Αντίθετα, ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε πλακίδιο στο οποίο δεν προστέθηκε το ένζυμο Tdt.

Ο αποπτωτικός δείκτης (AI) προσδιορίστηκε με βάση τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων εκφραζόμενο ως εκατοστιαίο ποσοστό των επί του συνόλου των κυττάρων που είχαν μετρηθεί. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν τα αποπτωτικά κύτταρα σε 10 τυχαία επιλεγμένα οπτικά πεδία.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανοσοτοπογραφική κατανομή και τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσίασαν ποικιλία, ανάλογα με τον κυτταρικό πληθυσμό του φυσιολογικού ανθρώπινου θύμου αδένου, στον οποίο εκφράζονταν. Κατά την αξιολόγησή τους, εκτιμήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση στους υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κύτταρων (υποκαψικά, φλοιικής μοίρας, μυελικής μοίρας και σωμάτια Hassall), καθώς και στα θυμικά λεμφοκύτταρα (T-λεμφοκύτταρα). Επιπλέον, μετρήθηκε ο αποπτωτικός δείκτης τόσο με τη θετικότητα των κυττάρων που αποπίπτουν με τη μέθοδο TUNEL, όσο και με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3.

Μία σύνοψη όλων των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν φαίνονται στους πίνακες 3 και 4 και στα σχήματα (Box plots) 1 και 2. Η αντίχνευση θετικών κυττάρων με τη μέθοδο TUNEL απεικονίζεται στο σχήμα 3.

## **A) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ**

**Ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (TECs<sup>SS</sup>)**

**• Ανοσοϊστοχημική έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bim/BOD και bid (Πίνακας 3)**

Η πρωτεΐνη bax, ανοσοϊστοχημικά παρουσιάζει κυτταροπλασματική χρώση. Στην περιοχή του φλοιού αναγνωρίζονται μεμονωμένα ανοσοθετικά κύτταρα. Στο μυελό, κατά θέσεις ο αριθμός τους γίνεται μικρός (5-25%), αλλά γενικά και σε αυτή τη ζώνη η έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρείται σε μεμονωμένα κύτταρα. Τα σωματίδια Hassall δεν εμφανίζουν θετικότητα στο αντίσωμα. **(εικόνα 1)**

Η πρωτεΐνη bak εμφανίζει κυτταροπλασματική έκφραση και εντοπίζεται κυρίως στη μυελική ζώνη. Τα επιθηλιακά κύτταρα από την υποκαψική περιοχή μέχρι τη φλοιομυελική ζώνη μόνο σπάνια εμφανίζουν έκφραση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, τα ανοσοθετικά κύτταρα αυξάνονται σε ποσοστό στο μυελό (5-25%), ενώ όλα σχεδόν τα σωματίδια Hassall είναι θετικά. **(εικόνα 2)**

Η bad πρωτεΐνη, με την κυτταροπλασματική έκφρασή της, αναγνωρίζεται σε μέτριο αριθμό (25-50%) επιθηλιακών κυττάρων του μυελού και επιπλέον, παρουσιάζει υψηλή έκφραση (50-100%) στα σωματίδια Hassall. Στη φλοιική περιοχή δεν παρατηρείται έκφραση της πρωτεΐνης. **(εικόνα 3)**

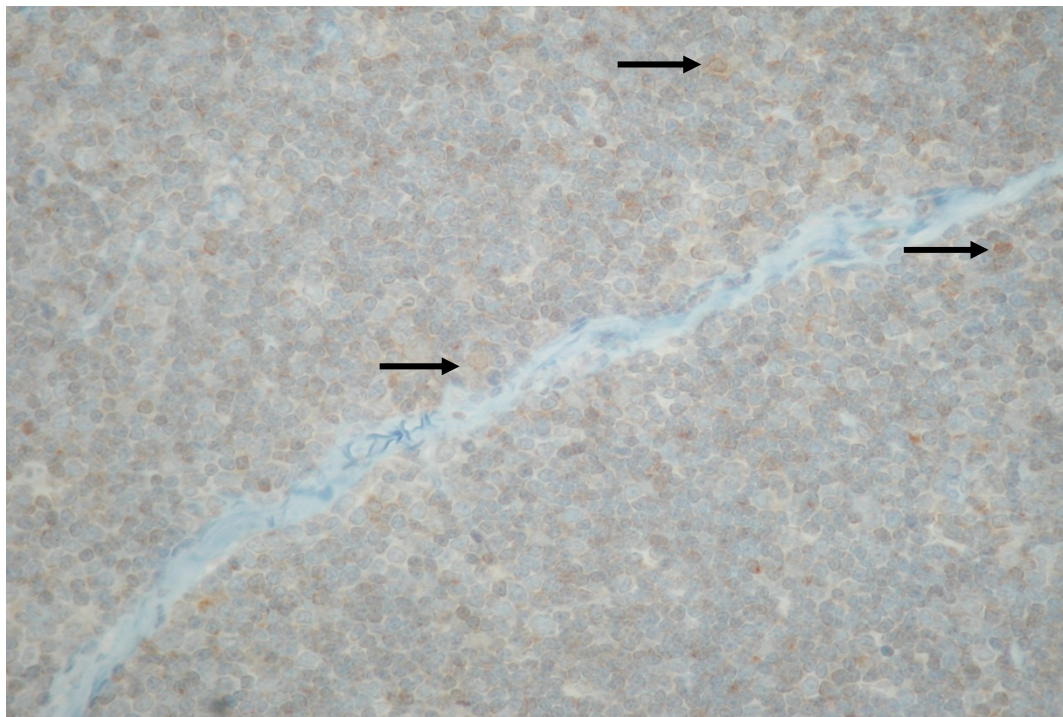
Η πρωτεΐνη bim/BOD παρουσιάζει κοκκιώδη κυτταροπλασματική ανοσοχρώση. Οι υπότυποι των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων ανά τον αδένα δεν παρουσιάζουν έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στα σωματίδια Hassall παρατηρείται επίσης έλλειψη της έκφρασης της πρωτεΐνης bim/BOD. **(εικόνα 4)**

Τέλος, η bid πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματική ανοσοχρώση και εμφανίζει ποικίλη έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένα. Τα υποκαψικά και τα κύτταρα του φλοιομυελικού ορίου εμφανίζουν είτε χαμηλή έκφραση (5-25%), είτε παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα ως μεμονωμένα. Στα κύτταρα του φλοιού αναγνωρίζεται χαμηλή (5-25%) έως μέτρια (25-50%), αναλόγως των περιστατικών, έκφραση της πρωτεΐνης (25-50%), ενώ μεγάλος αριθμός κυττάρων (50-100%) εμφανίζει ανοσοθετικότητα στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη στο μυελό. Παρόλα αυτά, τα σωματίδια Hassall είναι αρνητικά. **(εικόνα 5)**

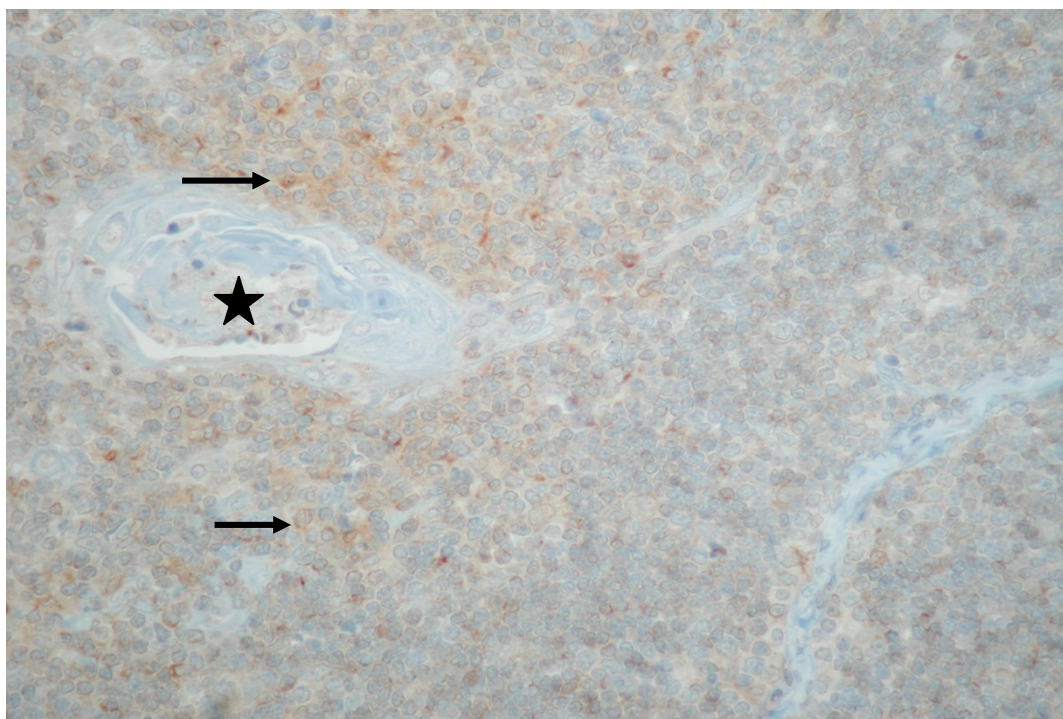
---

<sup>SS</sup> Thymic Epithelial Cells

**Εικόνα 1. Bax**



**α) X400**



**β) X400**

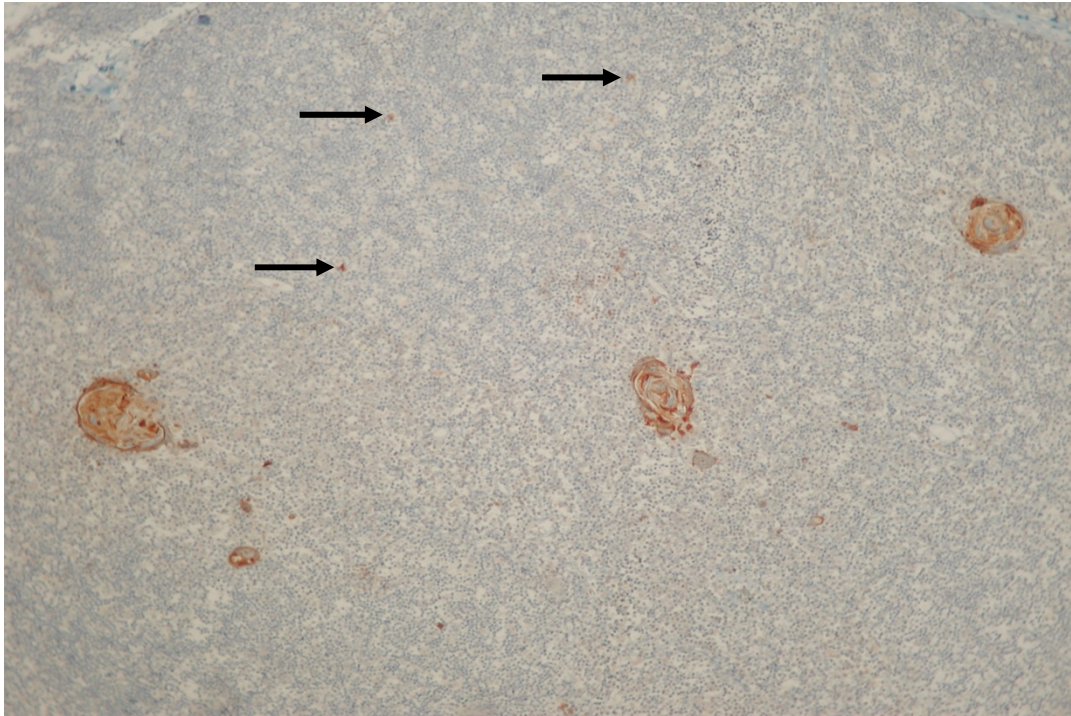
**α) Βέλη:** Μεμονωμένα ανοσοθετικά φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα

**β) Βέλη:** Ανοσοθετικά μυελικά επιθηλιακά κύτταρα

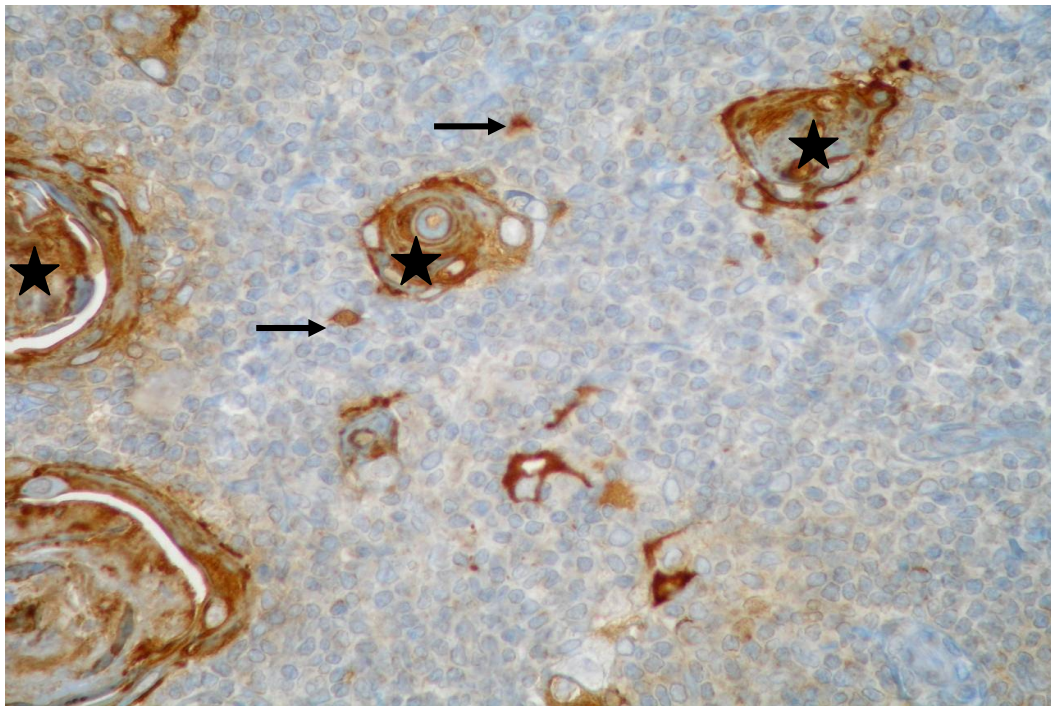
**Αστέρι:** Σωμάτια Hassall ανοσοαρηνητικά



Εικόνα 2. Bak



α) X40



β) X400

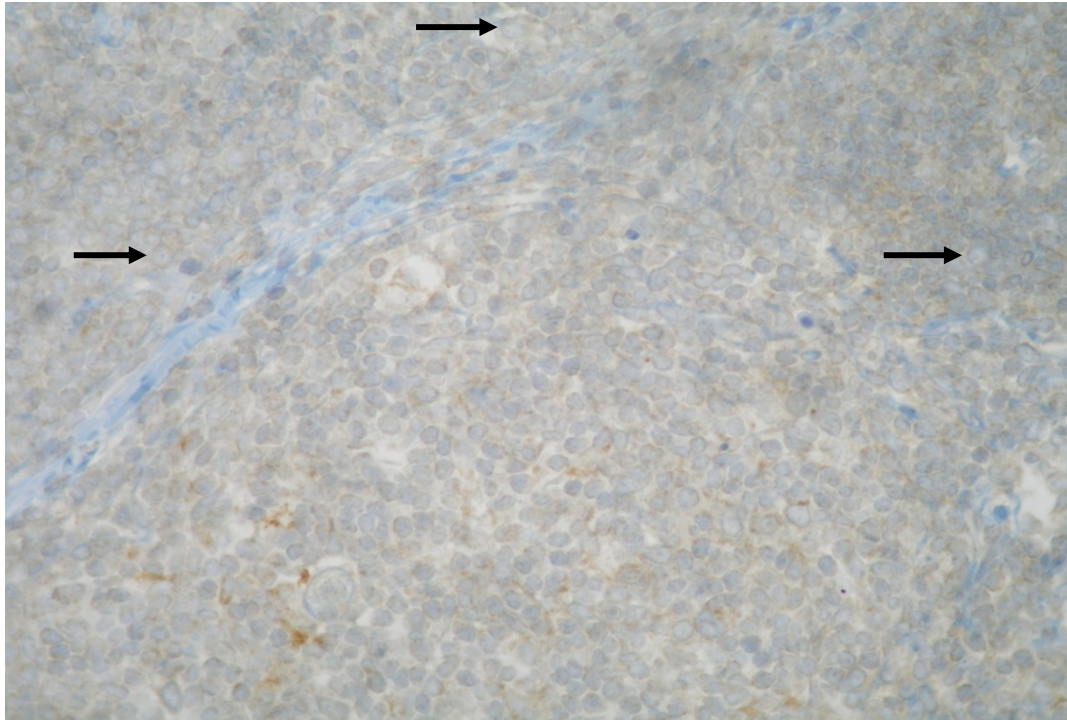
α) Βέλη: Σπάνια ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα στο φλοιό

β) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας

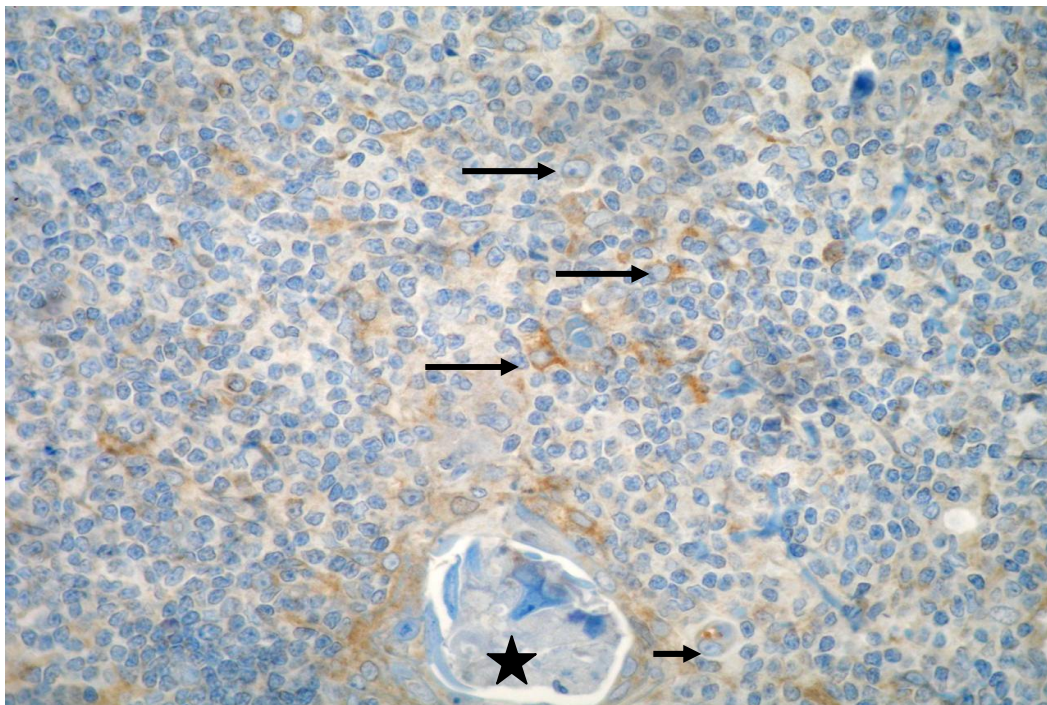
Αστέρια: Ανοσοθετικά σωματίνα Hassall



Εικόνα 3. Bad



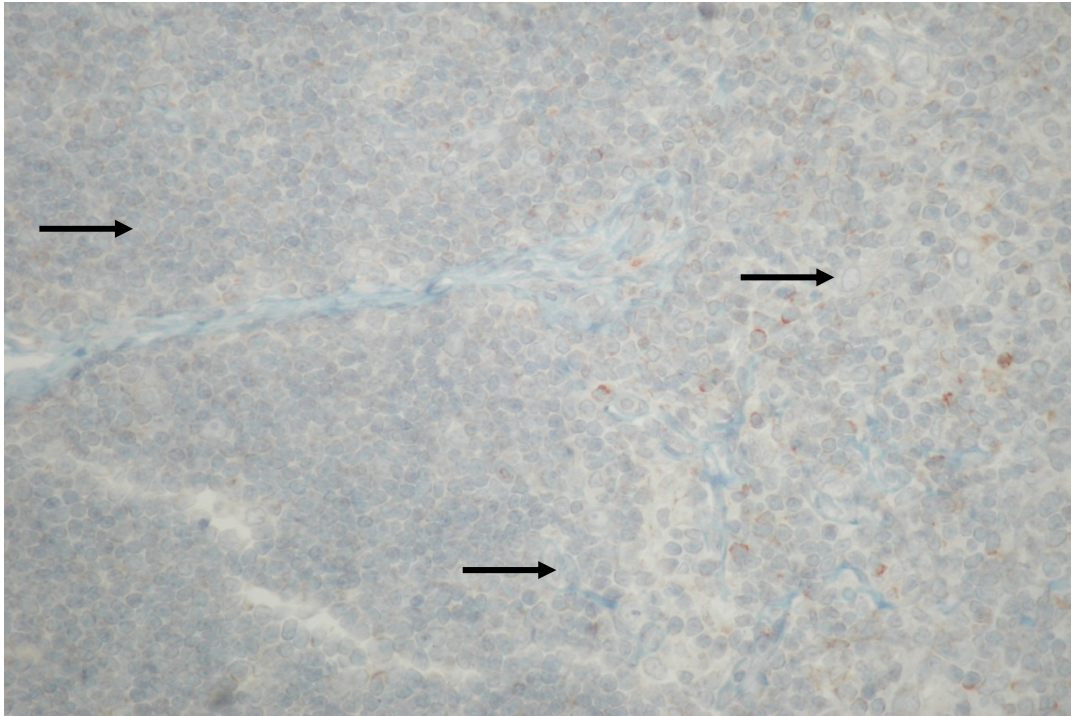
α) X400



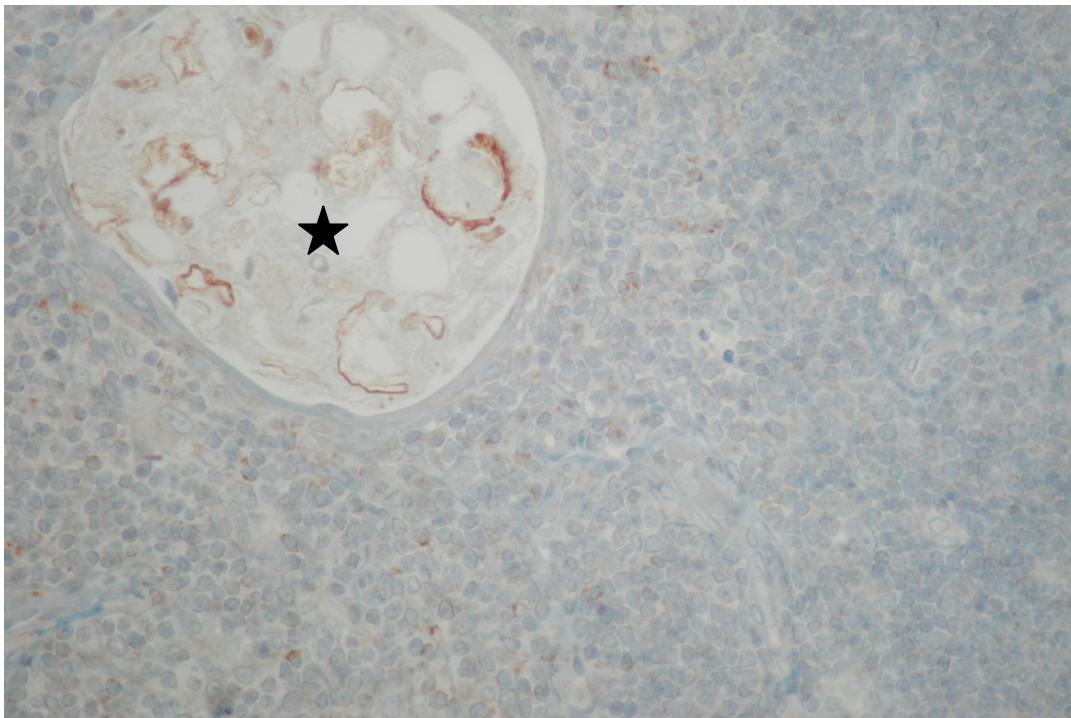
β) X400

- α) Βέλη: Ανοσοαρνητικά επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής ζώνης
- β) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής περιοχής
- Αστέρι: Ανοσοθετικά σωματίδια Hassall

Εικόνα 4. Bim/BOD



α) X200



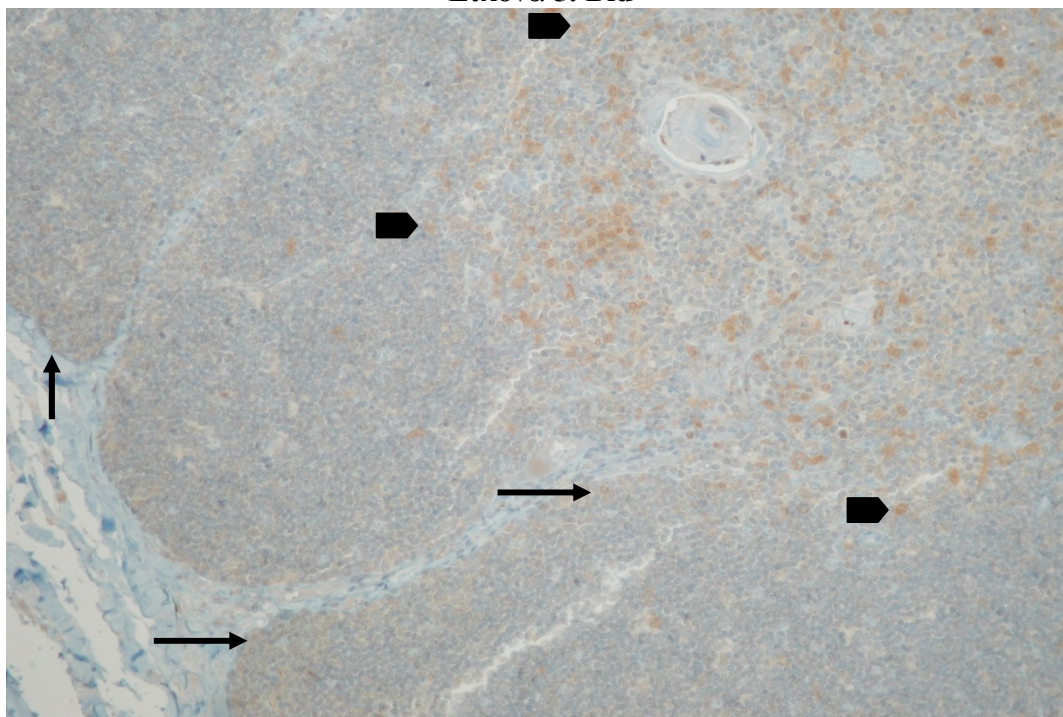
β) X400

α) Βέλη: Ανοσοαρνητικά επιθηλιακά κύτταρα

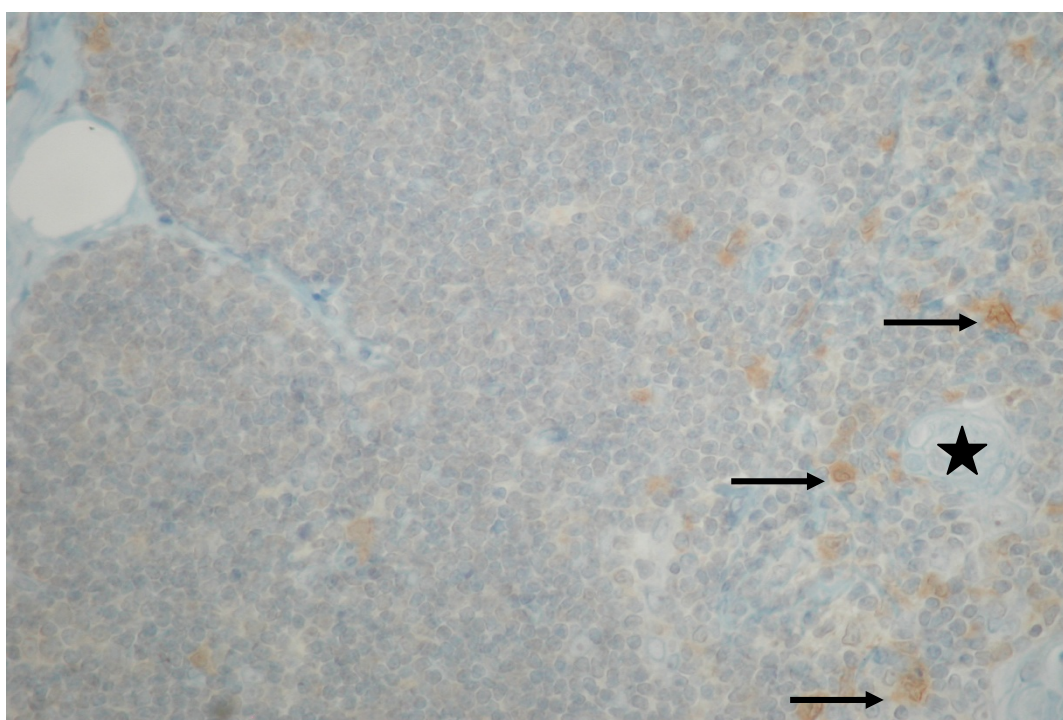
β) Αστέρι: Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall



Εικόνα 5. Bid



α) X100



β) X200

α) Βέλη: Ανοσοθετικά υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα

Κεφαλες βέλους: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιομυελικής ζώνης

β) Βέλη: Ανοσοθετικά μυελικά επιθηλιακά κύτταρα

Αστέρι: Σωμάτιο Hassall ανοσοαρνητικό

• **Ανοσοϊστοχημική έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin και Flip<sub>S/L</sub> (Πίνακας 3)**

Η πρωτεΐνη bcl-2, εμφανίζει κυτταροπλασματική και περιπυρηνική εντόπιση και αναγνωρίζεται σε μέτριο (25-50%) αριθμό επιθηλιακών κυττάρων της μυελικής ζώνης, ενώ στους άλλους τύπους επιθηλιακών κυττάρων της φλοιικής ζώνης παρατηρείται έκφρασή της σε μεμονωμένα κύτταρα. Τα σωματία Hassall είναι αρνητικά. **(εικόνα 6)**

Η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-xL αναγνωρίζεται με τη μορφή της κοκκιώδους κυτταροπλασματικής χρώσης. Στους υπότυπους των επιθηλιακών κυττάρων του αδένου δεν παρατηρείται έκφραση. Τα σωματία Hassall επίσης δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη. **(εικόνα 7)**

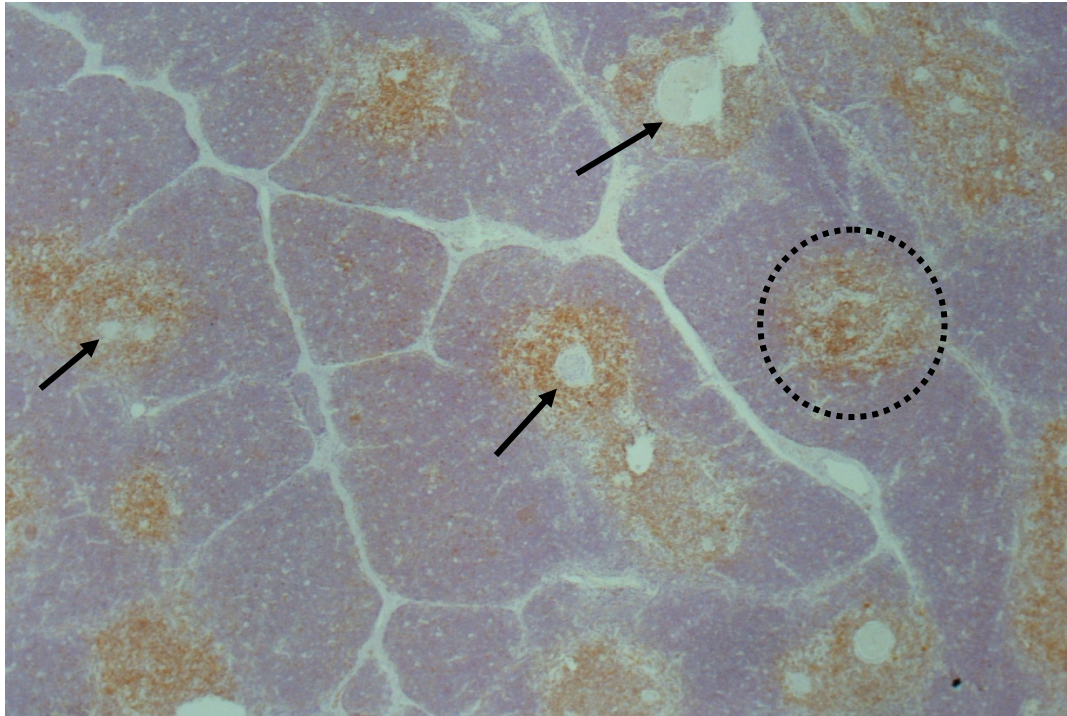
Η πρωτεΐνη mcl-1 παρουσιάζει κυτταροπλασματική κοκκιώδη χρώση. Εμφανίζει πολύ μικρή έκφραση με τη μορφή σπάνιων μεμονωμένων θετικών κυττάρων σε όλες τις κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων του οργάνου. Τα σωματία Hassall δεν εκφράζουν την εν λόγω πρωτεΐνη. **(εικόνα 8)**

Η πρωτεΐνη survivin παρουσιάζει πυρηνική εντόπιση, όμως δεν ανιχνεύθηκε η έκφρασή της στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένου. Τα σωματία Hassall είναι επίσης αρνητικά. **(εικόνα 9)**

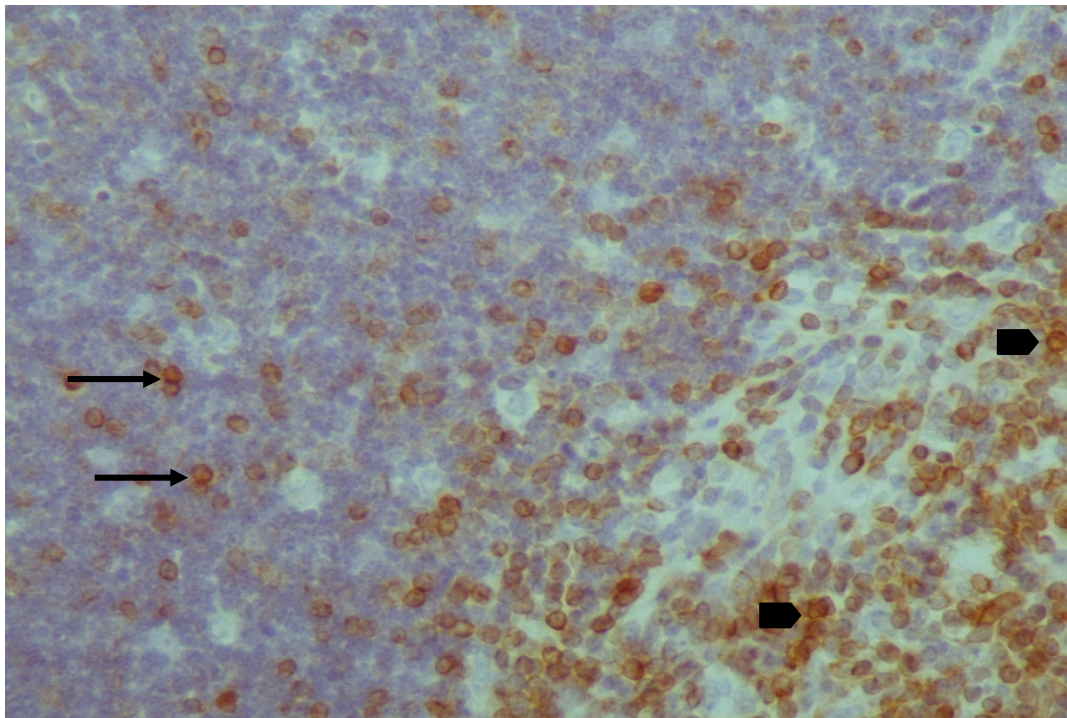
Η πρωτεΐνη FLIPs/l εμφανίζει κυτταροπλασματική έκφραση και συναντάται σχεδόν σε όλα τα είδη επιθηλιακών κυττάρων του οργάνου. Τα επιθηλιακά κύτταρα της υποκαψικής περιοχής εκφράζουν την πρωτεΐνη σχεδόν σε απόλυτο αριθμό. Στην περιοχή του φλοιού το ποσοστό της έκφρασης είναι σαφώς πιο χαμηλό (5-25%), όμως τόσο στη φλοιομυελική ζώνη, όσο και στη μυελική μοίρα υψηλός αριθμός επιθηλιακών κυττάρων εμφανίζονται ανοσοθετικά (50-100%). Όσον αφορά τα σωματία Hassall σχεδόν όλα είναι θετικά στην έκφραση της πρωτεΐνης. **(εικόνα 10)**



Εικόνα 6. Bcl-2



α) X40



β) X200

α) Βέλη: Σωμάτια Hassall ανοσοαρνητικά

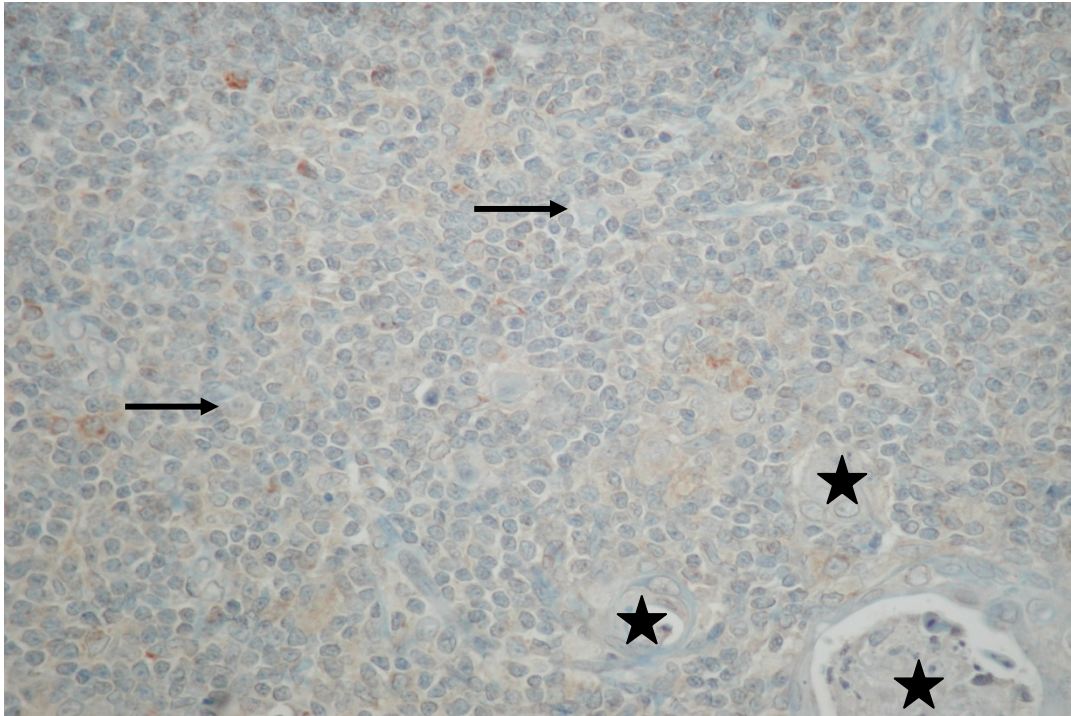
Κύκλος: Ανοσοθετικότητα εντοπισμένη κυρίως στο μυελό

β) Βέλη: Σπάνια ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα στο φλοιό

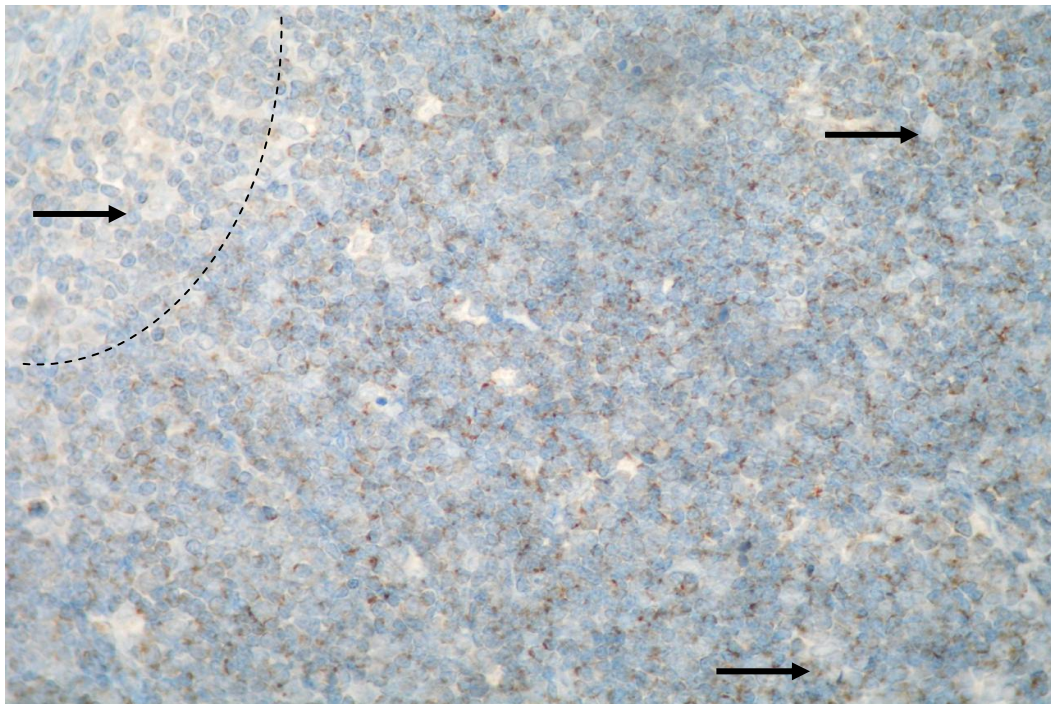
Κεφαλές βέλους: Ανοσοθετικότητα σε επιθηλιακά κύτταρα του μυελού



Εικόνα 7. Bcl-x1



α) X400

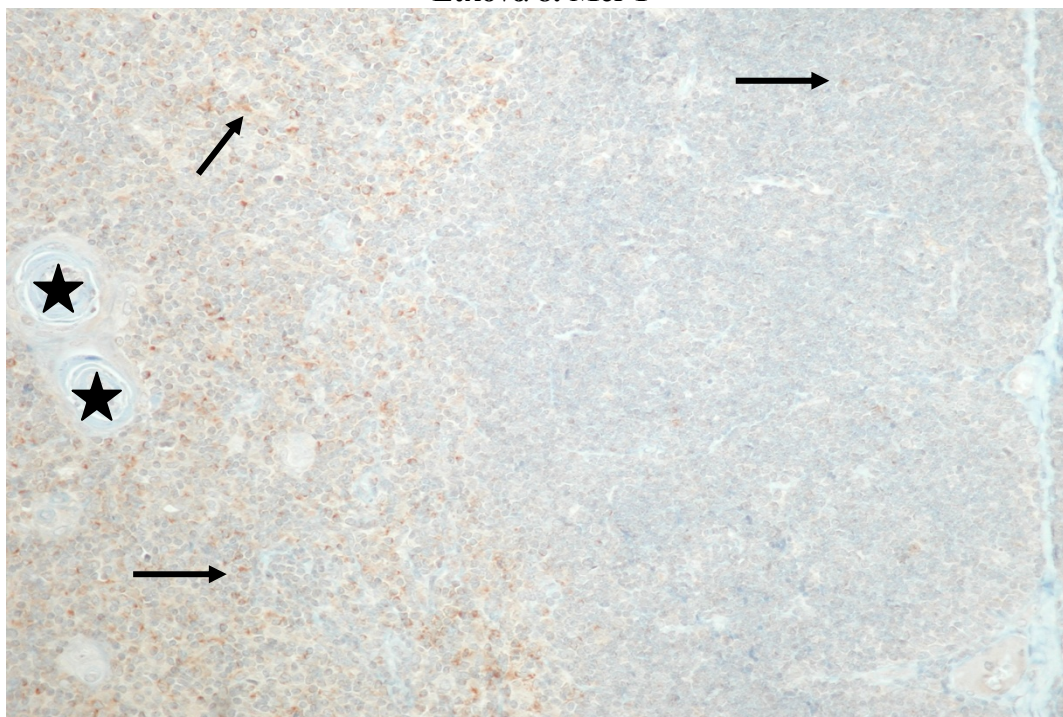


β) X400

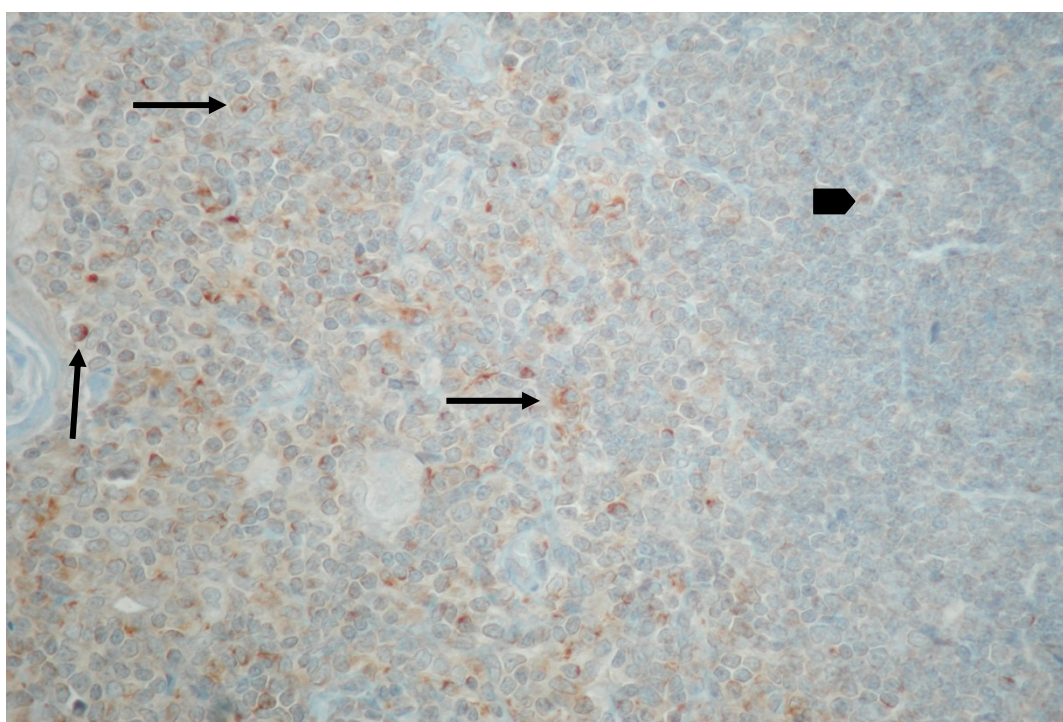
- α) Βέλη: Ανοσοαρνητικά επιθηλιακά κύτταρα  
Αστέρια: Ανοσοαρνητικά σωματίδια Hassall  
β) Βέλη: Ανοσοαρνητικά επιθηλιακά κύτταρα  
Διακεκομμένη γραμμή: όριο φλοιού –μυελού



Εικόνα 8. Mcl-1



α) X200



β) X400

α) Βέλη: Μεμονωμένα ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα

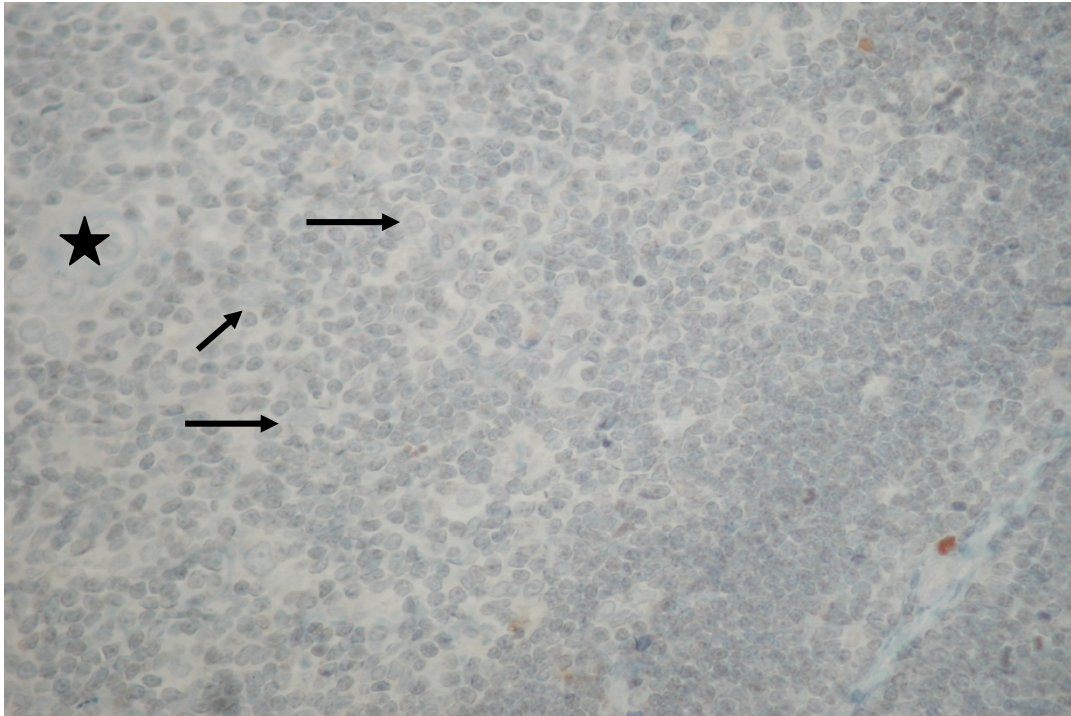
Αστέρια: Ανοσοαρνητικά σωμάτια Hassall

β) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα σε μυελό

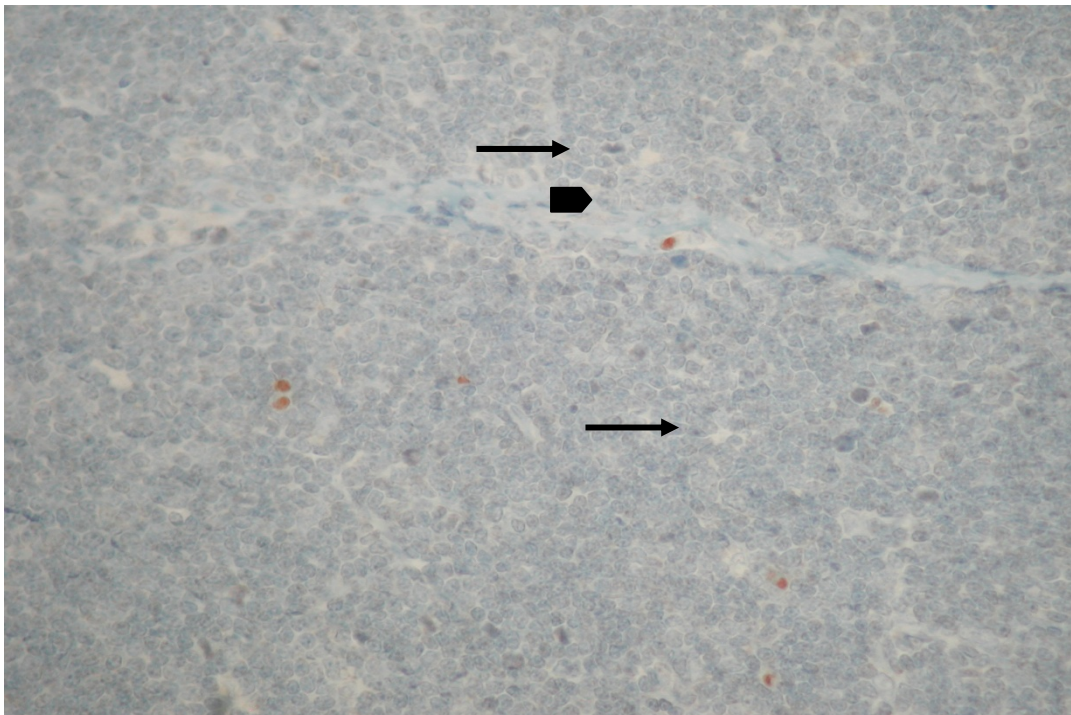
Κεφαλή βέλους: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα σε φλοιό



Εικόνα 9. Survivin



α) X400



β) X400

α) **Βέλη:** Ανοσορνητικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής ζώνης

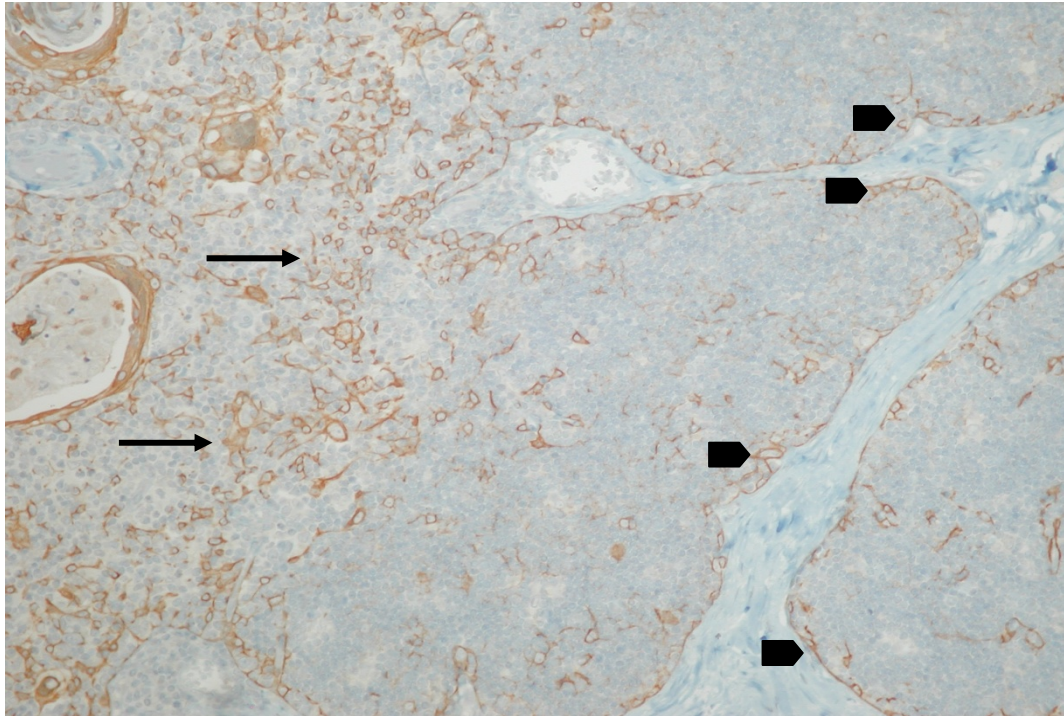
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall

β) **Βέλη:** Ανοσορνητικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιικής ζώνης

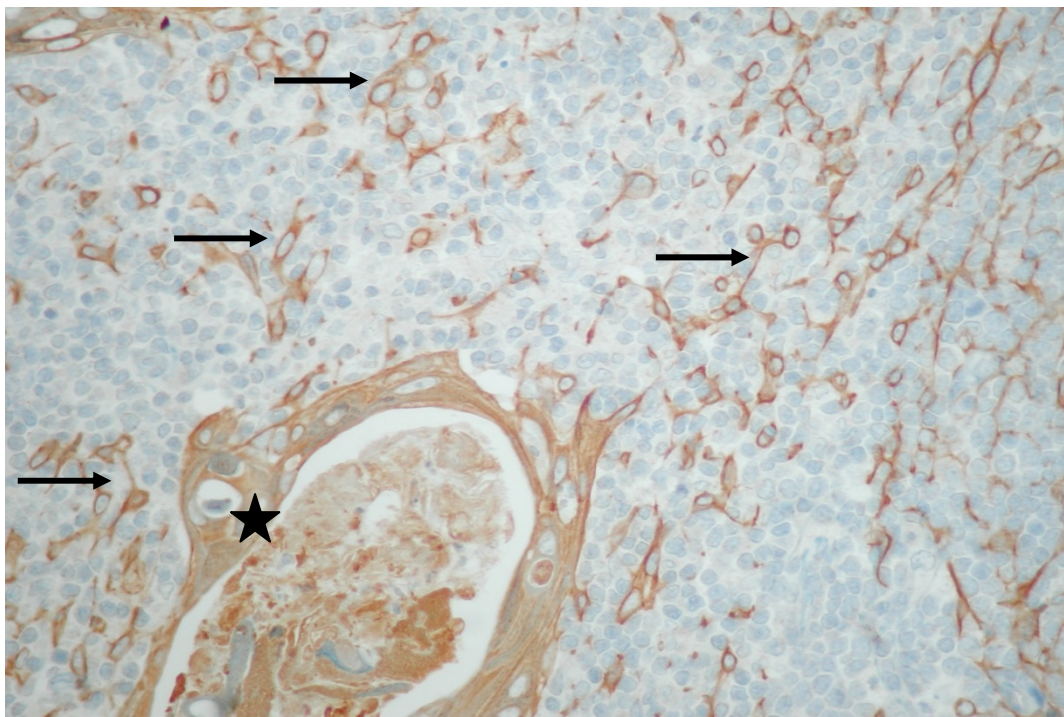
**Κεφαλή βέλους:** Ανοσορνητικό υποκαψικό επιθηλιακό κύτταρο



Εικόνα 10. FLIP<sub>SL</sub>



α) X100



β) X400

- α) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιομυελικού ορίου  
 Κεφαλές βέλους: Ανοσοθετικά υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα  
 β) Βέλος: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής ζώνης με αποφυάδες  
 Αστέρη: Ανοσοθετικό σωματίο Hassall

• **Ανοσοϊστοχημική έκφραση του υποδοχέα θανάτου Fas/CD95 και του συνδέτη του FasL (Πίνακας 3)**

Η πρωτεΐνη του υποδοχέα θανάτου Fas/CD95 παρουσιάζει κυτταροπλασματική ανοσοχρώση. Η έκφρασή της είναι έντονη (50-100%) σε όλα τα είδη επιθηλιακών κύτταρων που συναντώνται στο θύμο αδένα. Ιδιαίτερα δε τα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στις υποκαψικές περιοχές, καθώς και αυτά της φλοιομυελικής ζώνης, εκφράζουν την πρωτεΐνη σχεδόν σε απόλυτο αριθμό. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ανοσοθετικότητα αναδεικνύει τις αποφυάδες που παρουσιάζουν τα επιθηλιακά κύτταρα (δενδριτικά) και το δίκτυο που αυτά σχηματίζουν στο παρέγχυμα του οργάνου. Τα σωματία Hassall σε σπάνιες περιπτώσεις εμφανίζονται με θετική ανοσοχρώση. **(εικόνα 11)**

Ο συνδέτης του υποδοχέα του κυτταρικού θανάτου FasL, εμφανίζει κυτταροπλασματική έκφραση και χαρακτηρίζεται από μια προοδευτικά αυξανόμενη παρουσία από την περιφέρεια του λοβίου του οργάνου προς το κέντρο. Συγκεκριμένα, τα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν καθόλου το συνδέτη. Στην περιοχή του φλοιού σε διάσπαρτες θέσεις συναντώνται κάποια μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα θετικά για το FasL. Στη μυελική μοίρα, το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν το FasL είναι αυξημένο συγκριτικά με τις άλλες περιοχές, αλλά παραμένει μικρό (5-25%). Τέλος, τα σωματία Hassall, είναι ο πιο συχνά συναντώμενος κυτταρικός πληθυσμός που εκφράζει το συγκεκριμένο συνδέτη. Το ποσοστό τους κυμαίνεται στο 25-50%. **(εικόνα 12)**

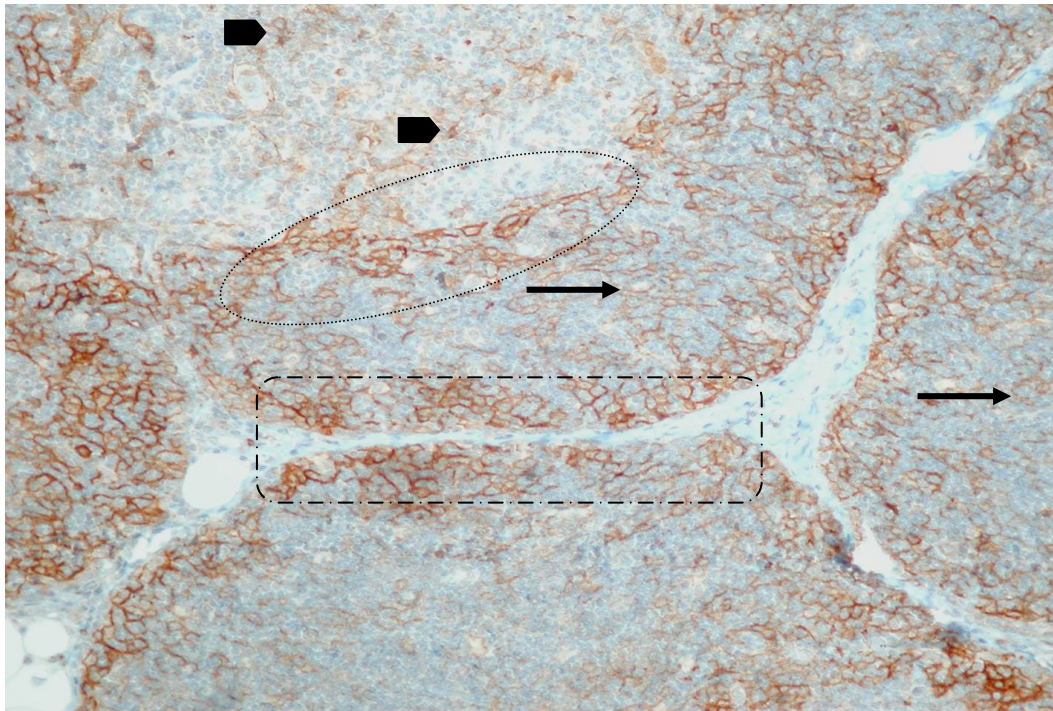
• **Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κασπάσης-3 και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 (Πίνακας 3)**

Η κασπάση-3 εμφανίζει κυτταροπλασματική ανοσοχρώση και παρουσιάζει καθολική υψηλή έκφραση (50-100%) σε όλους τους υπότυπους των επιθηλιακών κυττάρων του θύμου. Τα σωματία Hassall είναι και αυτά θετικά. **(εικόνα 13)**

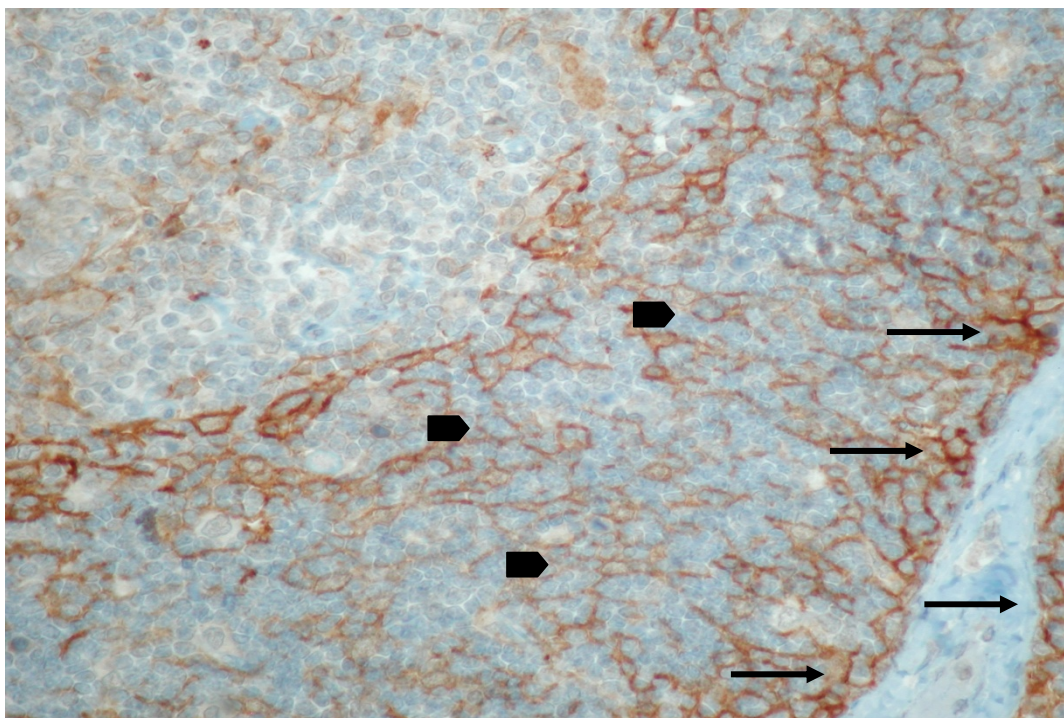
Αντίθετα, η ανοσοέκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 απουσιάζει παντελώς από τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. **(εικόνα 14)**



Εικόνα 11. Fas



α) X100

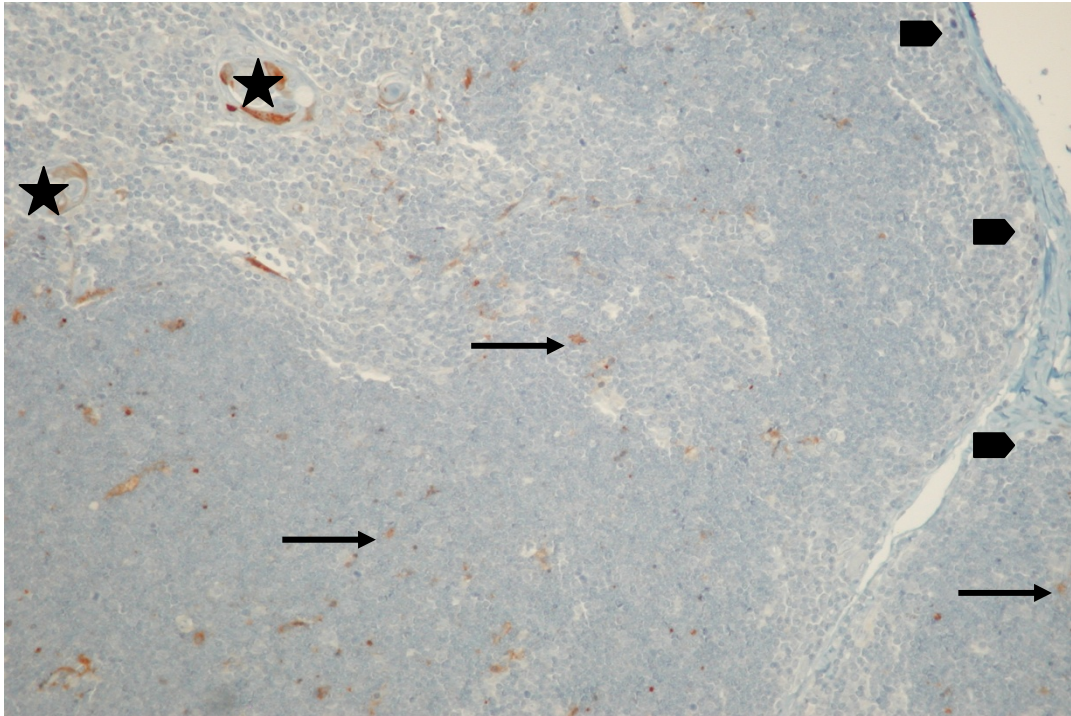


β) X200

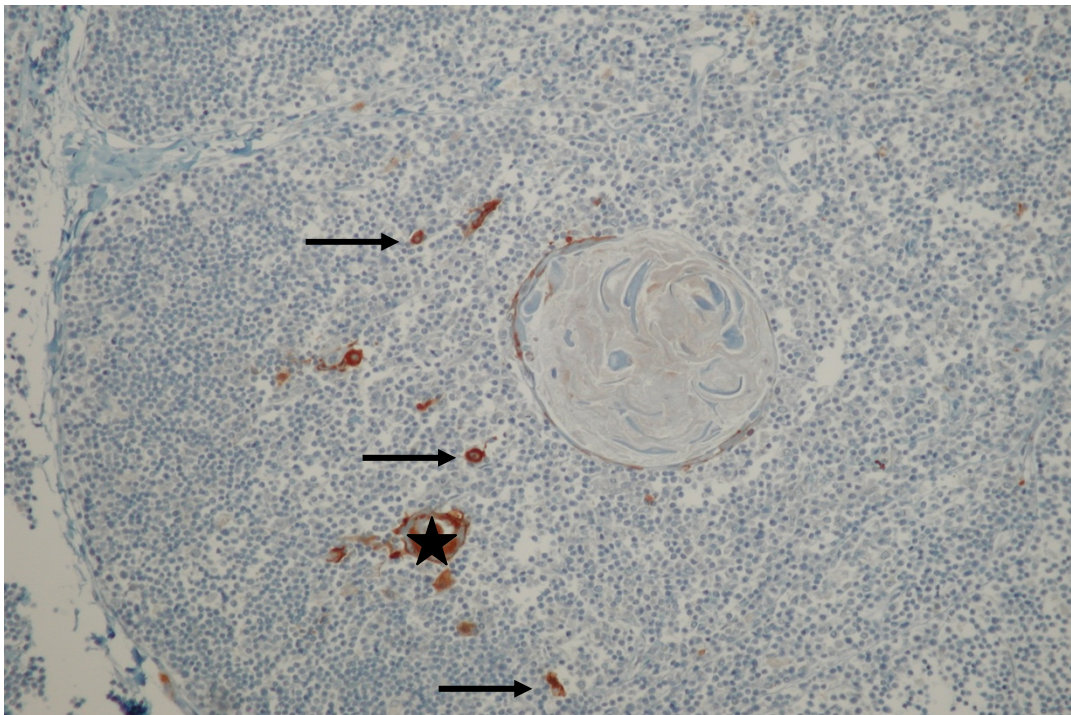
- α) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής ζώνης  
 Κεφαλές βέλους: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής ζώνης  
 Ορθογώνιο: Ανοσοθετικά υποκαπικά επιθηλιακά κύτταρα  
 Έλλειψη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιομυελικής ζώνης  
 β) Βέλη: Ανοσοθετικά υποκαπικά επιθηλιακά κύτταρα  
 Κεφαλές βέλους: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού



Εικόνα 12. FasL



α) X100



β) X200

α) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιού.

Κεφαλές βέλους: Απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα

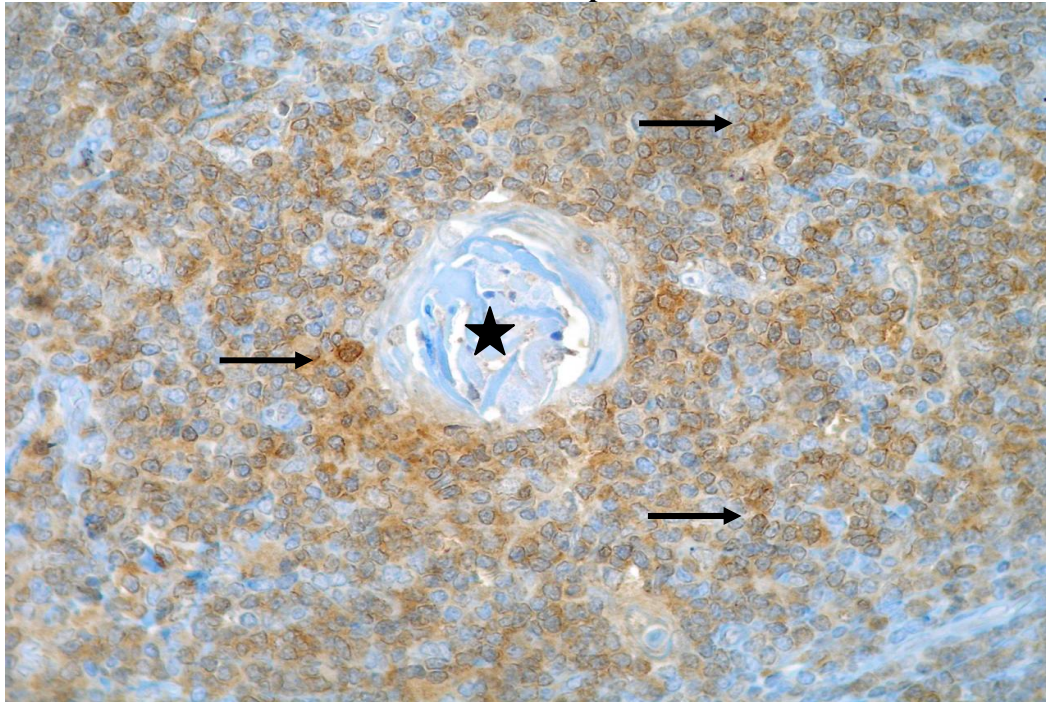
Αστέρια: Ανοσοθετικό σωματίο Hassall

β) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής ζώνης

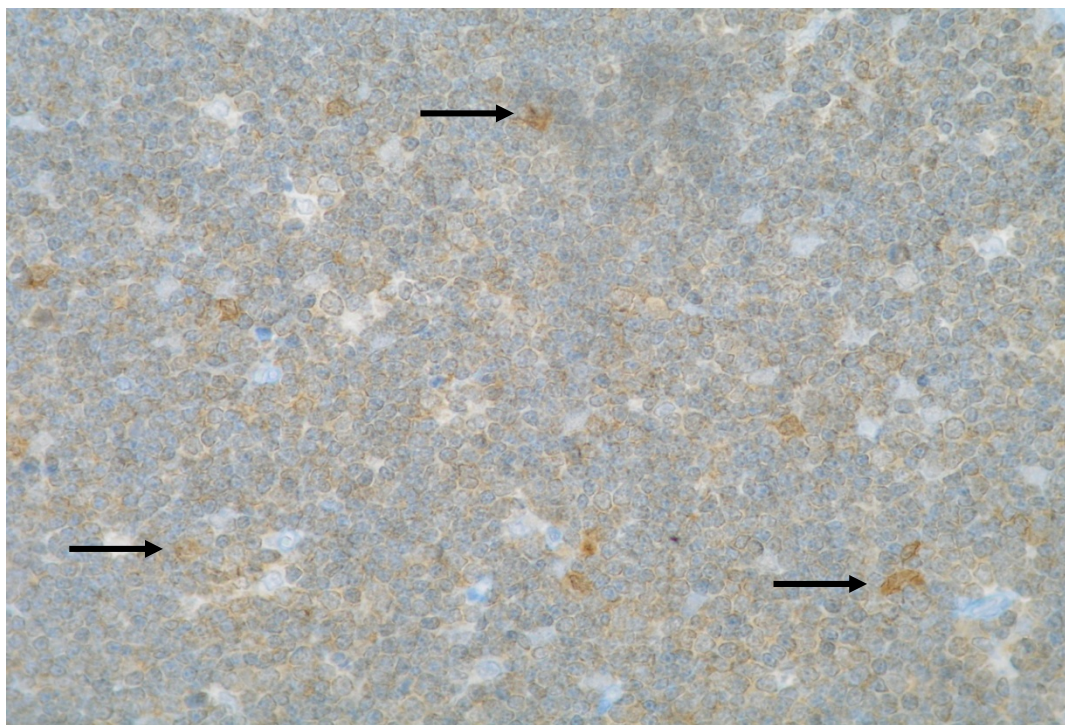
Αστέρι: Ανοσοθετικό σωματίο Hassall



Εικόνα 13. Caspase-3



α) X400



β) X200

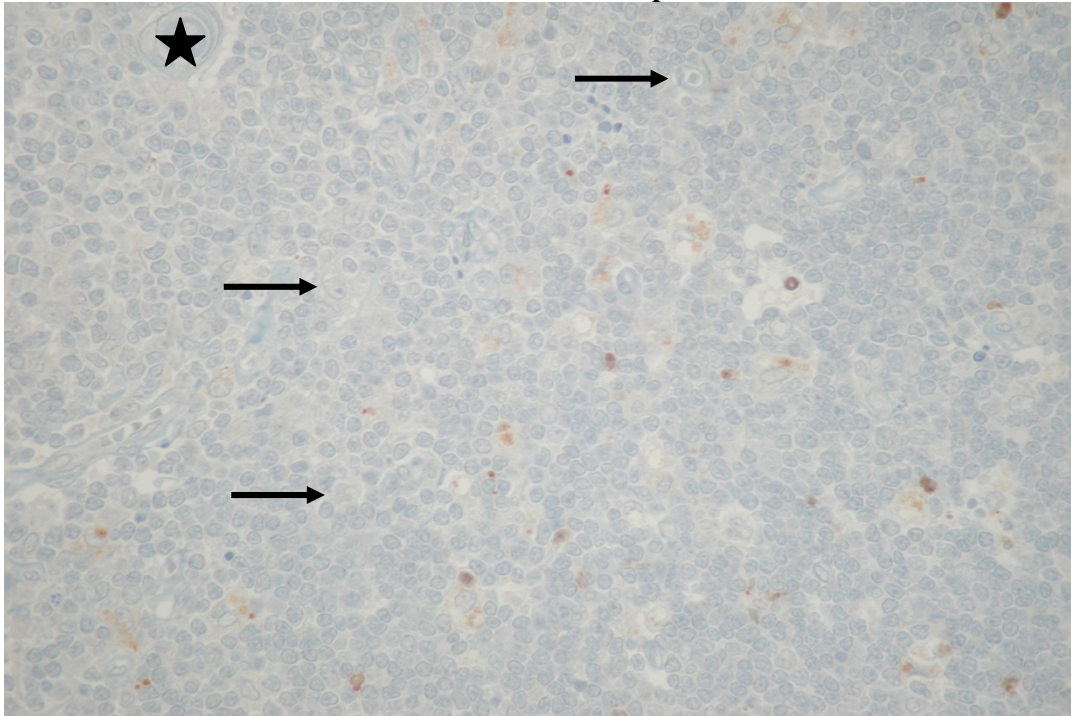
α) Βέλη: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής περιοχής

Αστέρι: Ανοσοθετικό σωματίο Hassall

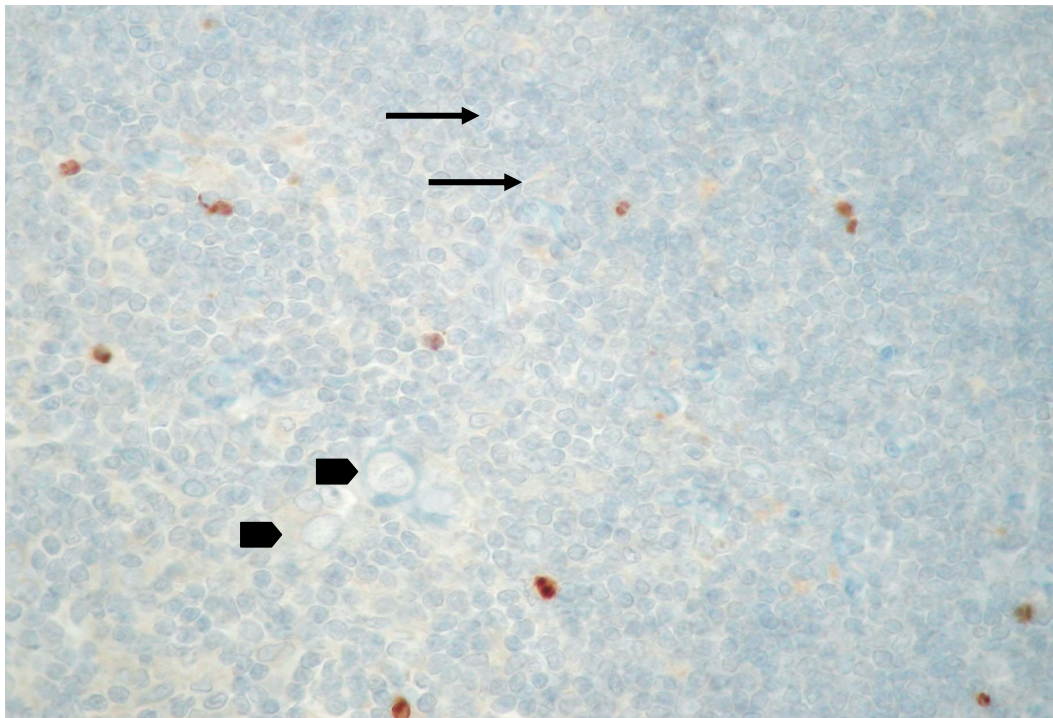
β) Βέλη: Ανοσοθετικά φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα



Εικόνα 14. Cleaved caspase-3



α) X400



β) X400

α) **Βέλη:** Ανοσοαρνητικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιομυελικής ζώνης

**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall

β) **Βέλη:** Ανοσοαρνητικά φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα

**Κεφαλές Βέλους:** Ανοσοαρνητικά μυελικά επιθηλιακά κύτταρα

• **Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη-A, κυκλίνη-B1, κυκλίνη-E, κυκλίνη-D1, κυκλίνη-D2, κυκλίνη-D3 (Πίνακας 3)**

Η κυκλίνη A εμφανίζει πυρηνική κοκκιώδη χρώση και παρουσιάζει μειούμενη έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα από την περιφέρεια προς το κέντρο του λοβίου. Πιο συγκεκριμένα, τα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα, αυτά του φλοιού και της φλοιομυελικής περιοχής εκφράζουν την κυκλίνη A σε ένα μικρό ποσοστό 5-25%. Εντονότερη η έκφραση αυτή είναι στην κατηγορία των υποκαψικών επιθηλιακών κυττάρων. Στη μυελική μοίρα μεμονωμένα κύτταρα δίνουν ανοσοθετικότητα στην πρωτεΐνη, ενώ τα σωματίδια Hassall είναι αρνητικά. **(εικόνα 15)**

Η κυκλίνη B1 εμφανίζει κυτταροπλασματική κοκκιώδη χρώση και η έκφρασή της παρουσιάζει στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αντιστοιχία με εκείνη της κυκλίνης A. Δηλαδή, στην φλοιική μοίρα υπάρχει ένα χαμηλό ποσοστό έκφρασης (5-25%), ενώ στη μυελική μοίρα μεμονωμένα κύτταρα εμφανίζονται ανοσοθετικά. Τα σωματίδια Hassall και σε αυτή την κυκλίνη είναι αρνητικά. **(εικόνα 16)**

Η κυκλίνη E παρουσιάζει πυρηνική κοκκιώδη χρώση και κατ' αντιστοιχία με την κυκλίνη D3, εμφανίζει μειούμενη έκφραση από την περιφέρεια προς το μυελό. Συγκεκριμένα στο φλοιό αναγνωρίζονται λίγα σε ποσοστό (5-25%) διάσπαρτα κύτταρα που εκφράζουν την κυκλίνη E, ενώ στο μυελό μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα δίνουν θετική ανοσοχρώση. Τα σωματίδια Hassall δεν παρουσιάζουν έκφραση της πρωτεΐνης. **(εικόνα 17)**

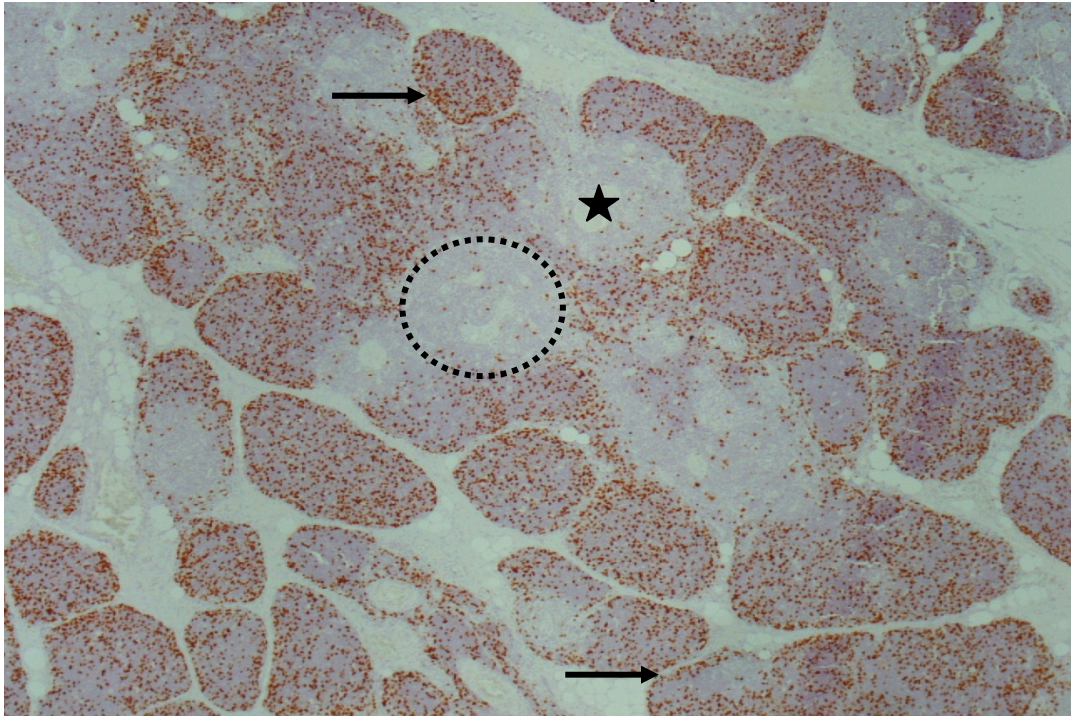
Η κυκλίνη D1 αναγνωρίζεται μόνο σε μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η κυκλίνη D2 παρουσιάζει πυρηνική κοκκιώδη χρώση. Στα επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής μοίρας η έκφρασή της είναι σχεδόν μηδενική. Στη μυελική μοίρα την εκφράζει μικρός αριθμός (5-25%) επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία συναντώνται κυρίως κοντά στην φλοιομυελική ζώνη. Τα σωματίδια Hassall σπάνια είναι θετικά. **(εικόνα 18)**

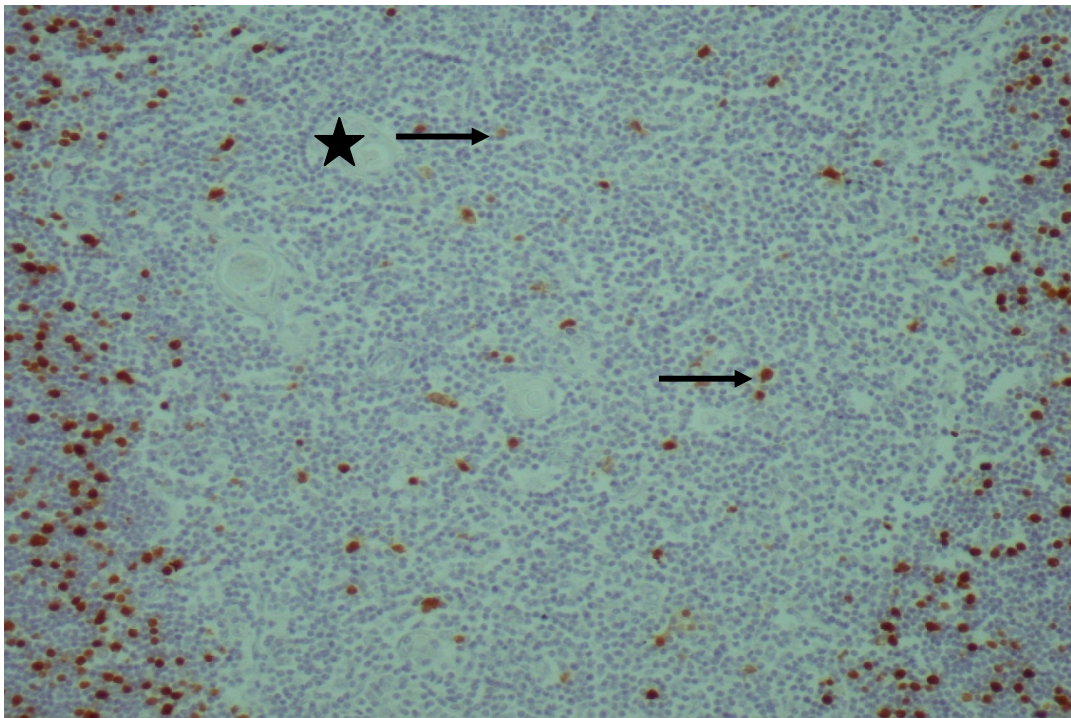
Η κυκλίνη D3 παρουσιάζει πυρηνική κοκκιώδη χρώση και η έκφρασή της στα επιθηλιακά κύτταρα του αδένα είναι μειούμενη από τη φλοιική προς τη μυελική ζώνη. Στο φλοιό η κυκλίνη D3 συναντάται σε ένα ποσοστό 5-25% των επιθηλιακών κυττάρων, με την εντόπισή της να γίνεται εντονότερη στις υποκαψικές περιοχές και το φλοιομυελικό όριο. Στο μυελό αναγνωρίζονται μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα με θετική ανοσοχρώση και τα σωματίδια Hassall σε σπάνιες μόνο περιπτώσεις είναι θετικά. **(εικόνα 19)**



Εικόνα 15. Κυκλίνη-A



α) X40

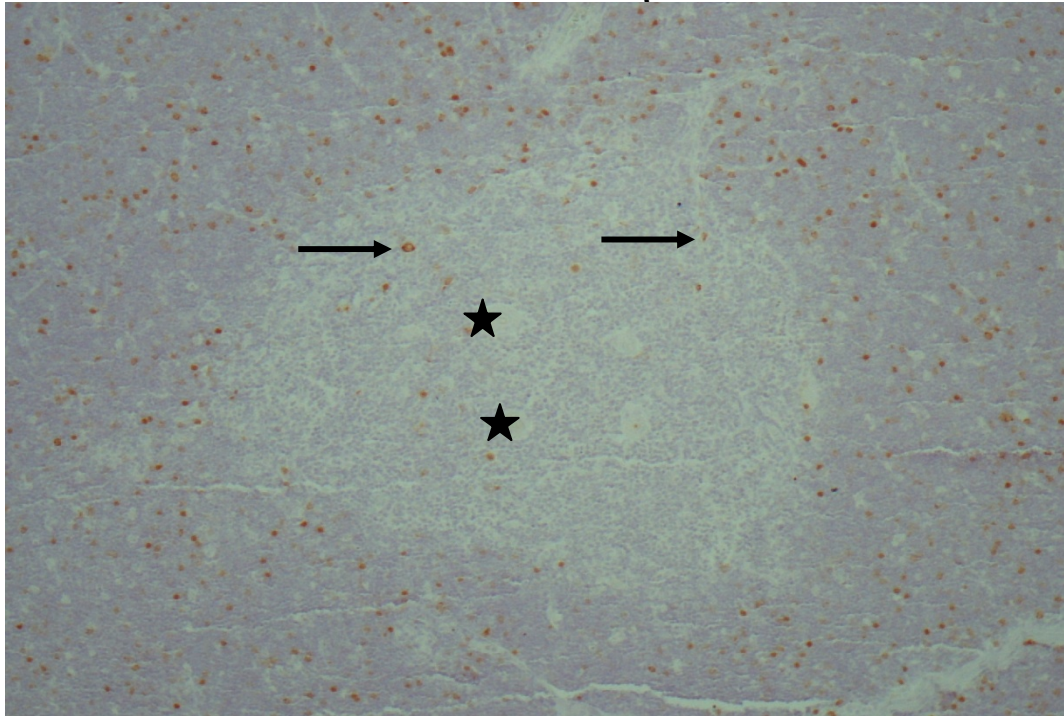


β) X100

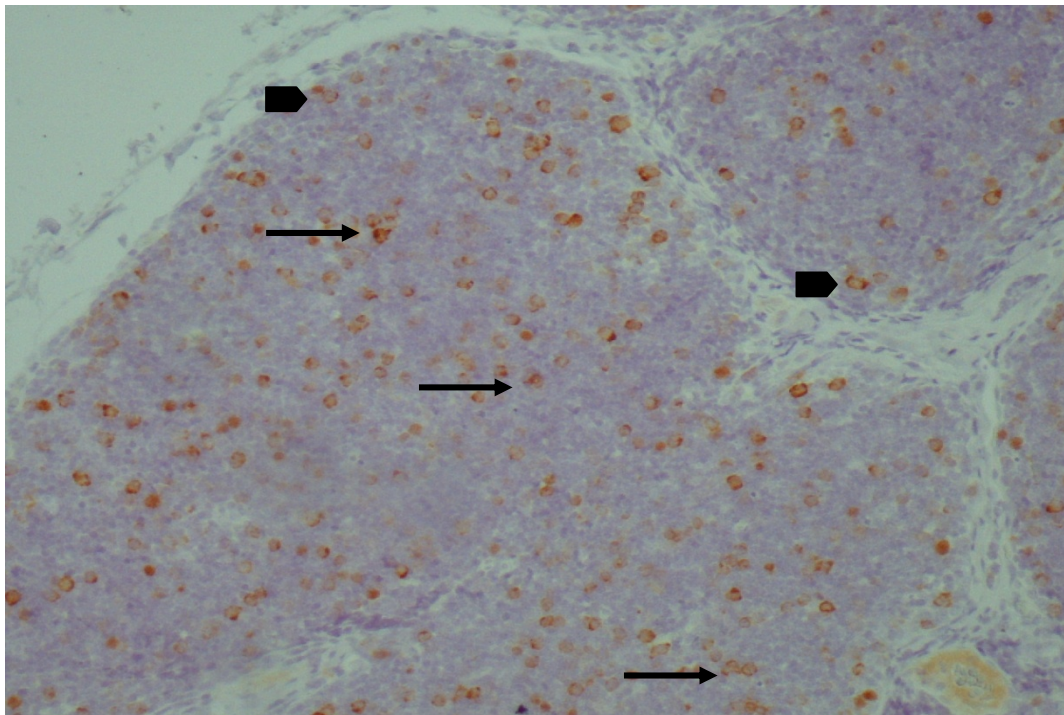
- α) **Βέλη:** Αυξημένη ανοσοέκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής ζώνης  
**Κύκλος:** Ελαττωμένη ανοσοέκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα της μυελικής μοίρας  
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall
- β) **Βέλη:** Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής περιοχής  
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall



Εικόνα 16. Κυκλίνη-B1



α) X100



β) X400

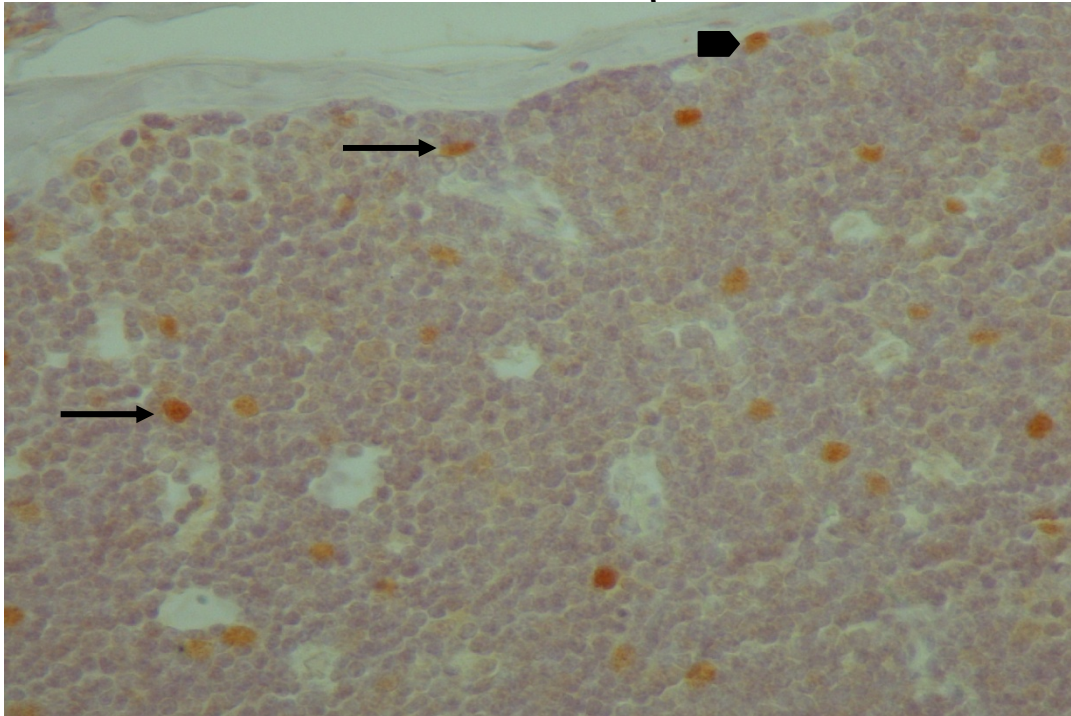
α) Βέλος: Σπάνια ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής περιοχής

Αστέρι: Ανοσοαρνητικά σωμάτια Hassall

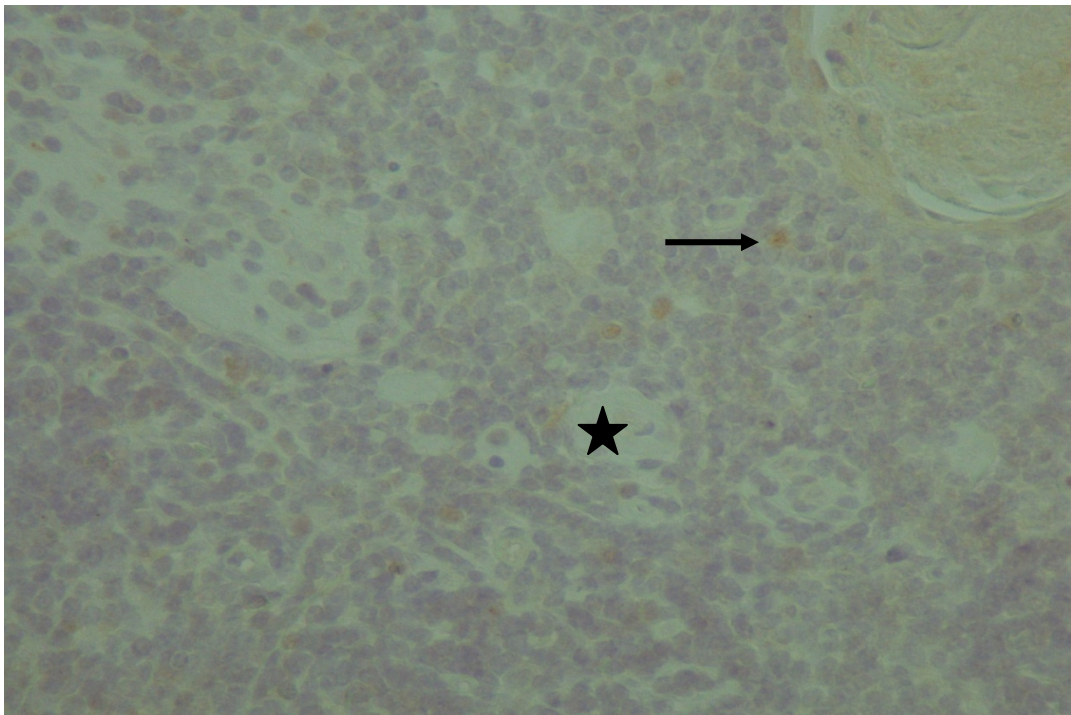
β) Βέλος: Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοικής ζώνης

Κεφαλή βέλους: Ανοσοθετικά υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα

Εικόνα 17. Κυκλίνη-Ε



α) X400

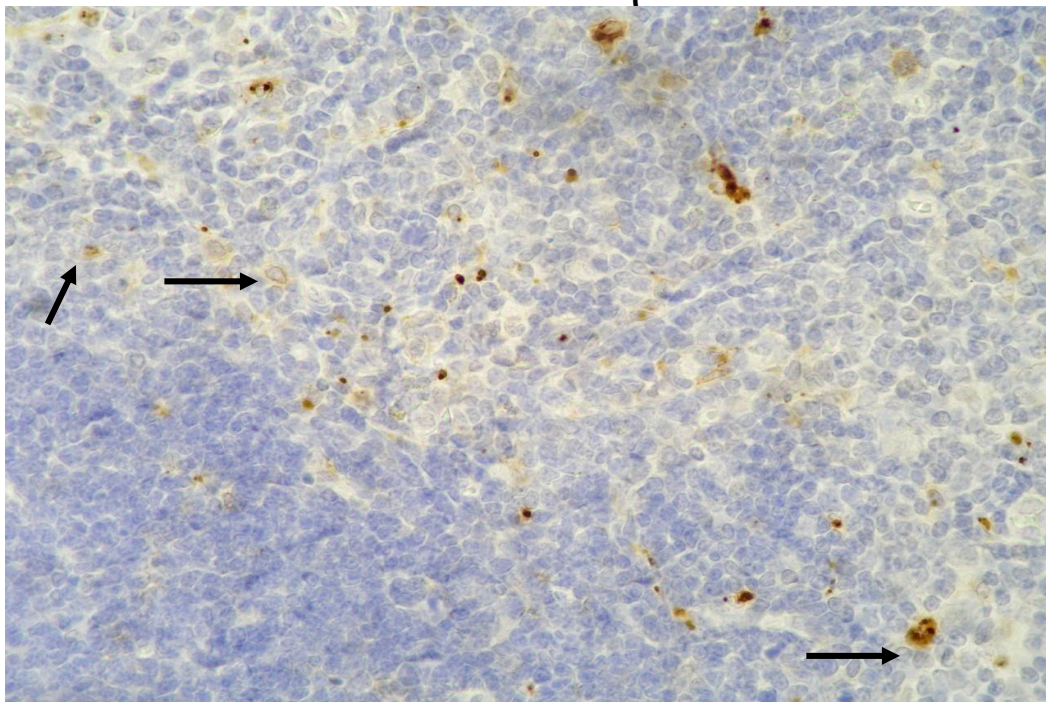


β) X400

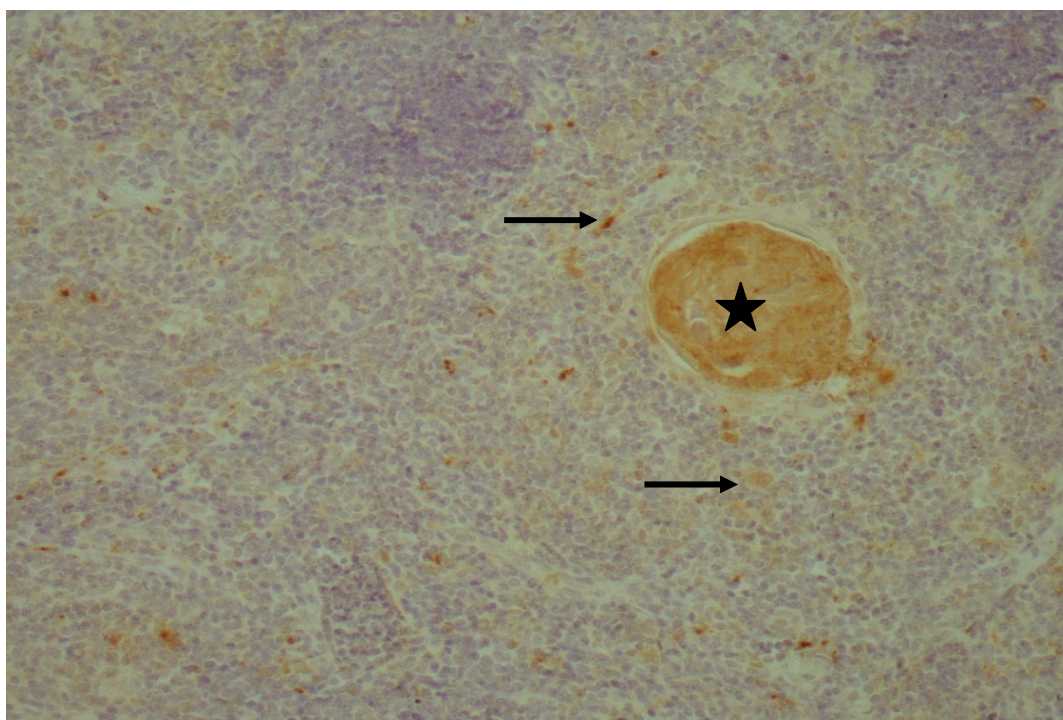
- α) **Βέλη:** Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελού  
**Κεφαλή βέλους:** Ανοσοθετικό υποκαψικό επιθηλιακό κύτταρο
- β) **Βέλος:** Σπάνια ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελού  
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall



**Εικόνα 18. Κυκλίνη-D2**



**α) X200**



**β) X200**

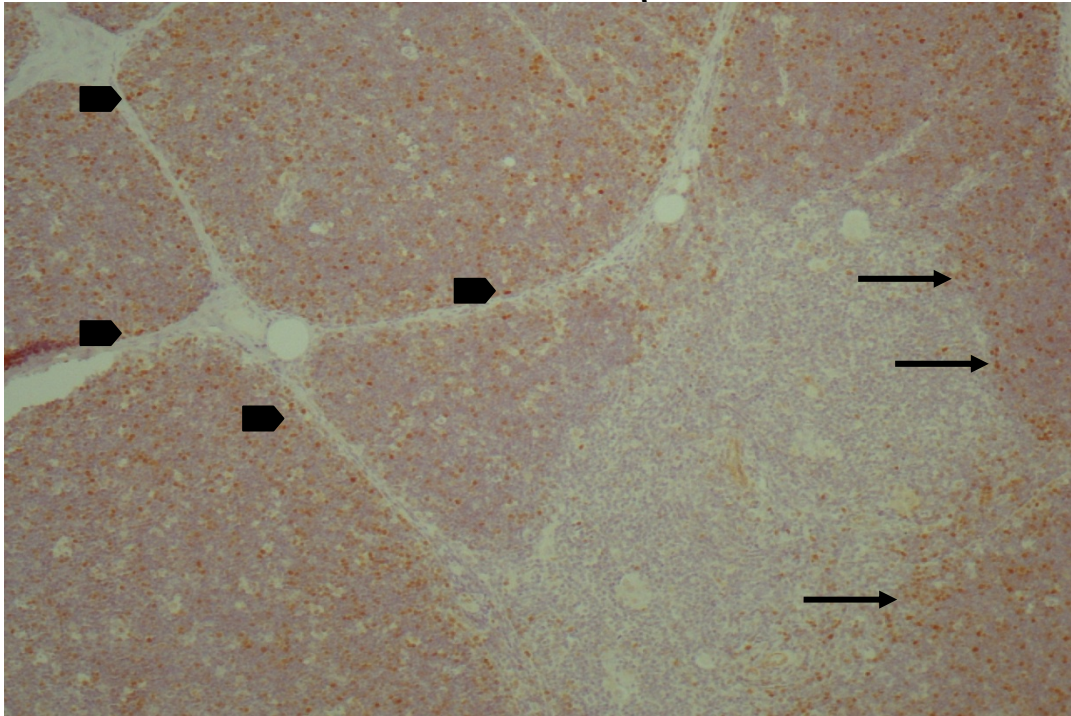
**α) Βέλη:** Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιομυελικού ορίου

**β) Βέλη:** Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελού

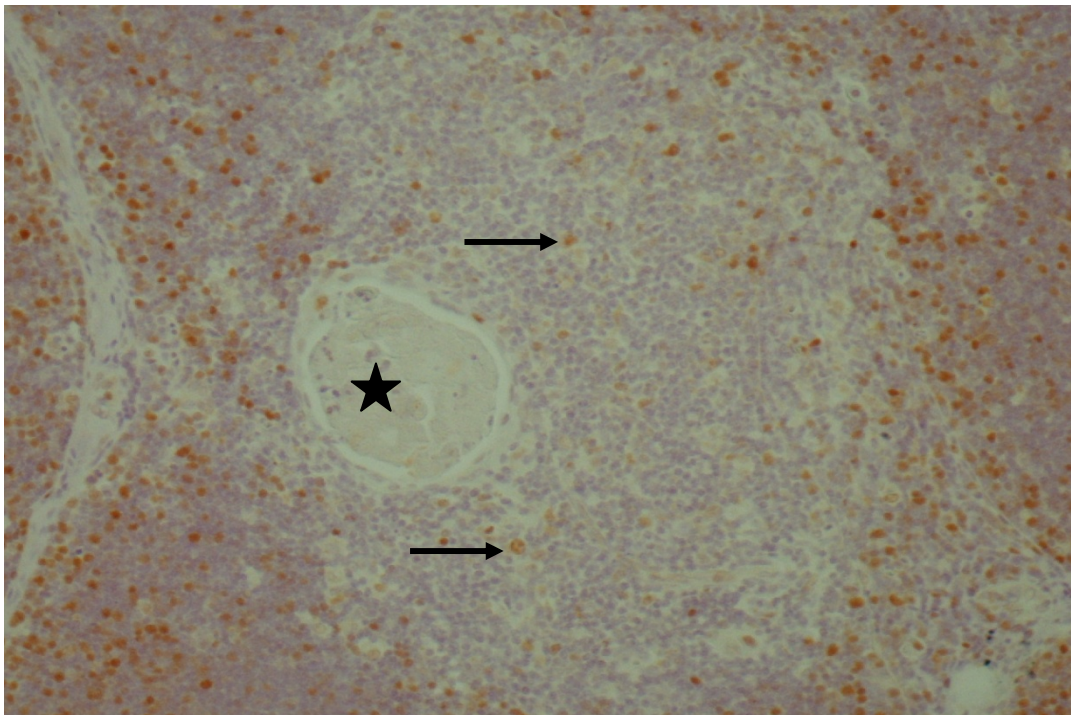
**Αστέρι:** Σωμάτιο Hassall ανοσοθετικό



Εικόνα 19. Κυκλίνη-D3



α) X100



β) X200

- α) **Βέλη:** Ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα φλοιομυελικού ορίου  
**Κεφαλές βέλους:** Ανοσοθετικά υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα  
β) **Βέλη:** Σπάνια ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα μυελικής περιοχής  
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall

**Ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο στα θυμικά λεμφοκύτταρα (θυμοκύτταρα) (Πίνακας 4)**

**• Ανοσοϊστοχημική έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bim/BOD και bid (Πίνακας 4)**

Η πρωτεΐνη bax, παρουσιάζει παρόμοια έκφραση με αυτή της πρωτεΐνης bid. Δηλαδή, παρουσιάζει έκφραση σε υψηλό ποσοστό (50-100%) στα θυμικά λεμφοκύτταρα και των δύο ζωνών του αδένου. **(εικόνα 20)**

Η πρωτεΐνη bak δεν παρουσιάζει έκφραση στα θυμοκύτταρα τόσο στο φλοιό, όσο και στο μυελό. **(εικόνα 21)**

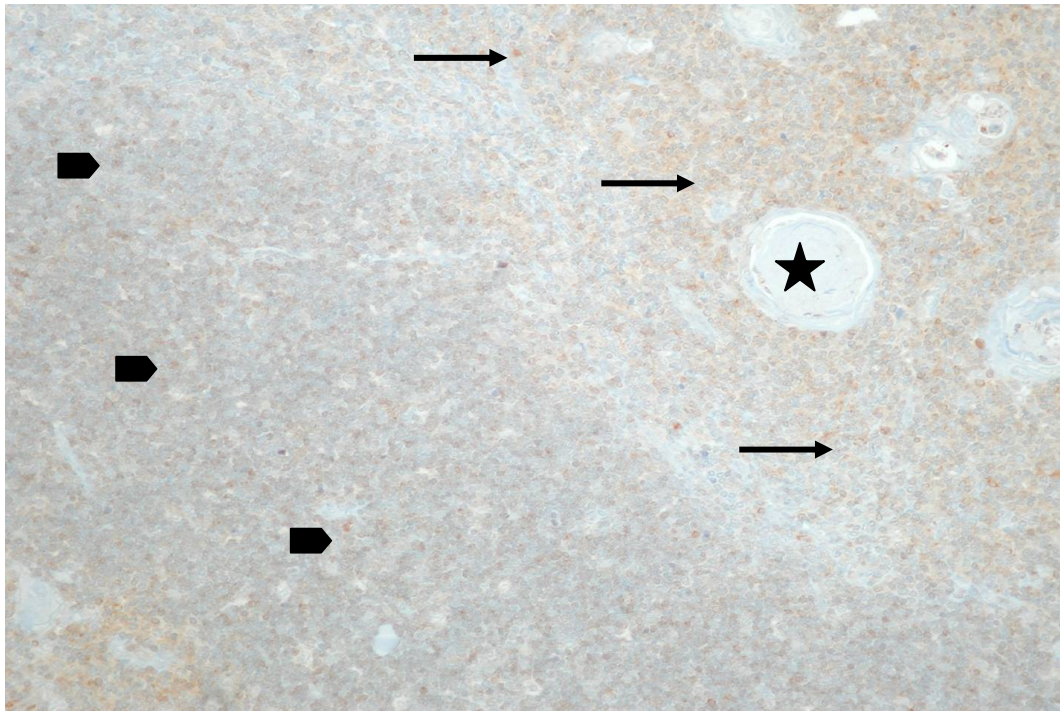
Η έκφραση της πρωτεΐνης bad απουσιάζει από τα λεμφοκύτταρα του θύμου αδένου και στις δύο περιοχές αυτού (φλοιός και μυελός). **(εικόνα 22)**

Η πρωτεΐνη bim/BOD, στη φλοιώδη ζώνη εκφράζεται σε μεμονωμένα θυμοκύτταρα. Στη μυελώδη ζώνη, τα ανοσοθετικά κύτταρα είναι σαφώς περισσότερα και φθάνουν μέχρι και μέτρια σε αριθμό (25-50%). Περισσότερο έντονη είναι η έκφραση της πρωτεΐνης σε θυμοκύτταρα της φλοιομυελικής περιοχής. **(εικόνα 23)**

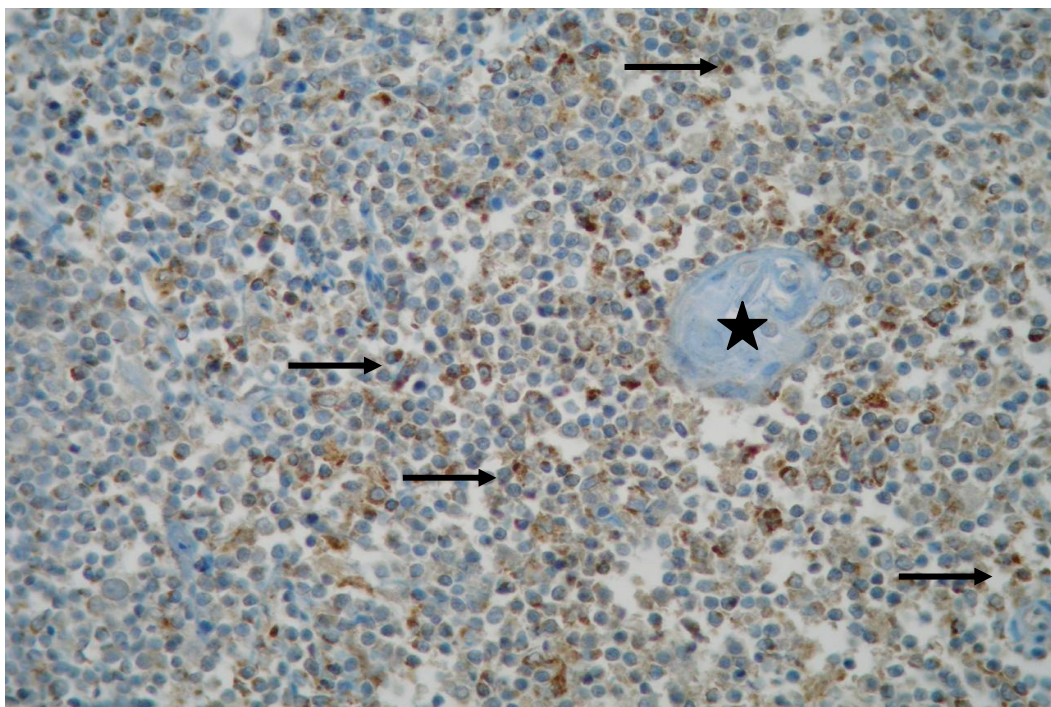
Η πρωτεΐνη bid εκφράζεται στα θυμοκύτταρα και των δύο ιστολογικών περιοχών του οργάνου (φλοιός και μυελός) με ασθενή όμως ανοσοχρώση. Ωστόσο όμως, το ποσοστό των ανοσοθετικών κυττάρων είναι υψηλό (50-100%) και στις δύο περιοχές. **(εικόνα 24)**



Εικόνα 20. Βαχ



α) X40

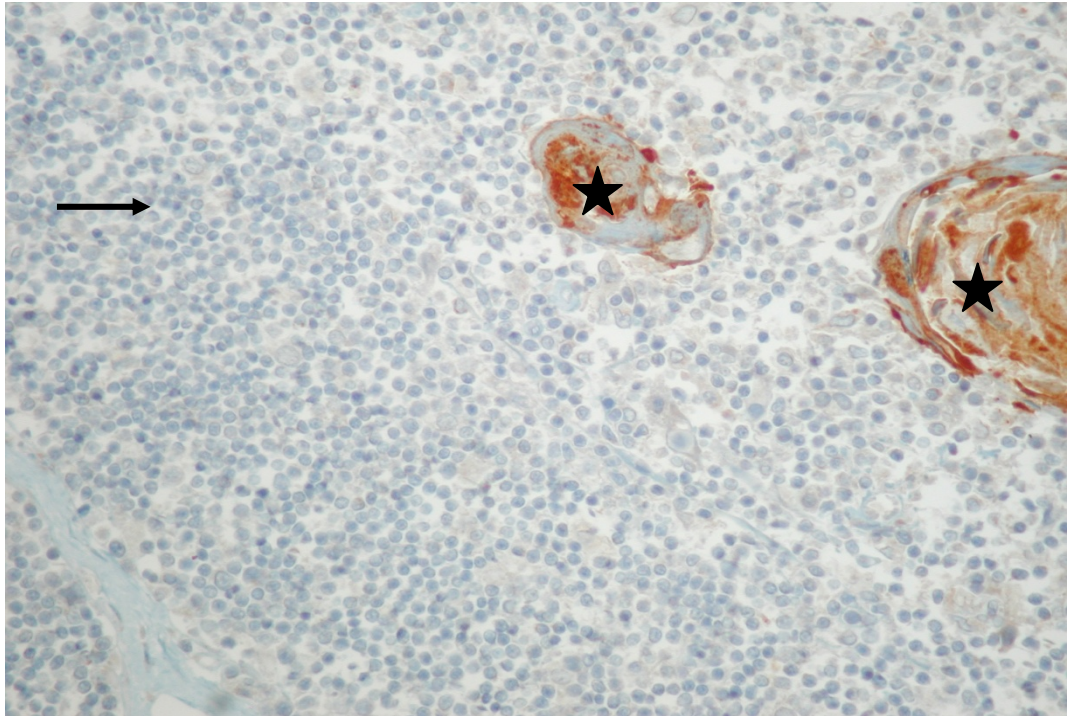


β) X400

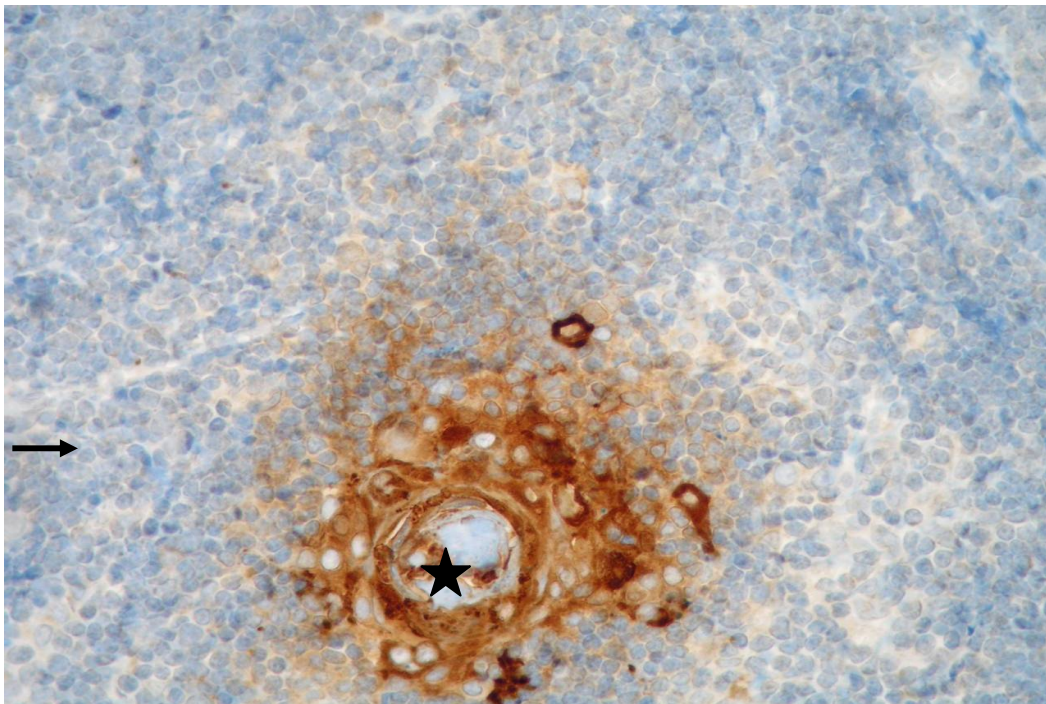
- α) **Βέλη:** Ανοσοθετικά μυελικά θυμοκύτταρα  
**Κεφαλές βέλους:** Ανοσοθετικά φλοιικά λεμφοκύτταρα  
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall
- β) **Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελικής ζώνης  
**Αστέρι:** Ανοσοαρνητικό σωματίο Hassall



Εικόνα 21. Bak



α) X400

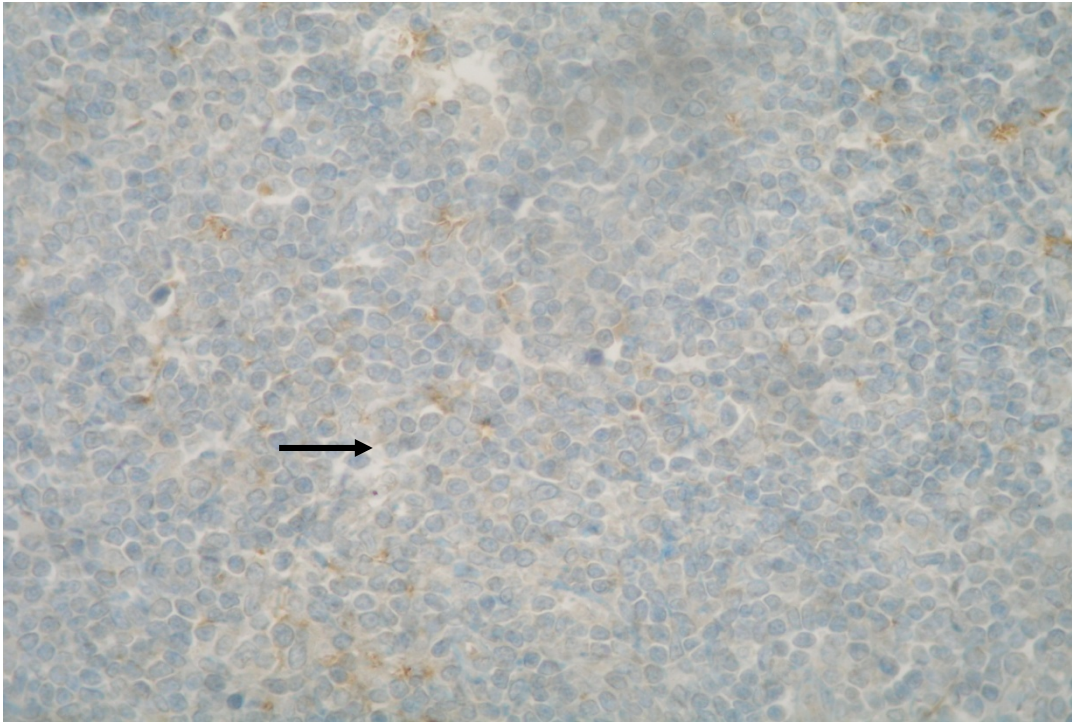


β) X400

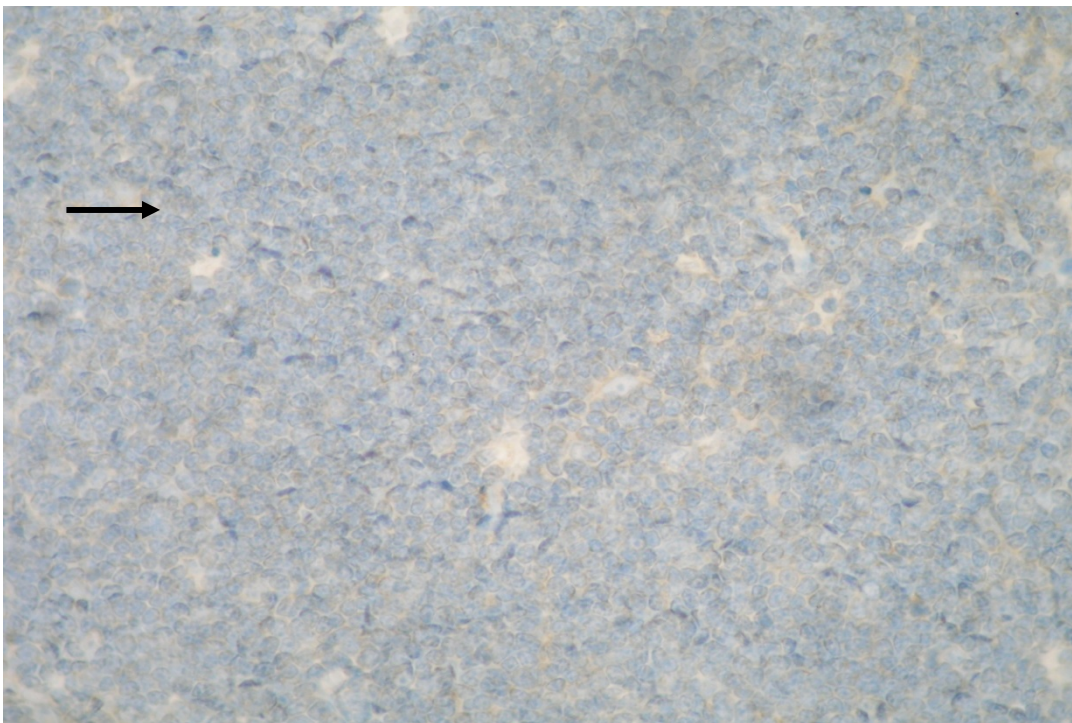
- α) Βέλος: Αρνητική ανοσοέκφραση στα θυμοκύτταρα του φλοιού  
Αστέρια: Ανοσοαρνητικά σωματίδια Hassall
- β) Βέλος: Αρνητική ανοσοέκφραση στα θυμοκύτταρα του μυελού  
Αστέρι: Ανοσοαρνητικό σωματίδιο Hassall



**Εικόνα 22. Bad**



**α) X400**



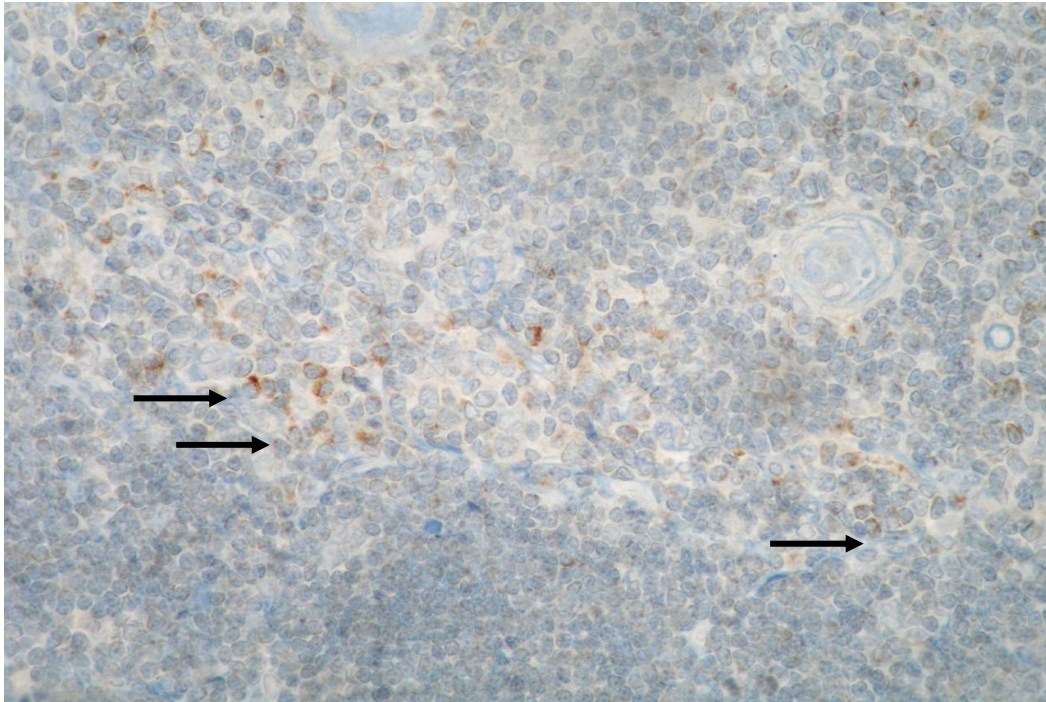
**β) X400**

**α) Βέλος:** Ανοσορρηκτικά θυμοκύτταρα μυελού

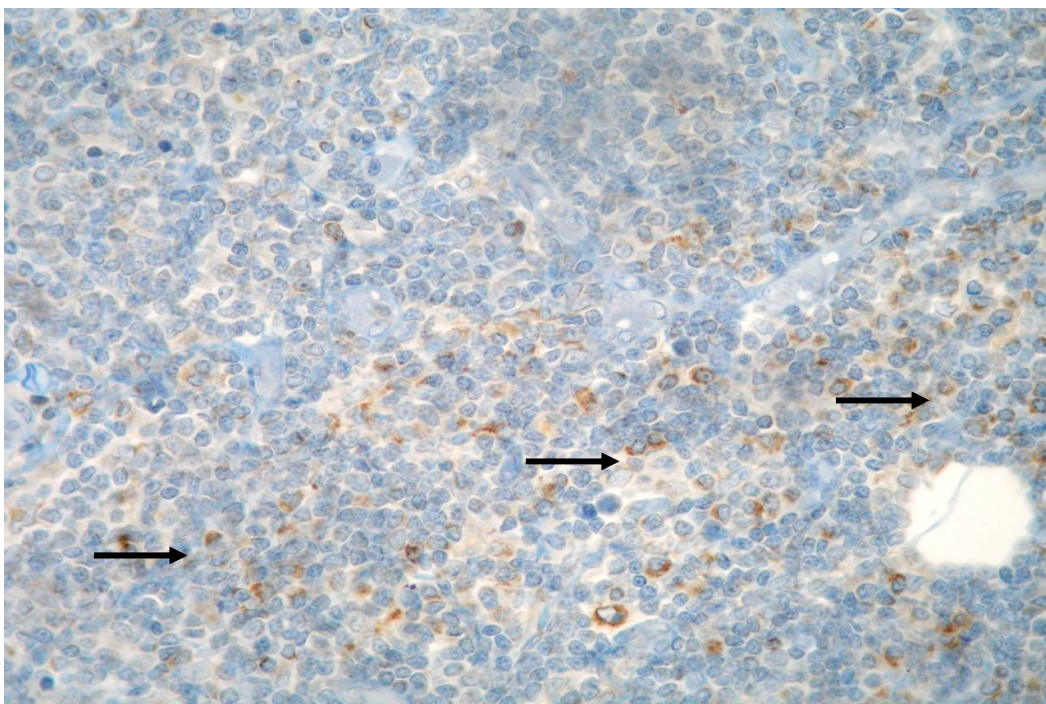
**β) Βέλος:** Ανοσοαρνητικά θυμοκύτταρα φλοιού



**Εικόνα 23. Bim/BOD**



**α) X400**



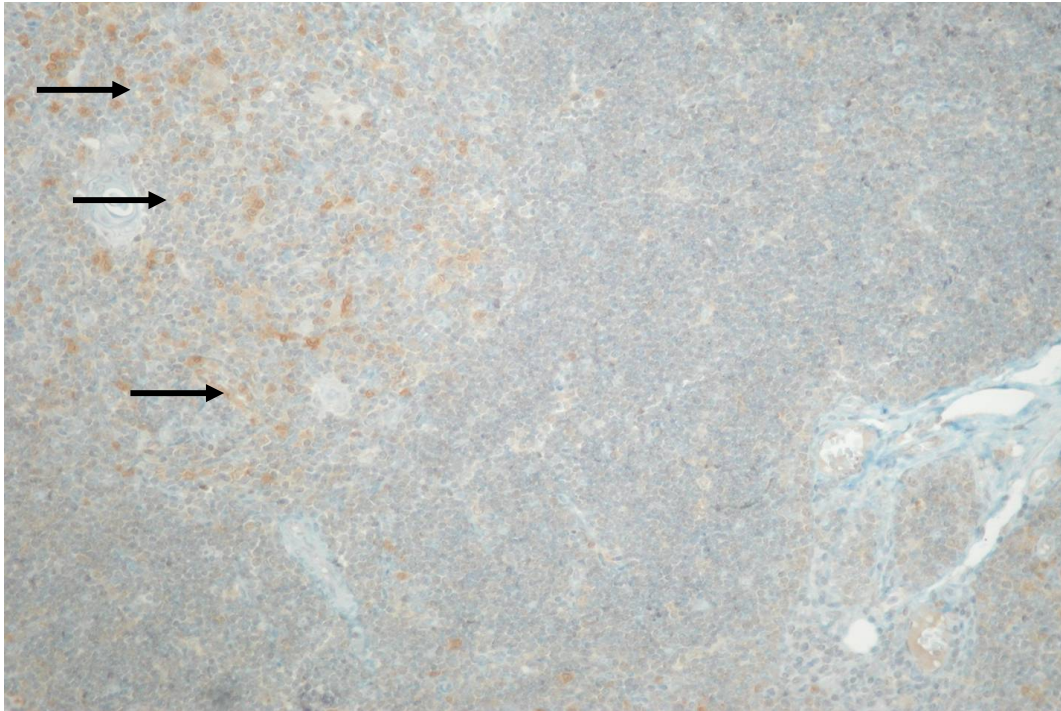
**β) X400**

**α) Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα φλοιομυελικής περιοχής

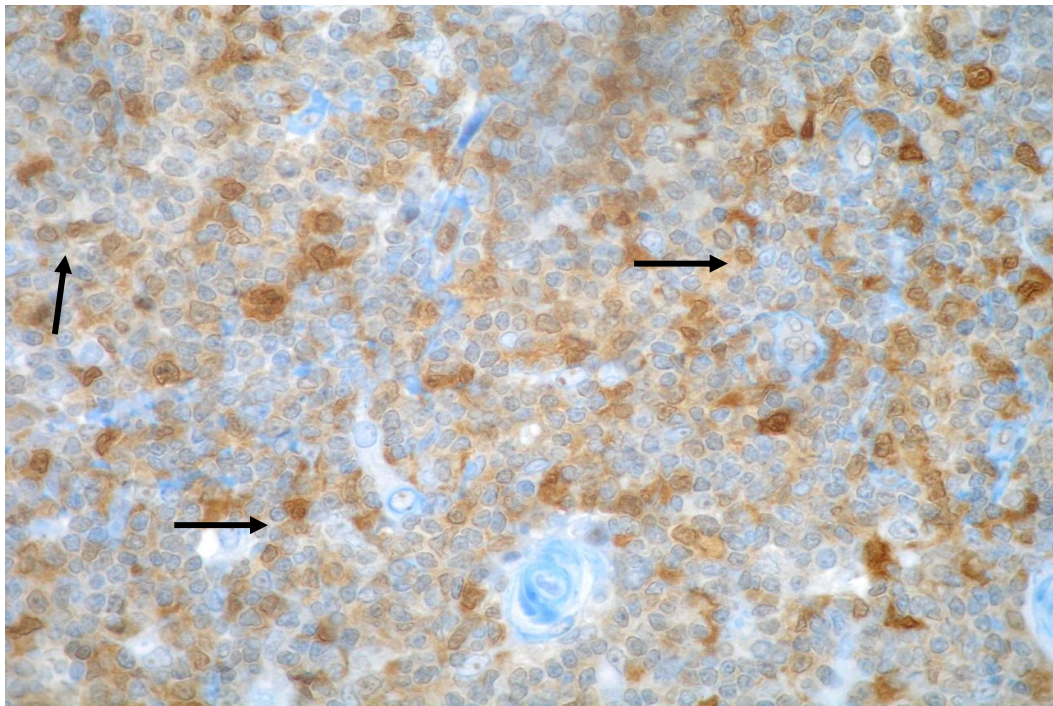
**β) Βέλη:** Ανοσοθετικά μυελικά θυμοκύτταρα



Εικόνα 24. Bid



α) X40



β) X400

- α) Βέλη: Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελού
- β) Βέλη: Ανοσοθετικά μυελικά θυμοκύτταρα

• **Ανοσοϊστοχημική έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin και FLIPs/I (Πίνακας 4)**

Η πρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα της φλοιικής περιοχής. Στο μυελό η έκφραση είναι αρκετά μεγαλύτερη καθώς μέτριος αριθμός (25-50%) θυμικών λεμφοκυττάρων εμφανίζονται ανοσοθετικά. **(εικόνα 25)**

Η πρωτεΐνη bcl-xL, παρουσιάζει υψηλή έκφραση (50-100%) στα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στη φλοιική ζώνη. Στα αντίστοιχα κύτταρα της μυελικής ζώνης η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-xL συναντάται σε σπάνια μεμονωμένα κύτταρα. **(εικόνα 26)**

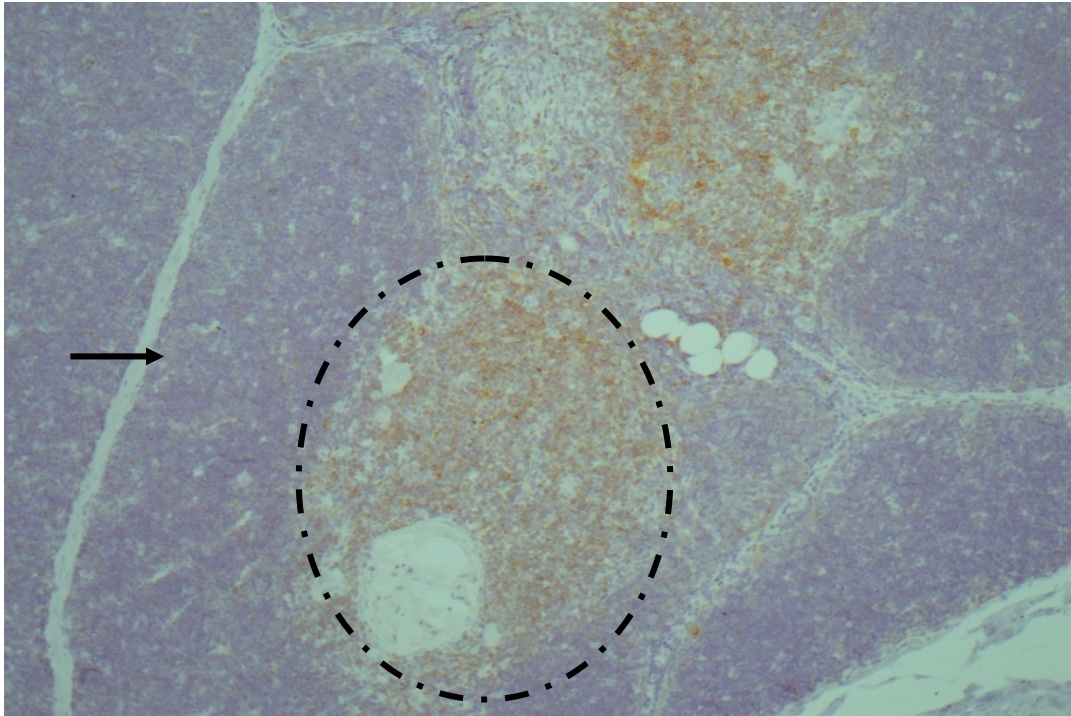
Η πρωτεΐνη mcl-1 παρουσιάζει αντιστοιχία στην έκφραση με την πρωτεΐνη bcl-2. Δηλαδή, συναντάται σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα του φλοιού, ενώ εμφανίζει μια μέτρια έκφραση (25-50%) στα θυμικά λεμφοκύτταρα του μυελού. **(εικόνα 27)**

Η έκφραση της πρωτεΐνης survivin, αναγνωρίζεται σε σπάνια μεμονωμένα θυμοκύτταρα της φλοιικής και της μυελικής ζώνης. Σε κάποιες περιπτώσεις ανοσοθετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, αναγνωρίζονται σε πολύ μικρές αθροίσεις παρακείμενα αγγείων. **(εικόνα 28)**

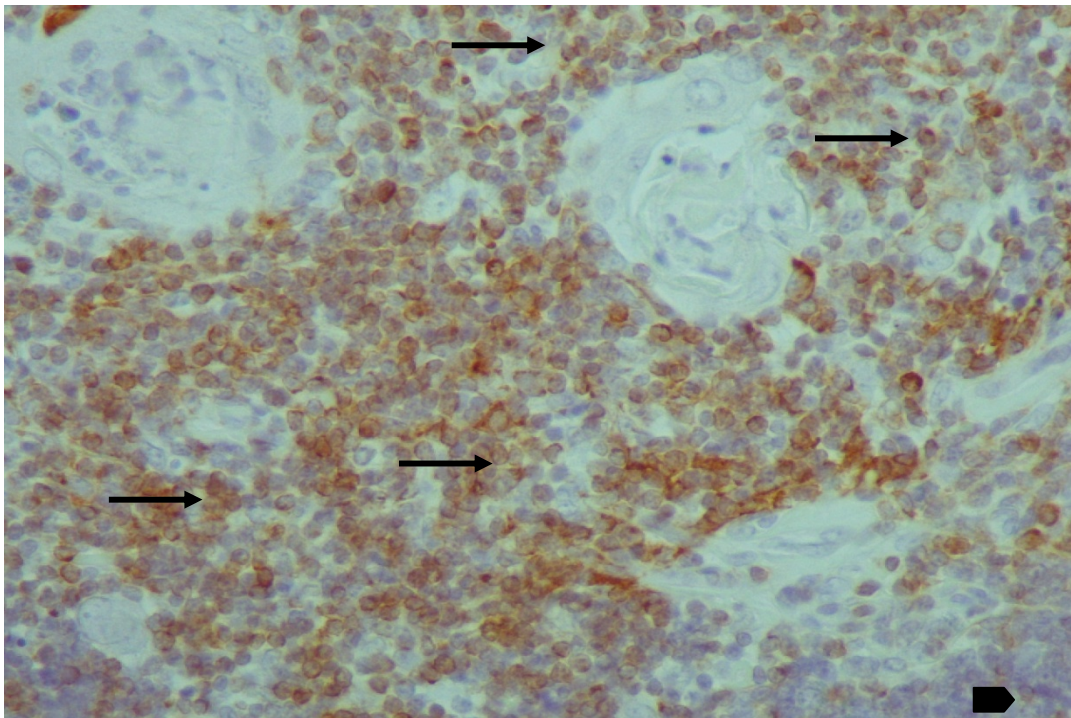
Η έκφραση της πρωτεΐνης FLIPs/I απουσιάζει από τα θυμοκύτταρα του αδένου, τόσο από την περιοχή του φλοιού, όσο και από την περιοχή του μυελού. **(εικόνα 29)**



Εικόνα 25. Bcl-2



α) X100

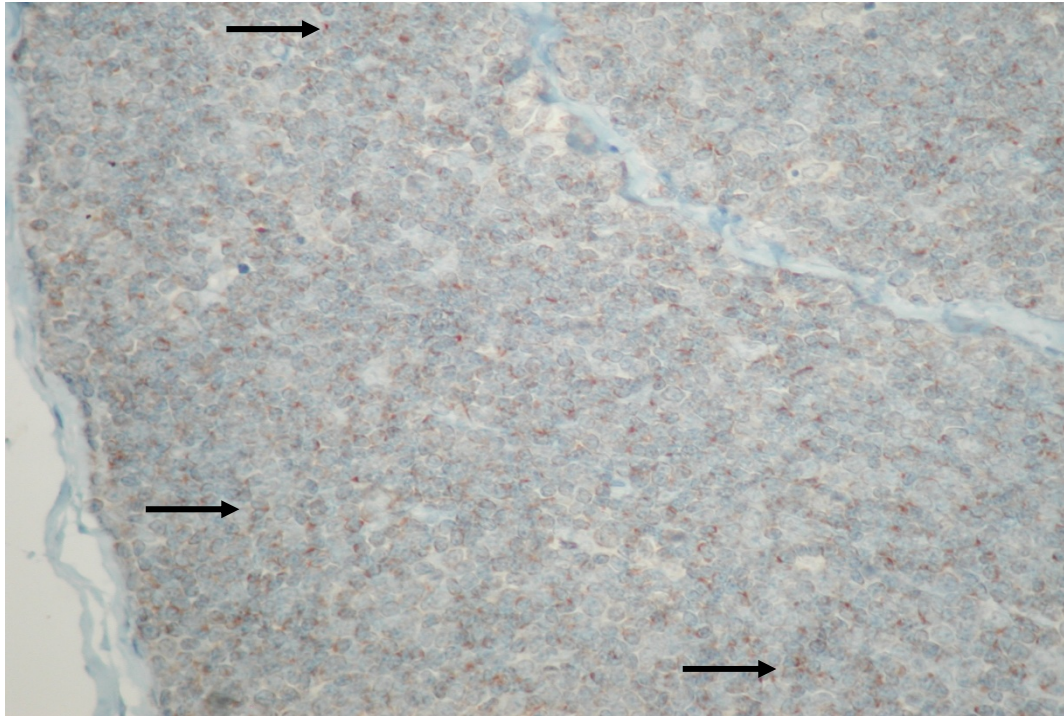


β) X400

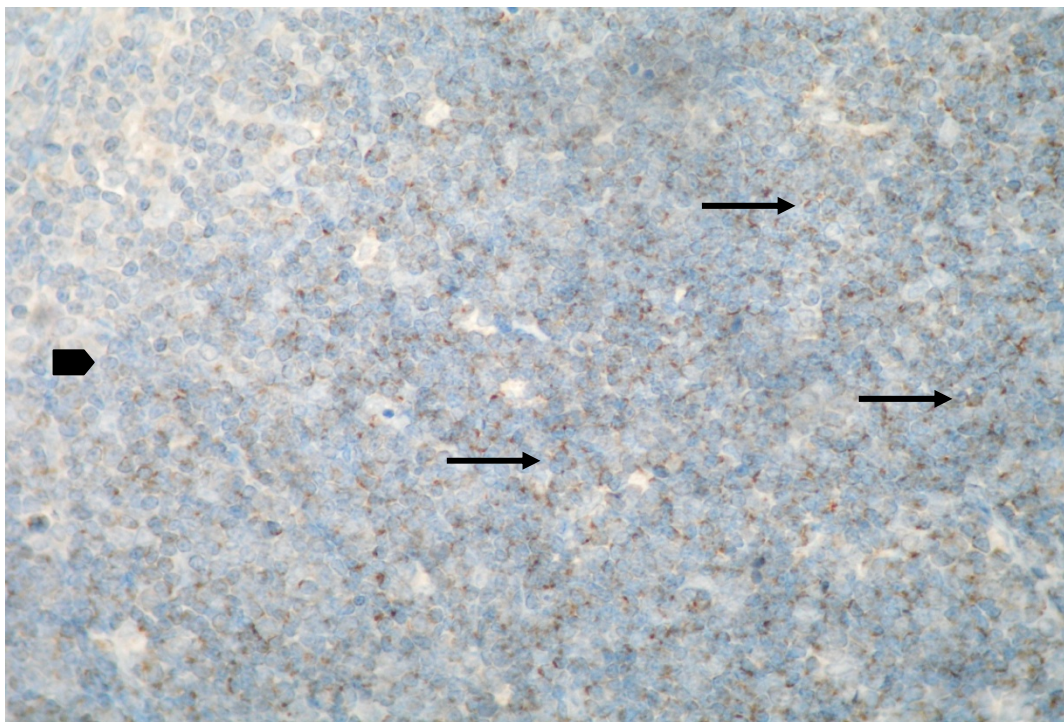
- α) **Βέλος:** Χαμηλή έκφραση στα φλοιικά θυμοκύτταρα  
Έλλειψη: περιοχή μυελού, όπου η έκφραση της πρωτεΐνης πιο έντονη
- β) **Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα της μυελικής ζώνης  
**Κεφαλή βέλους:** Ανοσοθετικό κύτταρο φλοιικής ζώνης



Εικόνα 26. Bcl-xL



α) X200



β) X200

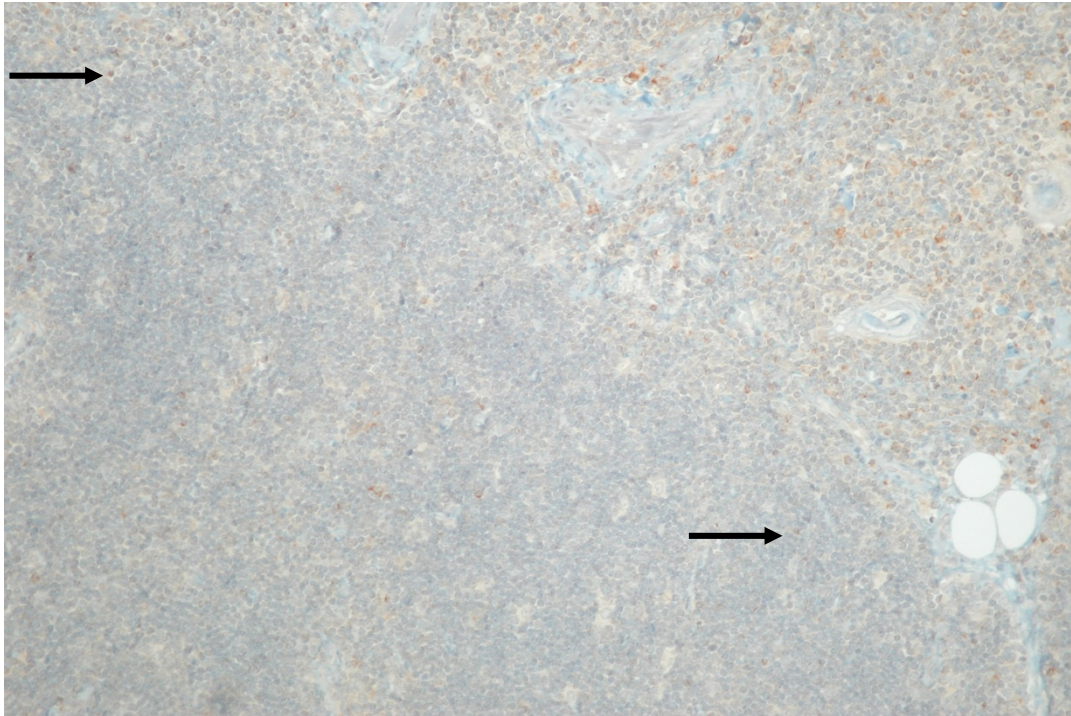
α) Βέλη: Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα της φλοιικής περιοχής

β) Βέλη: Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα της φλοιικής περιοχής

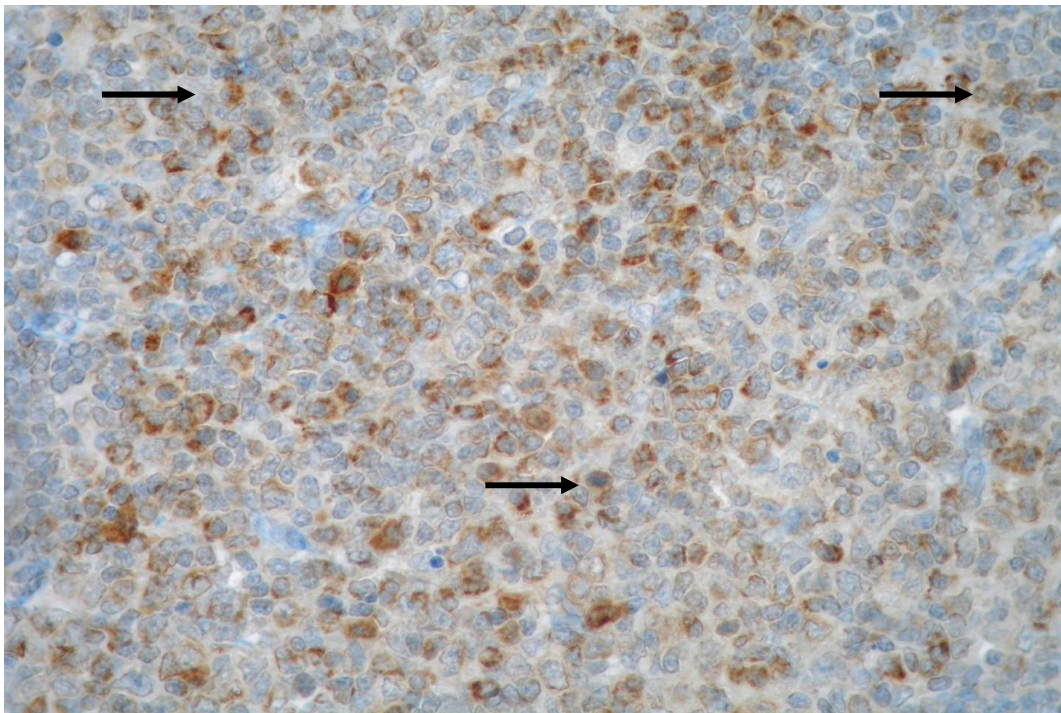
Κεφαλή βέλους: Σπάνια ανοσοθετικά κύτταρα μυελικής περιοχής



Εικόνα 27. Mcl-1



α) X100

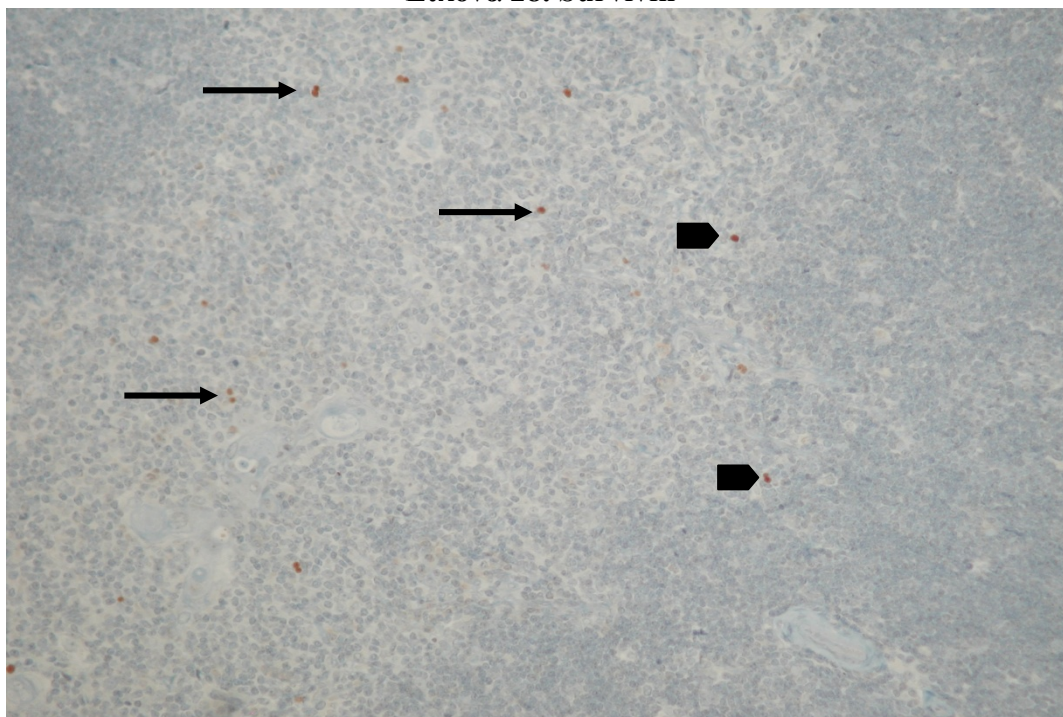


β) X400

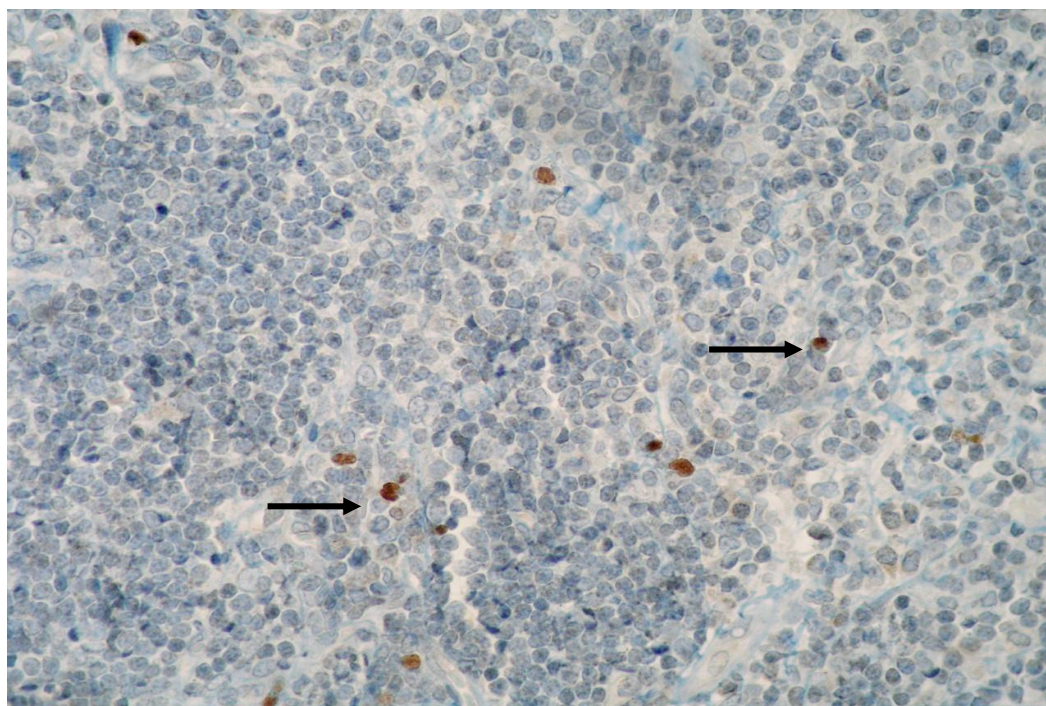
- α) Βέλη: Μεμονωμένα ανοσοθετικά φλοιικά θυμοκύτταρα
- β) Βέλη: Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελικής ζώνης



**Εικόνα 28. Survivin**



**α) X40**

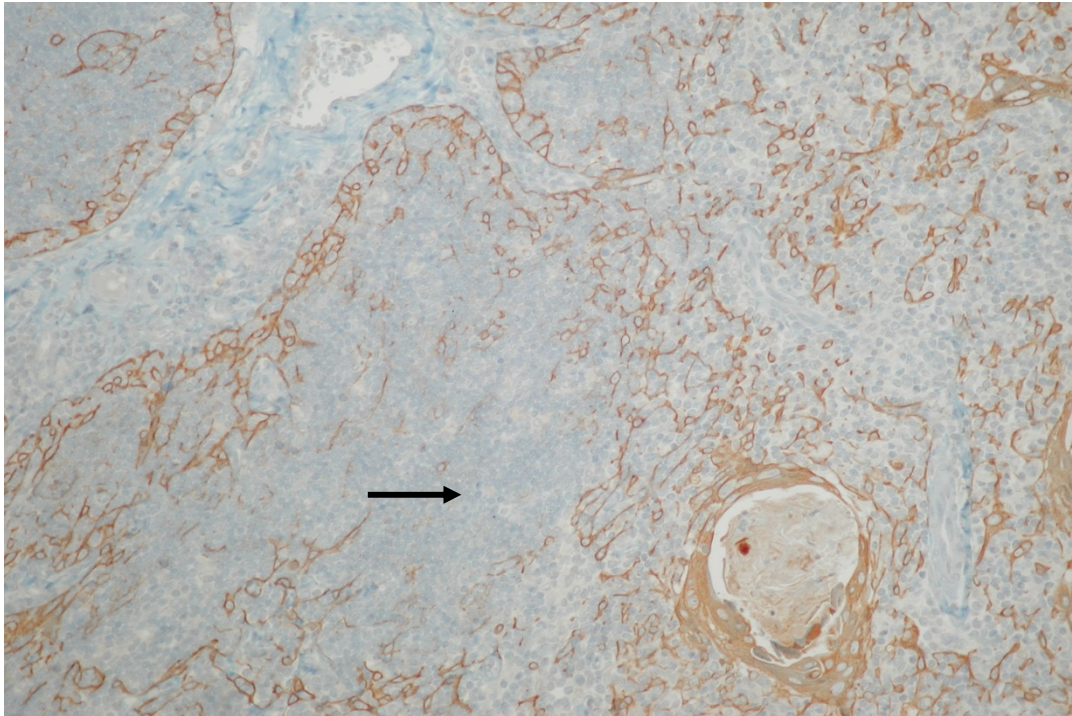


**β) X200**

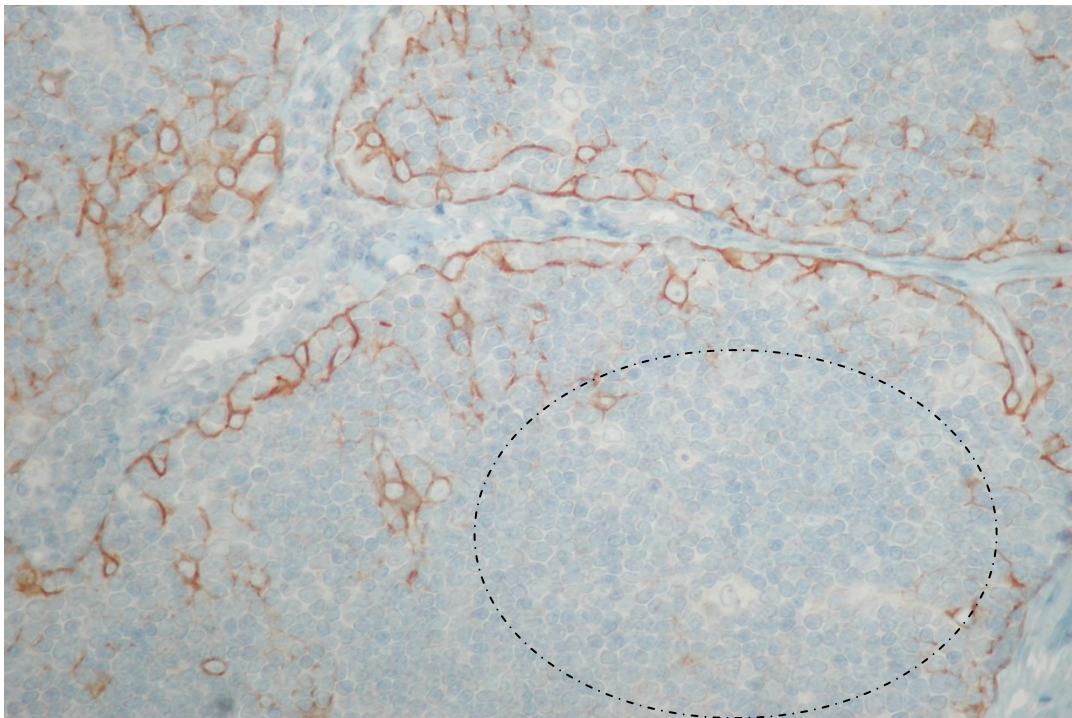
- α) Βέλος:** Μεμονωμένα ανοσοθετικά θυμοκύτταρα στη μυελική ζώνη  
**Κεφαλές βέλους:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα στη φλοιομυελική περιοχή  
**β) Βέλος:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα στη μυελική μοίρα



Εικόνα 29. FLIP<sub>S/L</sub>



α) X100



β) X200

- α) Βέλος: Απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης στα φλοιικά θυμοκύτταρα  
β) Έλλειψη: απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης στα θυμοκύτταρα του φλοιού



- **Ανοσοϊστοχημική έκφραση του υποδοχέα θανάτου Fas/CD95 και του συνδέτη του FasL (Πίνακας 4)**

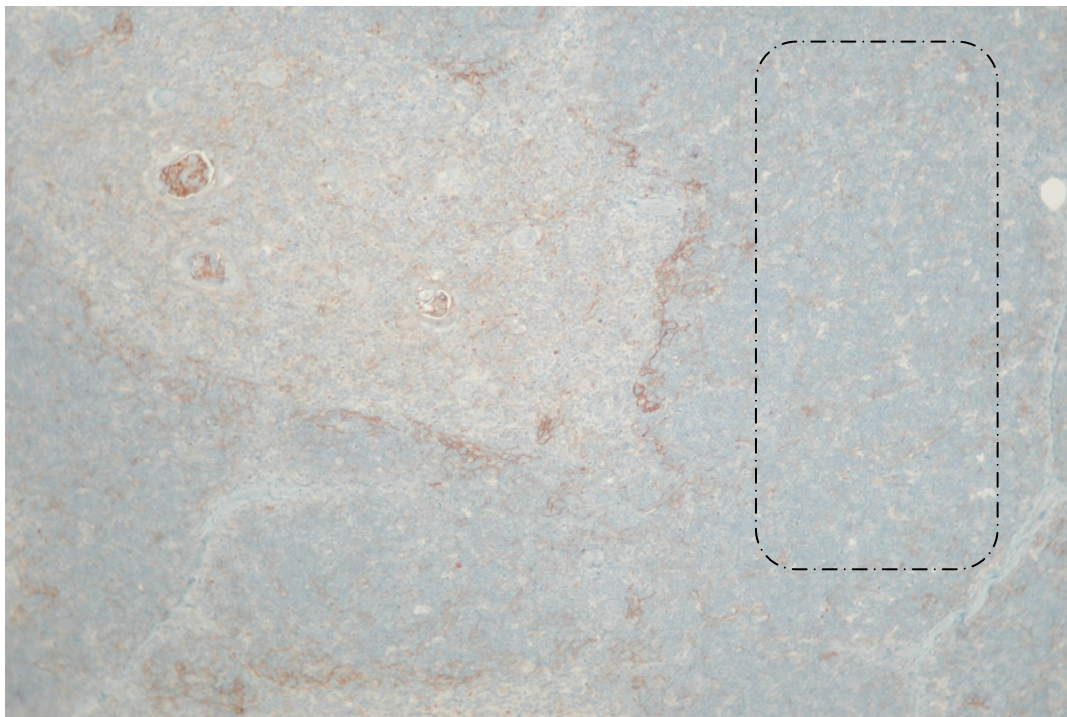
Αμφότεροι, ο υποδοχέας θανάτου Fas/CD95 και ο συνδέτης αυτού (FasL), δεν παρουσιάζουν ανοσοϊστοχημική έκφραση στα λεμφοκύτταρα του θύμου αδένου τόσο στην περιοχή του μυελού, όσο και στην περιοχή του φλοιού. (εικόνα 30, εικόνα 31)

- **Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κασπάσης-3 και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 (Πίνακας 4)**

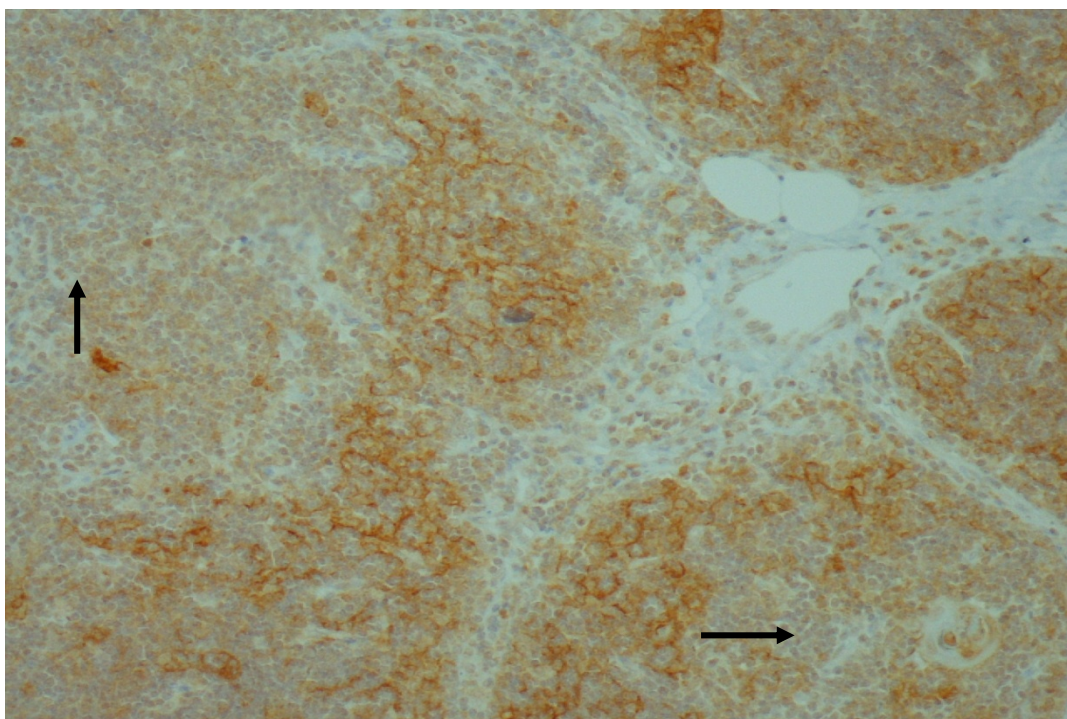
Η πρωτεΐνη κασπάση-3 εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό (50-100%) θυμικών λεμφοκυττάρων και στις δύο ζώνες του θύμου αδένου (φλοιική και μυελική).

Κύτταρα με θετική ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη ενεργοποιημένη κασπάση-3, αναγνωρίστηκαν στην περιοχή του φλοιού και στη φλοιομυελική ζώνη. Σε σπάνιες περιπτώσεις αναδείχθηκαν αποπτωτικά κύτταρα στα σωμάτια Hassall. (εικόνα 32)

Εικόνα 30. Fas



α) X40

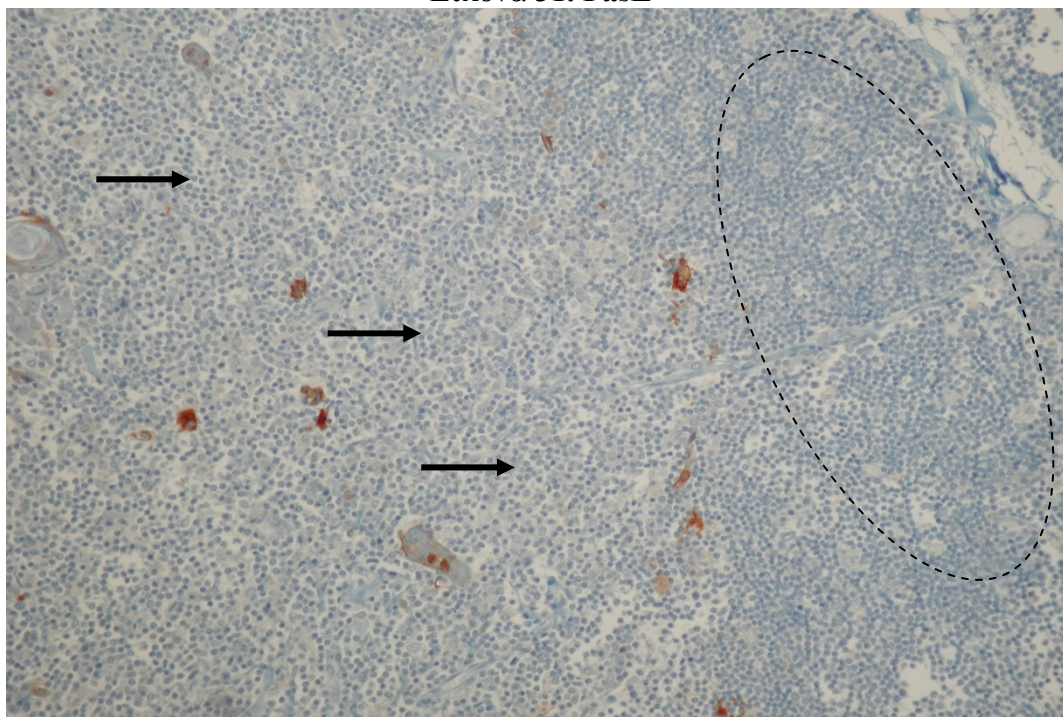


β) X100

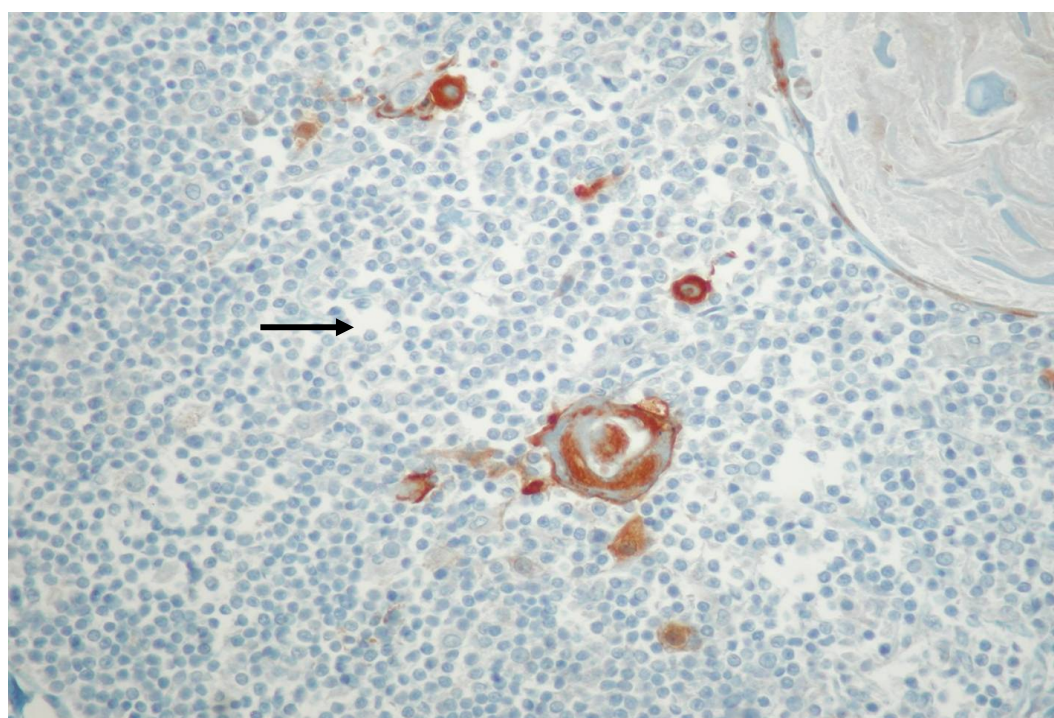
α) **Ορθογώνιο:** Περιοχή φλοιού με ανοσοαρνητικά θυμοκύτταρα  
β) **Βέλη:** Ανοσοαρνητικά μυελικά θυμοκύτταρα



**Εικόνα 31. FasL**



**α) X100**

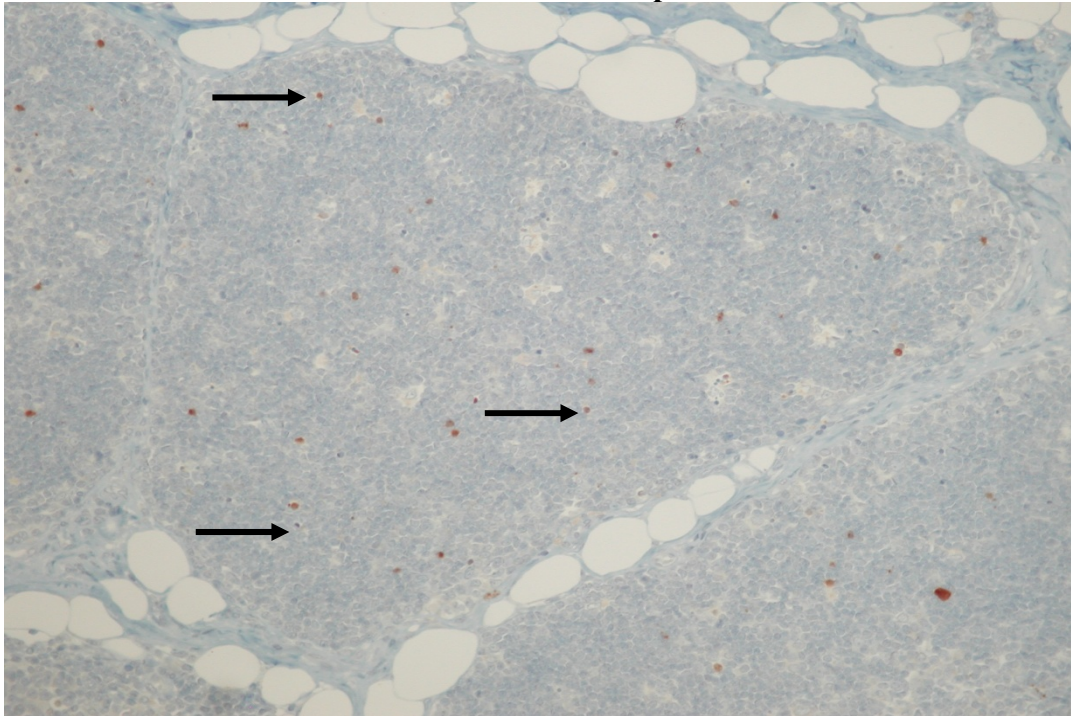


**β) X400**

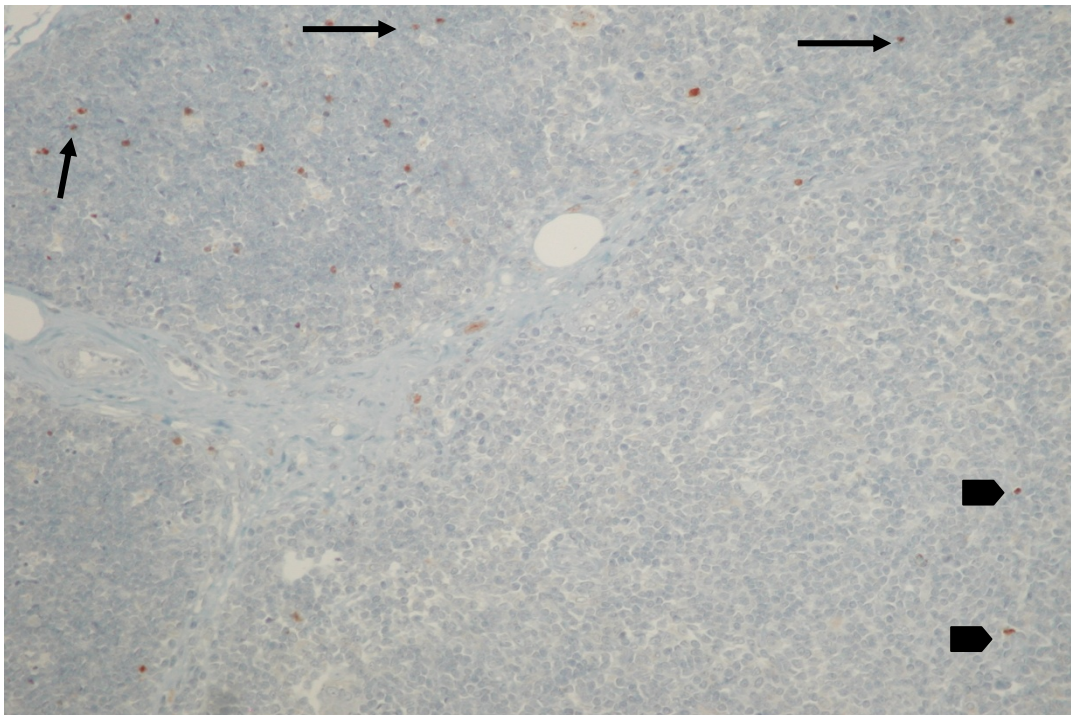
- α) Βέλος:** Ανοσοαρνητικά θυμοκύτταρα μυελικής ζώνης  
**Έλλειψη:** Περιοχή φλοιού με ανοσοαρνητικά θυμοκύτταρα  
**β) Βέλη:** Ανοσοαρνητικά θυμοκύτταρα μυελικής περιοχής



Εικόνα 32. cleaved-Caspase-3



α) X100



β) X100

α) Βέλη: Ανοσοθετικά κύτταρα στο φλοιό

β) Βέλη: Ανοσοθετικά κύτταρα στο φλοιό

Κεφαλές βέλους: Ανοσοθετικά κύτταρα στο φλοιομυελικό όριο

• **Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη-A, κυκλίνη-B1, κυκλίνη-E, κυκλίνη-D1, κυκλίνη-D2, κυκλίνη-D3 (Πίνακας 4)**

Η κυκλίνη A παρουσιάζει έκφραση τόσο στα θυμοκύτταρα του φλοιού, όσο και του μυελού, με διαφορετικά όμως ποσοστά και με μια τάση ελάττωσης της έκφρασης κατά τη διαδρομή από το φλοιό προς το μυελό. Έτσι, στη φλοιική ζώνη μέτριος αριθμός (25-50%) θυμικών λεμφοκυττάρων εμφανίζουν θετική ανοσοχρώση, ενώ στη μυελική ζώνη αυτός ο αριθμός είναι μικρός (5-25%). **(εικόνα 33)**

Η κυκλίνη B1 παρουσιάζει έκφραση κατ' αντιστοιχία με την κυκλίνη A. Ομοίως δηλαδή αναγνωρίζεται μια προοδευτικά μειούμενη έκφραση της πρωτεΐνης από την περιφέρεια προς τη μυελική περιοχή. Στη φλοιική μοίρα, εμφανίζει κυρίως έκφραση σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα, όμως σε αρκετές περιπτώσεις η έκφραση γίνεται λίγο μεγαλύτερη και φτάνει σε ένα ποσοστό ανοσοθετικών κυττάρων 5-25%. Όσον αφορά τα λεμφοκύτταρα της μυελικής μοίρας, αναγνωρίζεται έκφραση σε σπάνια μεμονωμένα κύτταρα. **(εικόνα 34)**

Η κυκλίνη E αναγνωρίζεται με τη μορφή της θετικής ανοσοχρώσης σε μεμονωμένα θυμοκύτταρα του φλοιού. Στη μυελική ζώνη η έκφρασή της είναι σχεδόν μηδενική. **(εικόνα 35)**

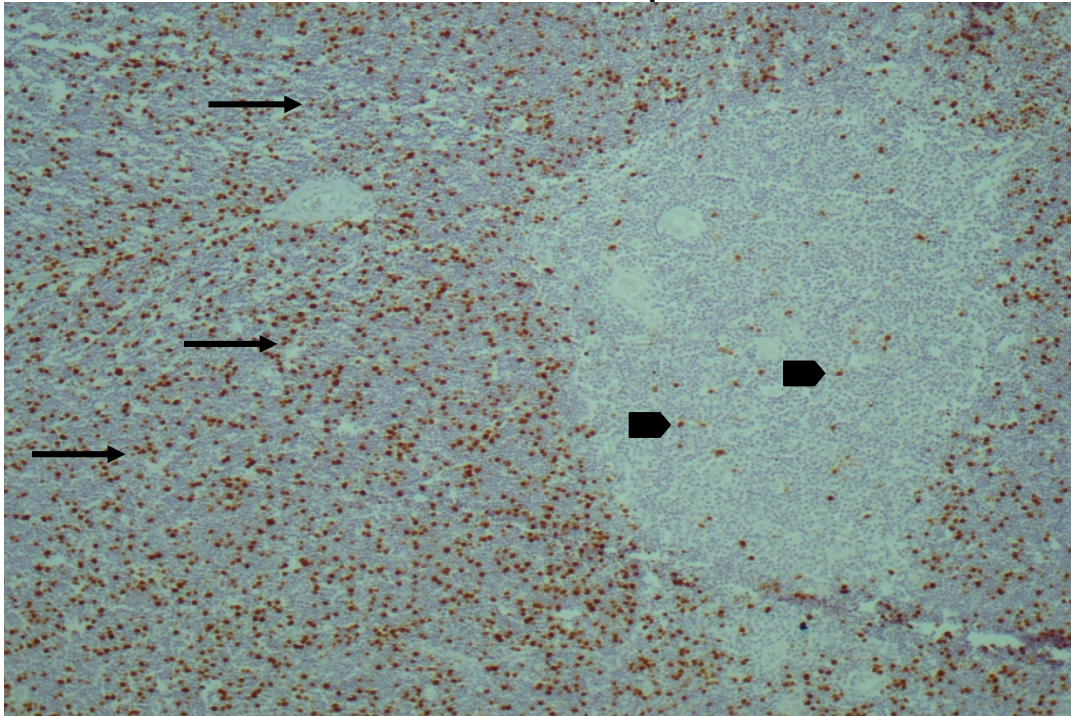
Έκφραση της κυκλίνης D1 δεν ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά στα θυμικά λεμφοκύτταρα.

Η κυκλίνη D2 εμφανίζει σπάνια μόνο έκφραση στα θυμοκύτταρα του φλοιού. Στη μυελική ζώνη τα θετικά ανοσοκύτταρα είναι λίγο αυξημένα και κατά θέσεις φτάνουν ένα μικρό ποσοστό (5-25%). **(εικόνα 36)**

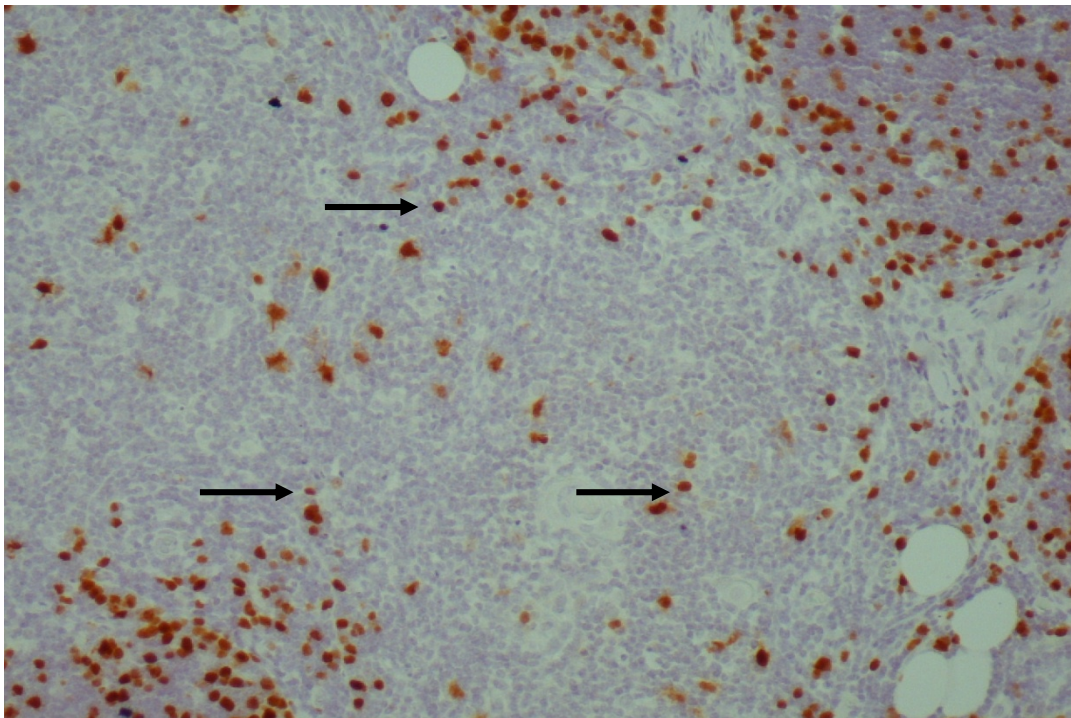
Η κυκλίνη D3 παρουσιάζει επίσης ελαττωμένη έκφραση στα θυμοκύτταρα κατά την πορεία από την περιφέρεια προς την κεντρική περιοχή (μυελός). Στη φλοιική περιοχή μέτριος αριθμός (25-50%) θυμικών λεμφοκυττάρων εμφανίζεται ανοσοθετικός στην κυκλίνη D3, ενώ στη μυελική περιοχή σπάνια μεμονωμένα κύτταρα εκφράζουν τη συγκεκριμένη κυκλίνη. **(εικόνα 37)**



Εικόνα 33. Κυκλίνη-A



α) X40

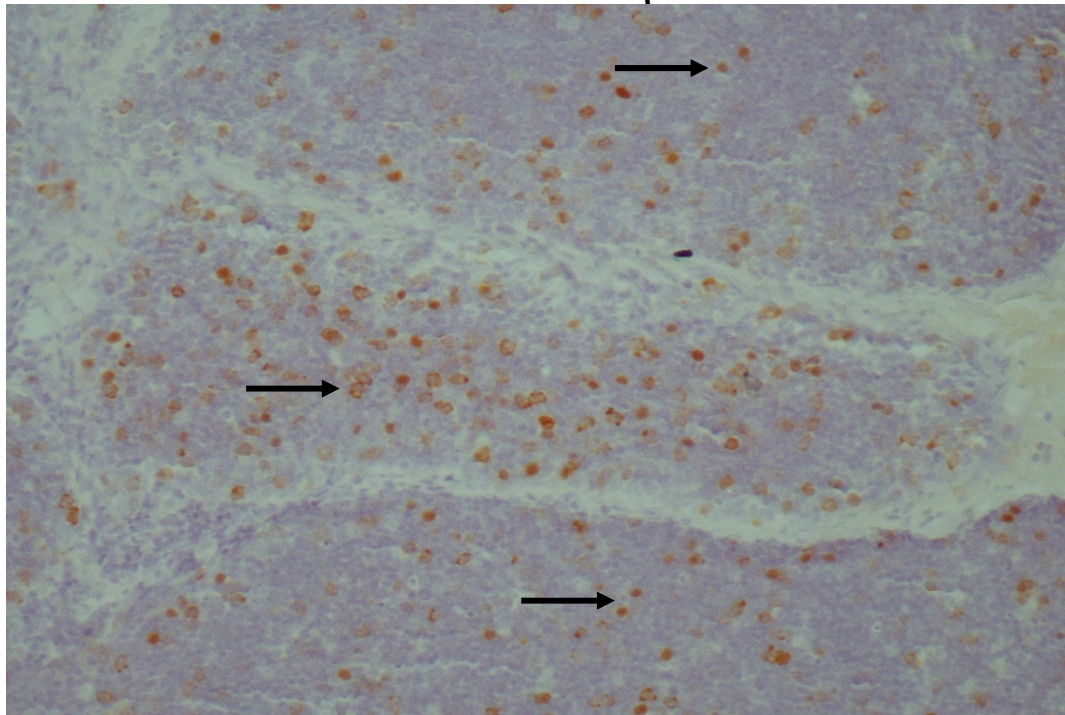


β) X100

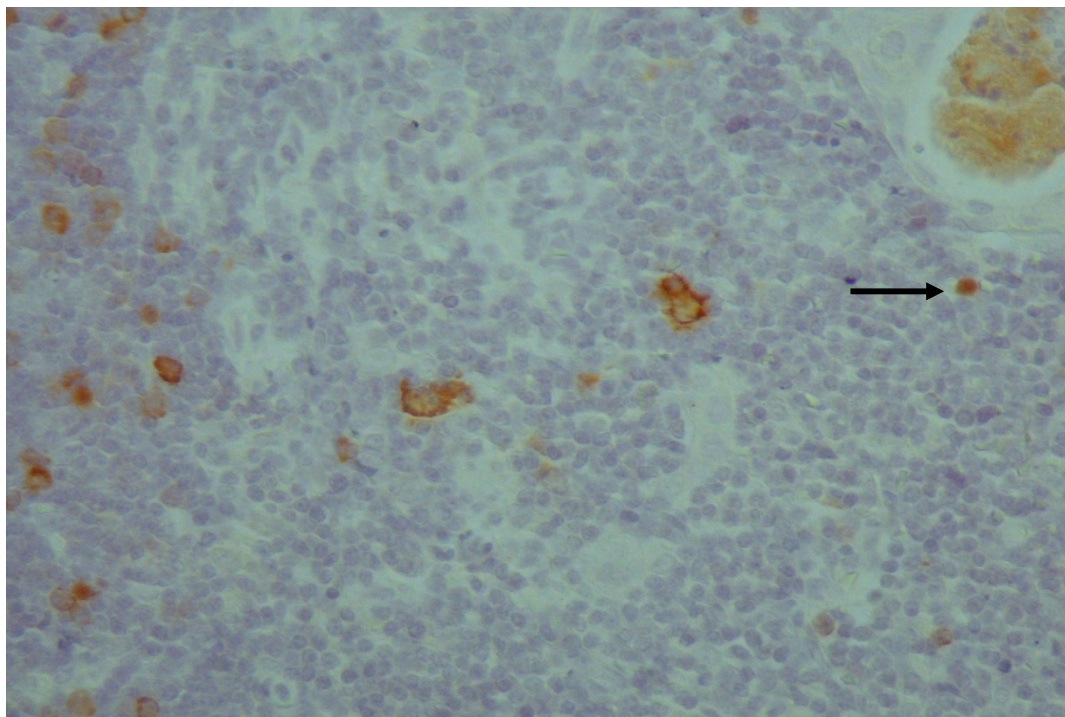
- α) **Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα φλοιικής περιοχής  
**Κεφαλές βέλους:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελικής περιοχής  
β) **Βέλος:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελικής ζώνης



**Εικόνα 34. Κυκλίνη-B1**



**α) X200**

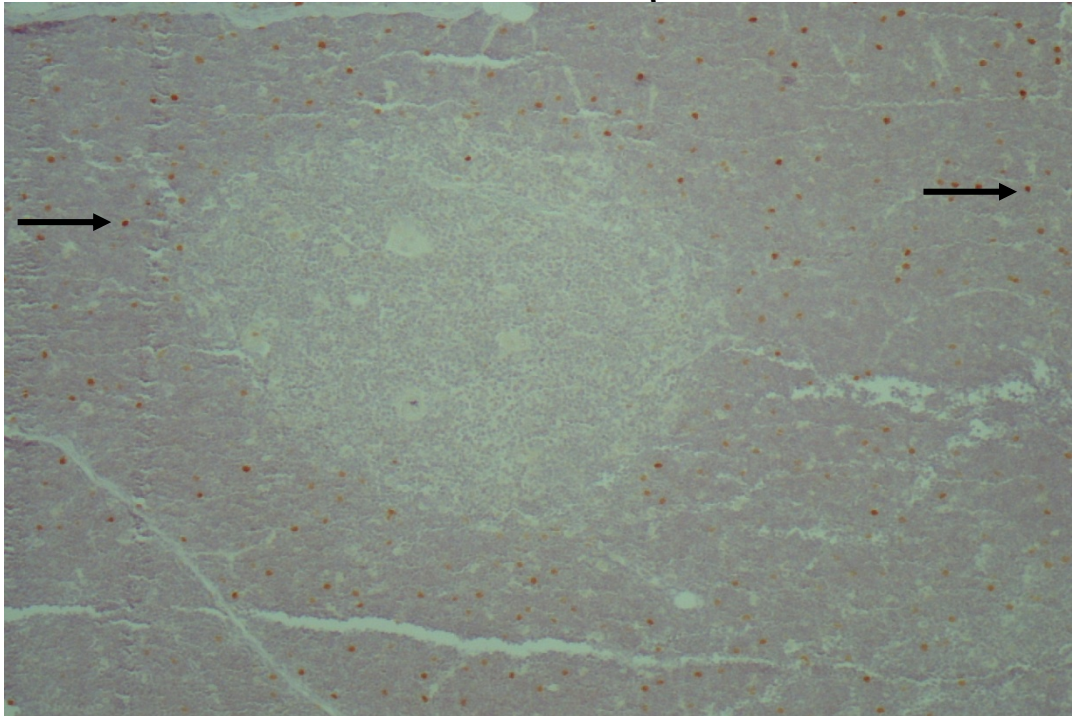


**β) X400**

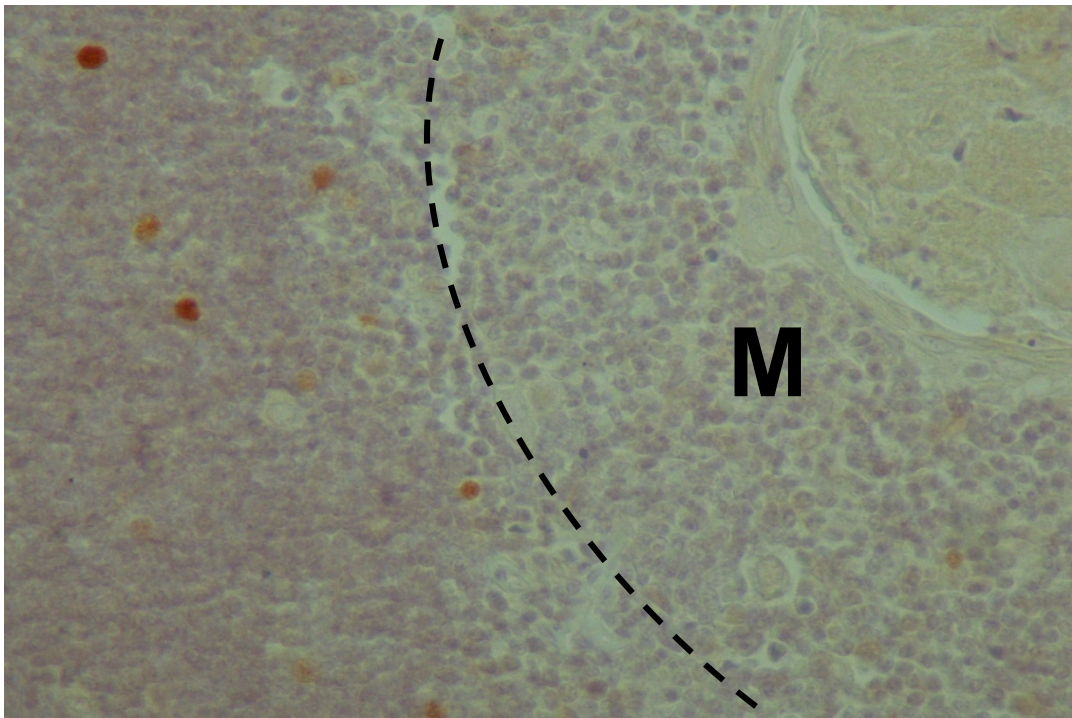
**α) Βέλη:** Ανοσοθετικότητα φλοικών θυμοκυττάρων σε πιο αυξημένο ποσοστό

**β) Βέλος:** Σπάνια μεμονωμένα ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελικής μοίρας

Εικόνα 35. Κυκλίνη-Ε



α) X40

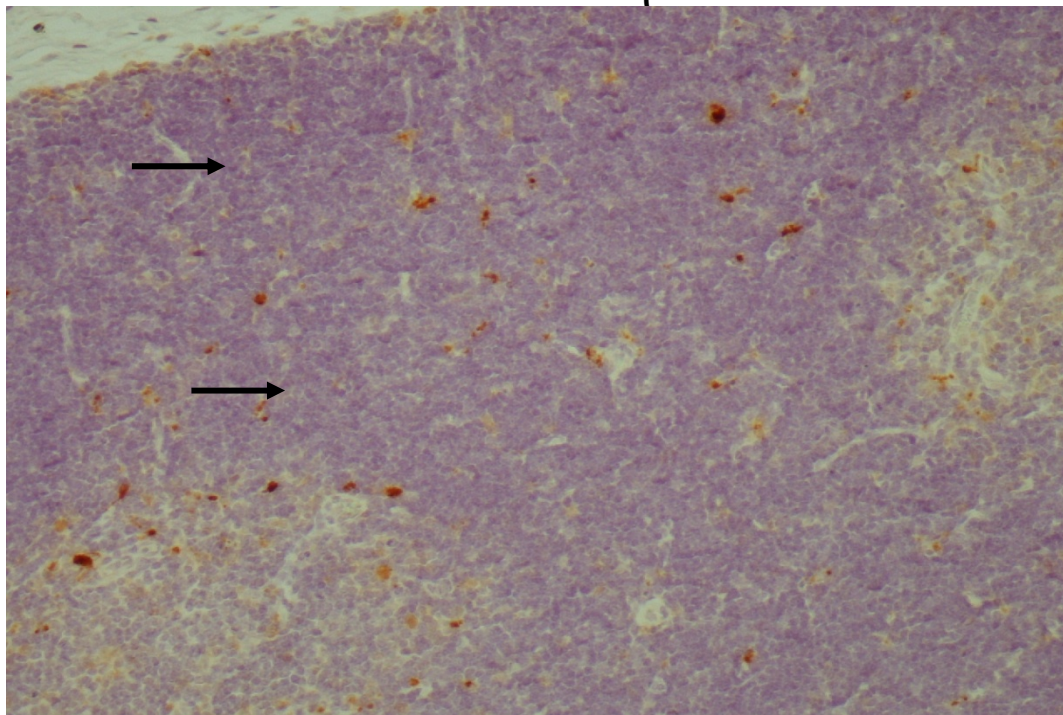


β) X400

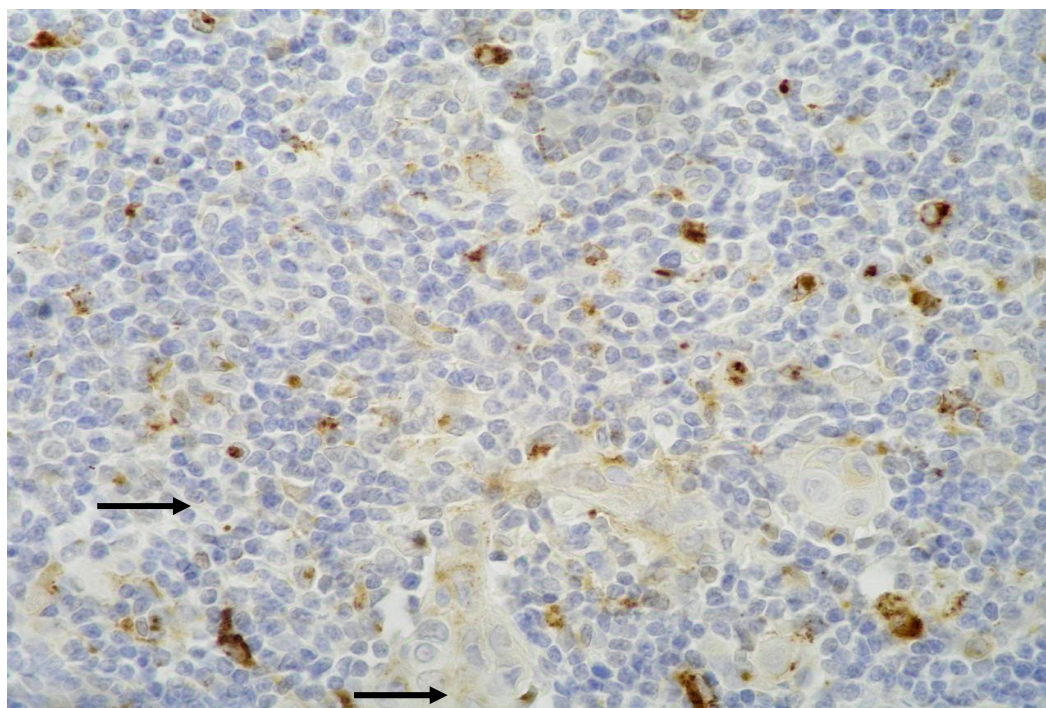
α) **Βέλος:** Μεμονωμένα ανοσοθετικά θυμοκύτταρα φλοιικής περιοχής  
β) **M:** Απουσία ανοσοέκφρασης της πρωτεΐνης στη μυελική ζώνη



**Εικόνα 36. Κυκλίνη-D2**



**α) X100**

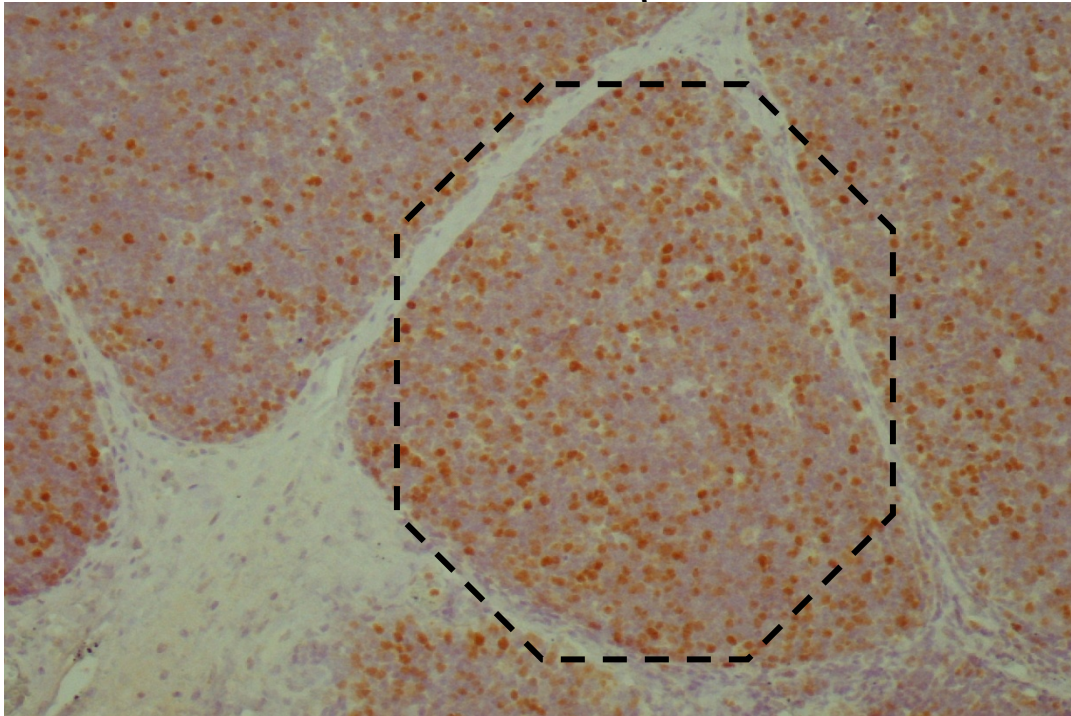


**β) 400**

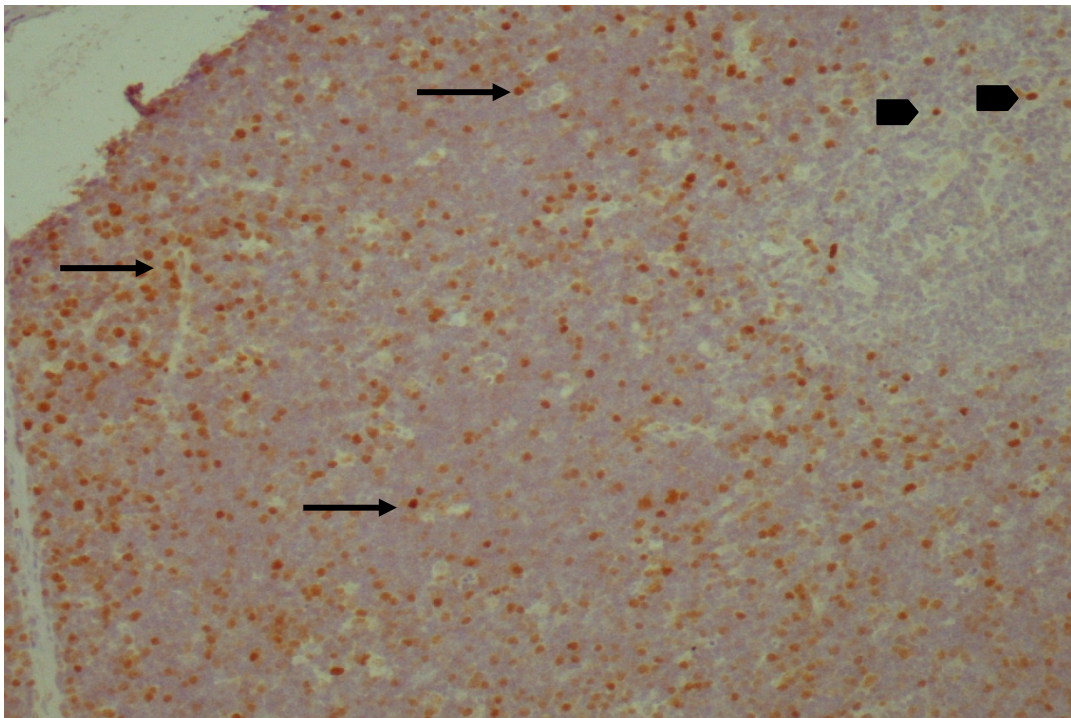
**α) Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα στη φλοιομυελική περιοχή  
**β) Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελού



Εικόνα 37. Κυκλίνη-D3



α) X40



β) X100

α) **Εξάγωνο:** φλοιική περιοχή με αυξημένη ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης στα θυμοκύτταρα

β) **Βέλη:** Ανοσοθετικά θυμοκύτταρα φλοιικής μοίρας

**Κεφαλές βέλους:** Μεμονωμένα ανοσοθετικά θυμοκύτταρα μυελικής ζώνης



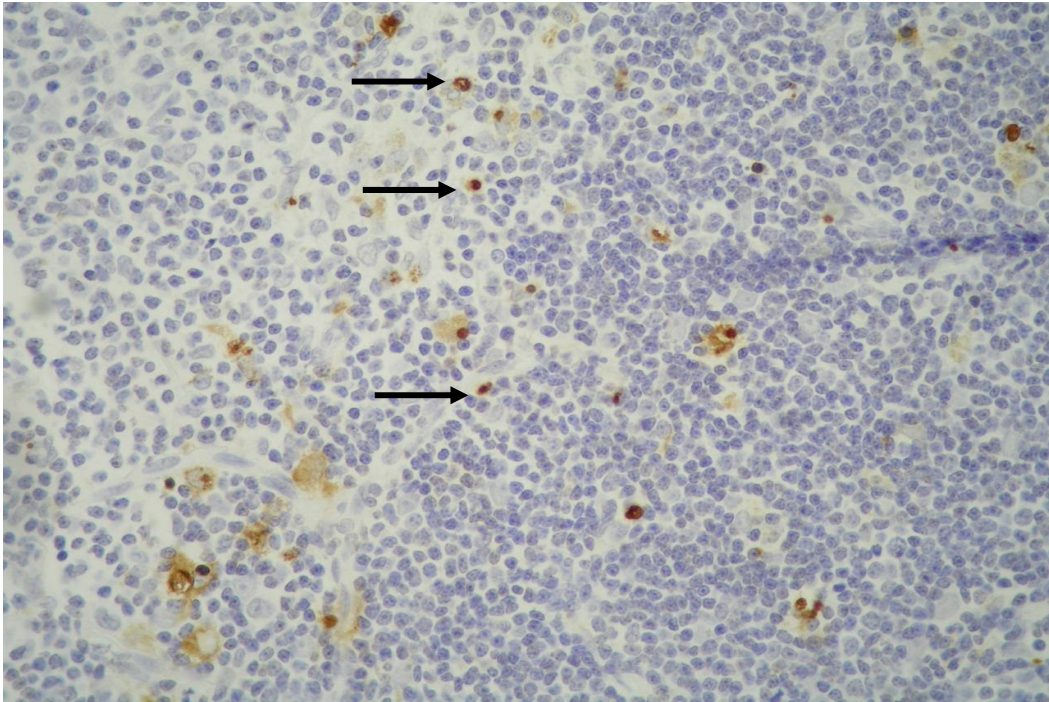
### **Αποπτωτικά Κύτταρα**

Τα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν με βάση δύο μεθόδους. Αυτή της τεχνικής TUNEL και ανοσοϊστοχημικά με την αξιολόγηση της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 που αναφέρθηκε ήδη σε προηγούμενο σημείο της μελέτης. **(εικόνα 32)**

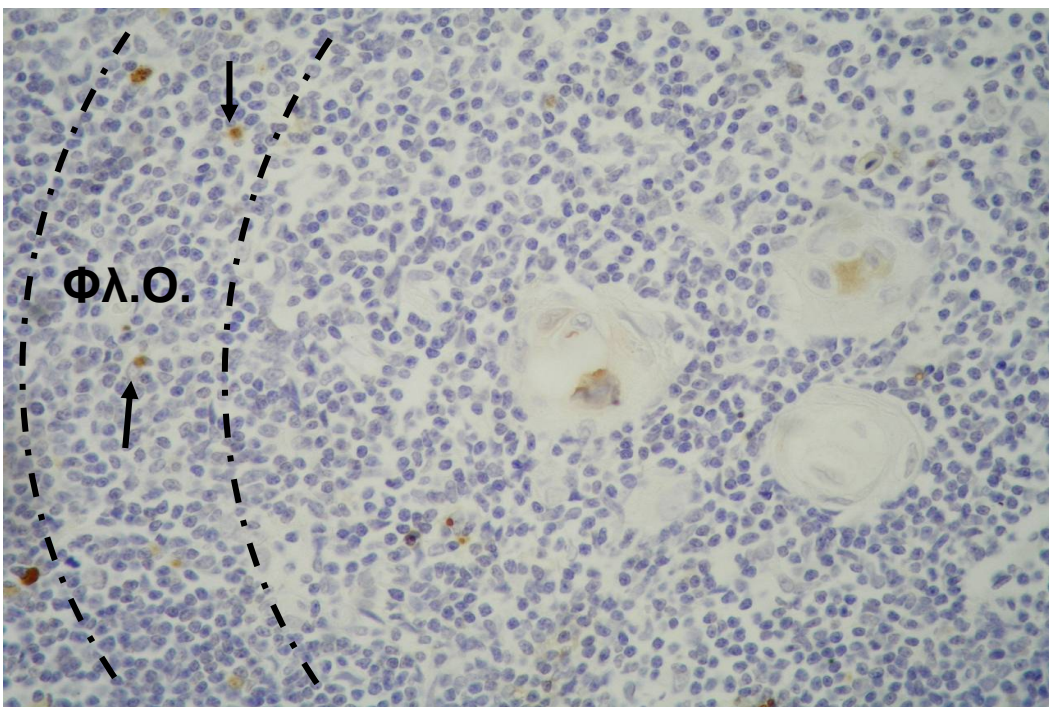
#### **• Μέθοδος TUNEL**

Αποπτωτικά κύτταρα θετικά με τη μέθοδο TUNEL, εντοπίστηκαν κυρίως στη φλοιική ζώνη και το φλοιομυελικό όριο. Στη μυελική ζώνη και στα σωμάτια Hassall σπάνια αναγνωρίστηκαν αποπτωτικά κύτταρα. Η αναλογία θετικών (+) TUNEL κυττάρων συγκριτικά στο φλοιό και το μυελό είναι περίπου 4:1. **(εικόνα 38)**

Εικόνα 38. TUNEL



α) X200



β) X200

α) Βέλη: TUNEL (+) κύτταρα στην περιοχή του φλοιομυελικού ορίου  
β) ΦΛ. Ο. : TUNEL (+) κύτταρα στην περιοχή του φλοιομυελικού ορίου

- **Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53**

Η πρωτεΐνη p53 παρουσίασε πυρηνική κοκκιώδη χρώση. p53 ανοσοθετικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν σε πολύ μικρό ποσοστό (<5%) στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα. Η φλοιική περιοχή εμφάνισε διάχυτα κάποια μεμονωμένα ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα. Στη μυελική περιοχή, τα εκεί ευρισκόμενα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά και τα σωματία Hassall, δεν παρουσίασαν έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

- **Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Rb-1**

Η πρωτεΐνη Rb-1 παρουσίασε πυρηνική χρώση. Rb-1 ανοσοθετικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν σε μέτριο ποσοστό (25-50%) στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα, όπως και στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού. Στο μυελό το ποσοστό των επιθηλιακών κύτταρων που παρουσίασε έκφραση του Rb-1 ήταν μικρότερο (5-25%). Επιπλέον, Rb-1 ανοσοθετικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίστηκαν σε υψηλό ποσοστό (50-100%) στο φλοιό, ενώ στο μυελό η έκφραση των θυμικών λεμφοκυττάρων ήταν αρκετά μικρότερη (5-25%).

- **Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Hdm2**

Η πρωτεΐνη Hdm2 παρουσίασε πυρηνική χρώση. Hdm2 ανοσοθετικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν σε πολύ μικρό ποσοστό (<5%) στα επιθηλιακά κύτταρα των σωματίων Hassall.

- **Ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα**

Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης δεν ανιχνεύθηκαν ανοσοϊστοχημικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του θύμου.

## **B) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΥΠΟ**

### **1) ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

#### **α) ΥΠΟΚΑΨΙΚΑ**

Μεμονωμένα ή σπάνια υποκαψικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν θετική ανοσοχρώση στις προαποπτωτικές πρωτεΐνες bax και bak. Αντίθετα οι πρωτεΐνες bad και bim/BOD δεν παρουσιάζουν έκφραση σε αυτή την κατηγορία των επιθηλιακών κυττάρων. Την πιο έντονη έκφραση από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες εμφάνισε η πρωτεΐνη bid, η οποία σε κάποιες περιπτώσεις έφτανε σε ποσοστό 5-25% των υποκαψικών επιθηλιακών κυττάρων.

Η ανοσοέκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και mcl-1 αναγνωρίζεται σε σπάνια μεμονωμένα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα δεν ανιχνεύθηκε έκφραση των πρωτεϊνών bcl-xL και survivin, ενώ η πρωτεΐνη flipS/L αναγνωρίζεται σχεδόν σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα αυτής της περιοχής.

Ο συνδέτης της πρωτεΐνης Fas (FasL) δεν ανιχνεύεται στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ αντίθετα όλα τα κύτταρα αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν ανοσοθετικότητα στην πρωτεΐνη Fas.

Η κασπάση-3 αναγνωρίζεται σε υψηλό ποσοστό στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα (50-100%). Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 δεν ανιχνεύεται σε αυτή την κατηγορία κυττάρων.

Από τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου που μελετήθηκαν, οι κυκλίνες A, B1, D3 και E, παρουσιάζουν μικρή (5-25%) έκφραση στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος. Η κυκλίνη D2 δεν ανιχνεύθηκε στα εν λόγω επιθηλιακά κύτταρα.

#### **β) ΦΛΟΙΚΗΣ ΜΟΪΡΑΣ**

Αντίστοιχη με την έκφραση στα υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα είναι η έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad και bim/BOD και στα επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής μοίρας. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες bax και bak εμφανίζουν έκφραση σε μεμονωμένα ή σπάνια κύτταρα, ενώ στα τελευταία δεν ανιχνεύθηκε έκφραση των πρωτεϊνών bad και bim/BOD. Όσον αφορά την πρωτεΐνη bid, η έκφρασή της κυμαίνεται από χαμηλή (5-25%) έως μέτρια (25-50%).

Η έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στα φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα, με εξαίρεση το Flip<sub>S/L</sub>, είναι ανάλογη με αυτή που παρατηρήθηκε στην υποκαψική περιοχή. Δηλαδή, οι πρωτεΐνες bcl-2 και mcl-1 εκφράζονται σε



μεμονωμένα κύτταρα και οι πρωτεΐνες bcl-xL και survivin δεν ανιχνεύθηκαν. Όσον αφορά την πρωτεΐνη Flip<sub>S/L</sub>, το ποσοστό έκφρασής της σε αυτή την κατηγορία επιθηλιακών κυττάρων είναι χαμηλό (5-25%).

Μεμονωμένα ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα αναγνωρίζονται στο φλοιό για την πρωτεΐνη FasL, ενώ η πρωτεΐνη Fas εκφράζεται έντονα σε όλα αυτά τα κύτταρα.

Σχεδόν καθολική (50-100%) είναι η ανοσοέκφραση της κασπάσης-3 στα φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ η ενεργοποιημένη κασπάση-3 δεν εμφανίζει έκφραση.

Το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου που μελετήθηκαν στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού, είναι ακριβώς ίδιο με αυτό που οι πρωτεΐνες (κυκλίνες A, B1, D2, D3 και E) εμφανίζουν στα υποκαπικά επιθηλιακά κύτταρα. Δηλαδή, μη-ανίχνευση της κυκλίνης D2 και χαμηλή έκφραση (5-25%) για όλες τις άλλες υπό μελέτη κυκλίνες.

### γ) ΜΥΕΛΙΚΗΣ ΜΟΪΡΑΣ

Μεμονωμένα και κατά θέσεις μικρός αριθμός (5-25%) επιθηλιακών κυττάρων της μυελικής μοίρας εμφανίζουν ανοσοέκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης bak. Η bak πρωτεΐνη σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν εμφανίζει ποσοστό έκφρασης σε 5-25% των εν λόγω κυττάρων. Αντίθετα η πρωτεΐνη bim/BOD δεν ανιχνεύθηκε, ενώ οι bad και bid είναι οι πιο έντονα εκφραζόμενες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ανοσοέκφραση της bad πρωτεΐνης αναγνωρίζεται σε μέτριο αριθμό κυττάρων (25-50%) και αυτή της πρωτεΐνης bid σε μεγάλο αριθμό (50-100%).

Στη μυελική μοίρα η πρωτεΐνη bcl-2, αναγνωρίζεται σε μέτριο αριθμό επιθηλιακών κυττάρων, ενώ η πρωτεΐνη mcl-1 εκφράζεται σε σπάνια μεμονωμένα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες bcl-xL και survivin, όπως και στο φλοιό, δεν ανιχνεύθηκαν στα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ η ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης Flip<sub>S/L</sub>, παρατηρείται σε υψηλό αριθμό επιθηλιακών κυττάρων (50-100%).

Στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα η έκφραση της πρωτεΐνης FasL, είναι μεν αυξημένη σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων, ωστόσο όμως ή έκφρασή της κυμαίνεται και πάλι σε χαμηλά επίπεδα (5-25%). Αντίθετα, η πρωτεΐνη Fas και σε αυτό τον τύπο επιθηλιακών κυττάρων έχει σχεδόν καθολική έκφραση.

Θετική ανοσοέκφραση σε υψηλό ποσοστό μυελικών κυττάρων (50-100%) εμφανίζει κασπάση-3. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 δεν ανιχνεύθηκε.

Το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου που μελετήθηκαν είναι σχεδόν αντίστροφο στα επιθηλιακά κύτταρα του μυελού σε σχέση με αυτά του φλοιού. Συγκεκριμένα η έκφραση των κυκλινών A, B1, D3 και E αναγνωρίζεται σε μεμονωμένα κύτταρα, ενώ τα ανοσοθετικά κύτταρα στην κυκλίνη D3 εμφανίζουν ένα ποσοστό της τάξης του 5-25% (χαμηλή έκφραση).

#### δ) ΣΩΜΑΤΙΑ HASSALL

Ετερογενής είναι η έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν και στα σωματία Hassall. Ο αριθμός, το μέγεθος και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σωματίων που αναγνωρίστηκαν στα περιστατικά που μελετήθηκαν, συσχετίστηκαν με την ηλικία του ατόμου από το οποίο προερχόταν το προς εξέταση υλικό. Στα νεογνά τα σωματία Hassall ήταν πιο μικρά σε μέγεθος με περισσότερο ηωσινόφιλη απόχρωση στην κεντρική περιοχή και σπάνια κυστική εκφύλιση ή νέκρωση. Στα παιδιά, τους εφήβους και τους ενήλικες, τα σωματία Hassall ήταν μεγαλύτερα, κάποιες φορές συρρέοντα και με συχνότερη εμφάνιση κυστικής εκφύλισης, αποτιτανώσεων και κυτταρικών αποτριμμάτων. Παρόλα αυτά η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στα κύτταρα των εν λόγω σωματίων, ήταν παρόμοια σε όλες τις ηλικιακές ομάδες.

Συγκεκριμένα η έκφραση των πρωτεϊνών bax, bim/BOD και bid δεν αναγνωρίστηκε στις δομές αυτές του μυελού, ενώ σχεδόν όλα τα εν λόγω σωματία (~100%) εμφάνισαν ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών bak και bad.

Η έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, mcl-1, bcl-xL και survivin, δεν αναγνωρίστηκε στα σωματία Hassall. Αντιθέτως όμως, σχεδόν όλα τα σωματία είναι ανοσοθετικά στην αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Flips<sub>SL</sub>.

Αντιστροφή της έκφρασης των πρωτεϊνών FasL και Fas, παρατηρείται στα σωματία Hassall, σε σύγκριση με τους διάφορους τύπους επιθηλιακών κυττάρων του θύμου αδένου. Εδώ, η πρωτεΐνη FasL αναγνωρίζεται σε ποσοστό 25-50% των σωματίων Hassall, ενώ μόνο μεμονωμένα σωματία παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα στην πρωτεΐνη Fas.

Η κασπάση-3 εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα σωματία Hassall, ενώ έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 δεν αναγνωρίστηκε.

Τα σωματία Hassall δεν εμφανίζουν ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου που μελετήθηκαν, με εξαίρεση τις κυκλίνες της ομάδας D (D2 και D3). Οι τελευταίες εμφανίζουν έκφραση σε σπάνια μεμονωμένα σωματία στο μυελό.

## 2) ΛΕΜΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

### α) ΦΛΟΙΟΥ

Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες bax και bid παρουσιάζουν έκφραση σε υψηλό (50-100%) ποσοστό θυμικών λεμφοκυττάρων του φλοιού. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες bak και bad δεν εμφανίζουν έκφραση, ενώ η προαποπτωτική πρωτεΐνη bim/BOD αναγνωρίζεται σε μεμονωμένα θυμοκύτταρα της φλοιικής ζώνης.

Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2 και mcl-1 εμφανίζουν ανοσοέκφραση σε μεμονωμένα θυμοκύτταρα του φλοιού, ενώ η bcl-xL αναγνωρίζεται σε υψηλό (50-100%) ποσοστό των εν λόγω κυττάρων. Ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης survivin παρατηρείται σε μεμονωμένα φλοιικά θυμοκύτταρα. Η πρωτεΐνη Flips<sub>S/L</sub> δεν ανιχνεύθηκε σε αυτή την κατηγορία των θυμικών κυττάρων.

Η πρωτεΐνη Fas και ο συνδέτης της (FasL) δεν ανιχνεύθηκαν στα θυμικά λεμφοκύτταρα.

Η κασπάση-3 εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής (50-100%) και επιπλέον κάποια κύτταρα εμφανίζουν ανοσοέκφραση και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3. Η έκφραση της τελευταίας φτάνει μέχρι τη φλοιομυελική ζώνη.

Από τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου που μελετήθηκαν, οι κυκλίνες D2, E και B1 εμφανίζουν έκφραση σε σπάνια θυμοκύτταρα του φλοιού. Η τελευταία κυκλίνη κατά περιπτώσεις εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση που φτάνει σε ποσοστό 5-25% των θυμοκυττάρων. Οι κυκλίνες D3 και A, αναγνωρίζονται σε μέτριο (25-50%) αριθμό λεμφοκυττάρων του φλοιού.

### β) ΜΥΕΛΟΥ

Η ανοσοέκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών στα μυελικά θυμοκύτταρα είναι σχεδόν ίδια με αυτή που παρουσιάζουν στα αντίστοιχα κύτταρα του φλοιού. Η μόνη διαφορά είναι ότι η πρωτεΐνη bim/BOD εκφράζεται σε περισσότερα κύτταρα από ότι στο φλοιό, με το ποσοστό να φτάνει στο 5-25%. Οι λοιπές προαποπτωτικές πρωτεΐνες είναι ακριβώς ίδιες στην έκφραση με αυτή του φλοιού, δηλαδή 50-100% για τις bax και bid, μηδενική έκφραση για τις bak και bad.

Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2, mcl-1 και bcl-xL εμφανίζουν ένα πρότυπο έκφρασης ανεστραμμένο σε σχέση με αυτό στα αντίστοιχα κύτταρα του φλοιού. Συγκεκριμένα οι bcl-2 και mcl-1 εκφράζονται σε ποσοστό 25-50% των θυμοκυττάρων του μυελού, ενώ η έκφραση της bcl-xL πρωτεΐνης αναγνωρίζεται σε σπάνια μεμονωμένα θυμοκύτταρα. Ίδια έκφραση με την τελευταία αντι-αποπτωτική

πρωτεΐνη εμφανίζει και η survivin. Έκφραση της πρωτεΐνης Flip<sub>S/L</sub> δεν ανιχνεύθηκε στα λεμφοκύτταρα που εντοπίζονται στο μυελό του θύμου αδένου.

Η πρωτεΐνη Fas μαζί με το συνδέτη της (FasL), όπως και στα λεμφοκύτταρα του φλοιού, δεν ανιχνεύθηκε και σε αυτά του μυελού.

Η πρωτεΐνη κασπάση-3 εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό (50-100%) των θυμοκυττάρων του μυελού. Κύτταρα ανοσοθετικά στην ενεργοποιημένη κασπάση-3 αναγνωρίζονται πολύ σπάνια στη μυελική μοίρα του οργάνου.

Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, κυκλίνες A και D2, αναγνωρίζονται σε μικρό αριθμό θυμοκυττάρων του μυελού (5-25%), ενώ η ανοσοέκφραση των κυκλινών D3 και B1 παρατηρείται σε μεμονωμένα θυμοκύτταρα. Τέλος, η κυκλίνη E δεν ανιχνεύθηκε στα θυμικά μυελικά λεμφοκύτταρα.



### Γ) ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα οι πρωτεΐνες bim/BOD, bcl-xL, survivin και η ενεργοποιημένη κασπάση-3, δεν ανιχνεύθηκαν. Η πρωτεΐνη mcl-1 εμφάνισε στο φλοιό και στο μυελό μεμονωμένα ανοσοθετικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες bax, bak, bad, bid, bcl-2 και FasL, εμφάνισαν ένα παρόμοιο πρότυπο ανοσοτοπογραφικής έκφρασης, με αύξηση των ανοσοθετικών κυττάρων από την υποκαμική περιοχή προς το μυελό. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα σωματία Hassall, τα οποία ήταν αρνητικά στις πρωτεΐνες mcl-1, bcl-xL, bax, bid και bcl-2, αλλά οι bak και bad είχαν υψηλή έκφραση. Οι πρωτεΐνες κασπάση-3, Fas και Flip<sub>S/L</sub> ανιχνεύθηκαν σε όλα τα επιθηλιακά θυμικά κύτταρα. Στην περίπτωση μόνο του Flip<sub>S/L</sub> η φλοιική έκφραση ήταν ελαττωμένη. Σπάνια TUNEL θετικά κύτταρα αναγνωρίζονται στα σωματία Hassall, ενώ η ενεργοποιημένη κασπάση-3 δεν ανιχνεύθηκε.

Στα θυμικά λεμφοκύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες bak, bad, Flip<sub>S/L</sub> και Fas. Η πρωτεΐνη survivin αναγνωρίστηκε σε μεμονωμένα κύτταρα σε φλοιό και μυελό, ενώ η FasL σε μεμονωμένα κύτταρα στο φλοιομυελικό όριο. Αντίθετα, οι bax, bid και κασπάση-3 εμφάνισαν καθολική έκφραση. Οι πρωτεΐνες bim/BOD, bcl-2 και mcl-1 παρουσίασαν αύξηση έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό, ενώ η bcl-xL εμφάνισε ακριβώς την αντίθετη κλίση έκφρασης, δηλαδή μείωση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3, αναγνωρίστηκε σε κάποια κύτταρα στην περιοχή του φλοιού και τη φλοιομυελική ζώνη. Στις ίδιες περιοχές και λιγότερο στο μυελό ανιχνεύθηκαν TUNEL θετικά λεμφοκύτταρα.

Στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα θυμοκύτταρα, οι κυκλίνες A, B1, D3 και E παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα ανοσοτοπογραφικής έκφρασης, με ελάττωση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό. Αντίθετη ήταν η “πορεία” ανοσοτοπογραφικής έκφρασης της κυκλίνης D2. Η ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης Rb-1 παρουσίασε μέτρια/υψηλή έκφραση στα φλοιικά επιθηλιακά και λεμφικά κύτταρα με σαφή μείωση έκφρασης στο μυελό. Η πρωτεΐνη p53, παρουσίασε χαμηλή έκφραση σε υποκαμικά και φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα και η πρωτεΐνη Hdm2 ανιχνεύθηκε σε ελάχιστα επιθηλιακά κύτταρα των σωματίων Hassall.

Η ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου παρουσίασε μείωση στις περιπτώσεις με έντονη θυμική υποστροφή (κυρίως θύμοι ενηλίκων), όπου οι κυτταρικοί πληθυσμοί ήταν σαφώς ελαττωμένοι.

Στις περιπτώσεις με λεμφοζιδιακή υπερπλασία δεν υπάρχουν αξιολογώτερες διαφορές κατανομής και έκφρασης ποσοστών των πρωτεϊνών σε σχέση με τις άλλες περιπτώσεις.

**Πίνακας 3.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου.

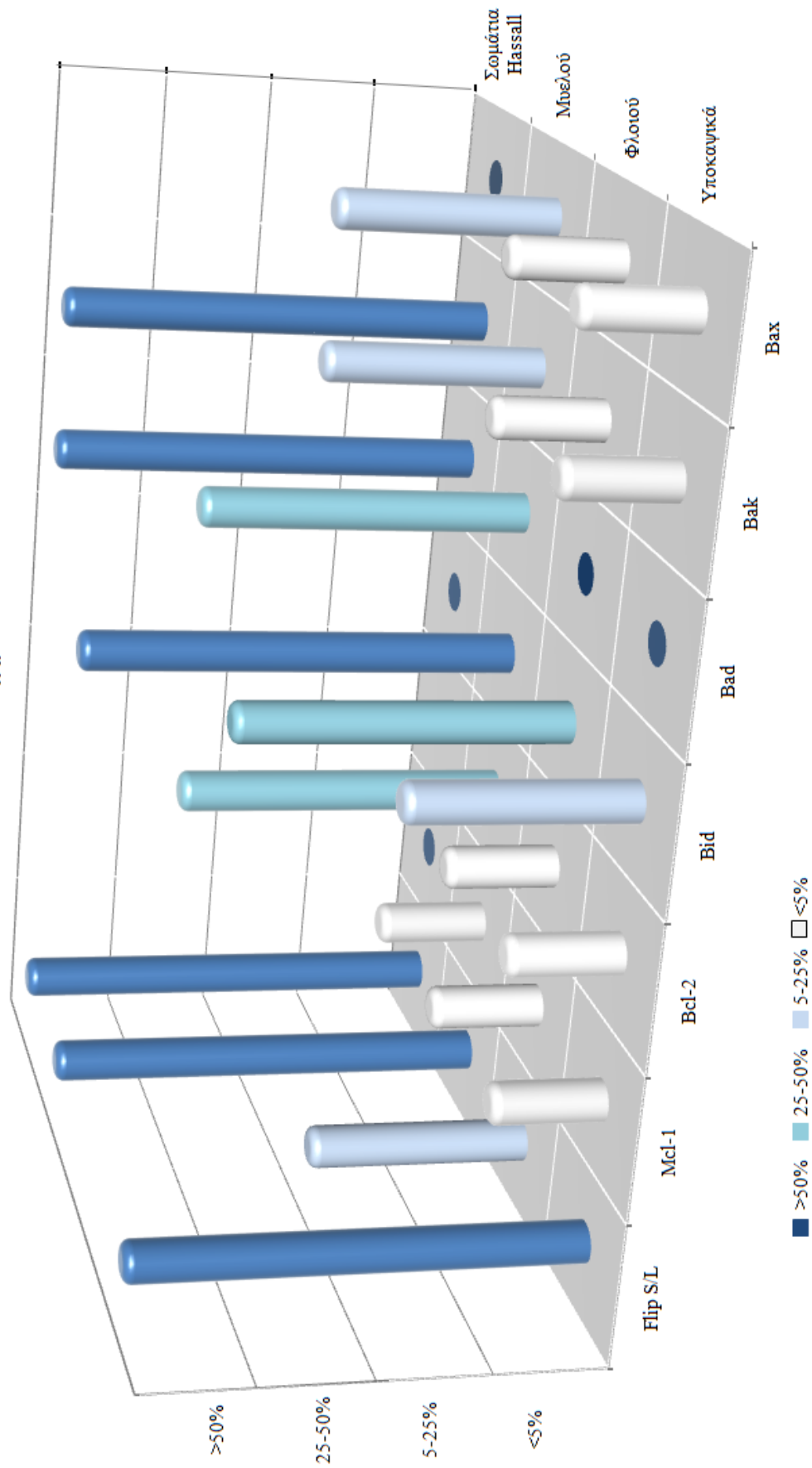
| ΑΝΤΙΣΩΜΑ                    | ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ |        |        |                 |
|-----------------------------|--------------------|--------|--------|-----------------|
|                             | Υποκαψικά          | Φλοιού | Μυελού | Σωμάτια Hassall |
| Bax                         | +/-                | +/-    | +      | -               |
| Bak                         | +/-                | +/-    | +      | +++             |
| Bad                         | -                  | -      | ++     | +++             |
| Bim/BOD                     | -                  | -      | -      | -               |
| Bid                         | +                  | ++     | +++    | -               |
| Bcl-2                       | +/-                | +/-    | ++     | -               |
| Bcl-xL                      | -                  | -      | -      | -               |
| Mcl-1                       | +/-                | +/-    | +/-    | -               |
| Flip S/L                    | +++                | +      | +++    | +++             |
| Survivin                    | -                  | -      | -      | -               |
| FasL                        | -                  | +/-    | +      | ++              |
| Fas/CD95                    | +++                | +++    | +++    | +/-             |
| Κασπάση-3                   | +++                | +++    | +++    | +++             |
| Ενεργοποιημένη<br>κασπάση-3 | -                  | -      | -      | -               |
| TUNEL                       | -                  | -      | -      | +/-             |
| p53                         | +/-                | +/-    | -      | -               |
| Rb-1                        | ++                 | ++     | +      | -               |
| Hdm2                        | -                  | -      | -      | +/-             |
| Κυκλίνη A                   | +                  | +      | +/-    | -               |
| Κυκλίνη B1                  | +                  | +      | +/-    | -               |
| Κυκλίνη D2                  | -                  | -      | +      | +/-             |
| Κυκλίνη D3                  | +                  | +      | +/-    | +/-             |
| Κυκλίνη E                   | +                  | +      | +/-    | -               |
| Κυκλίνη D1                  | -                  | -      | -      | -               |

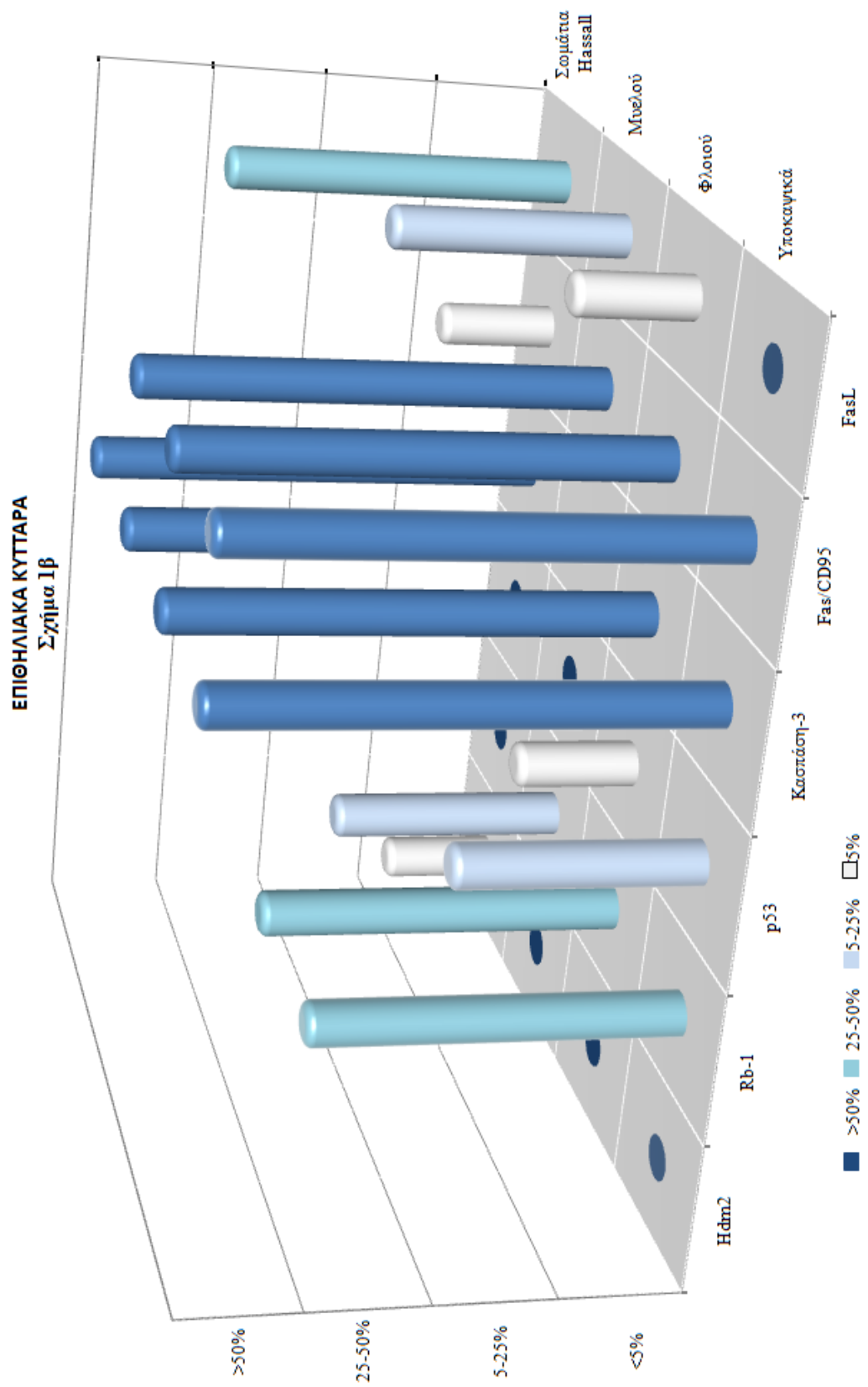
**Πίνακας 4.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου στα θυμοκύτταρα.

| ΑΝΤΙΣΩΜΑ                    | ΘΥΜΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ |        |
|-----------------------------|---------------------|--------|
|                             | Φλοιός              | Μυελός |
| Bax                         | +++                 | +++    |
| Bak                         | -                   | -      |
| Bad                         | -                   | -      |
| Bim/BOD                     | +/-                 | +      |
| Bid                         | +++                 | +++    |
| Bcl-2                       | +/-                 | ++     |
| Bcl-xL                      | +++                 | +/-    |
| Mcl-1                       | +/-                 | ++     |
| Flip S/L                    | -                   | -      |
| Survivin                    | +/-                 | +/-    |
| FasL                        | -                   | -      |
| Fas/CD95                    | -                   | -      |
| Κασπάση-3                   | +++                 | +++    |
| Ενεργοποιημένη<br>κασπάση-3 | +/-                 | -      |
| TUNEL                       | +                   | +/-    |
| p53                         | -                   | -      |
| Rb-1                        | ++/+++              | +      |
| Hdm2                        | -                   | -      |
| Κυκλίνη A                   | ++                  | +      |
| Κυκλίνη B1                  | +                   | +/-    |
| Κυκλίνη D2                  | +/-                 | +      |
| Κυκλίνη D3                  | ++                  | +/-    |
| Κυκλίνη E                   | +/-                 | -      |
| Κυκλίνη D1                  | -                   | -      |

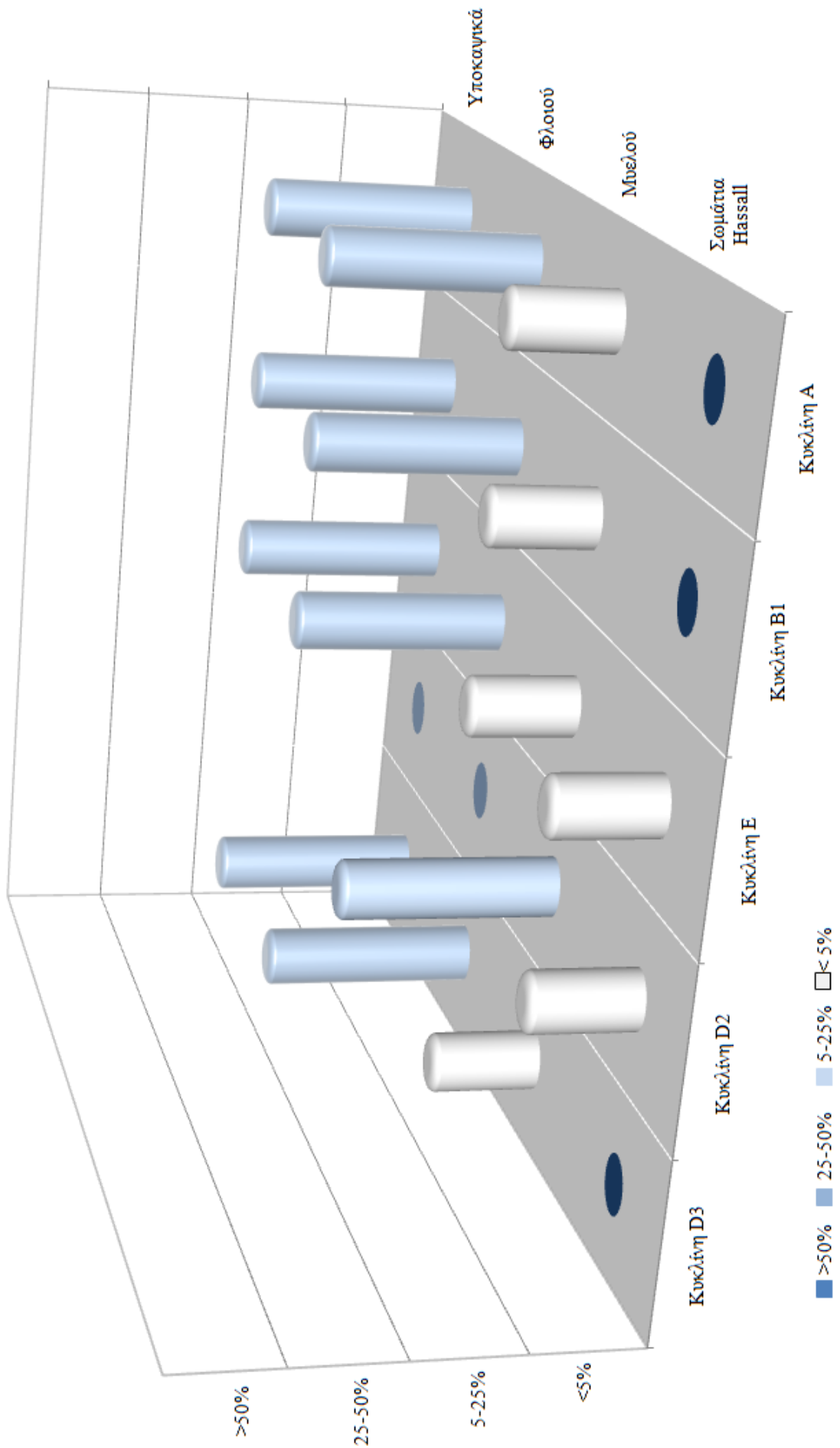


**ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**  
Σχήμα 1α

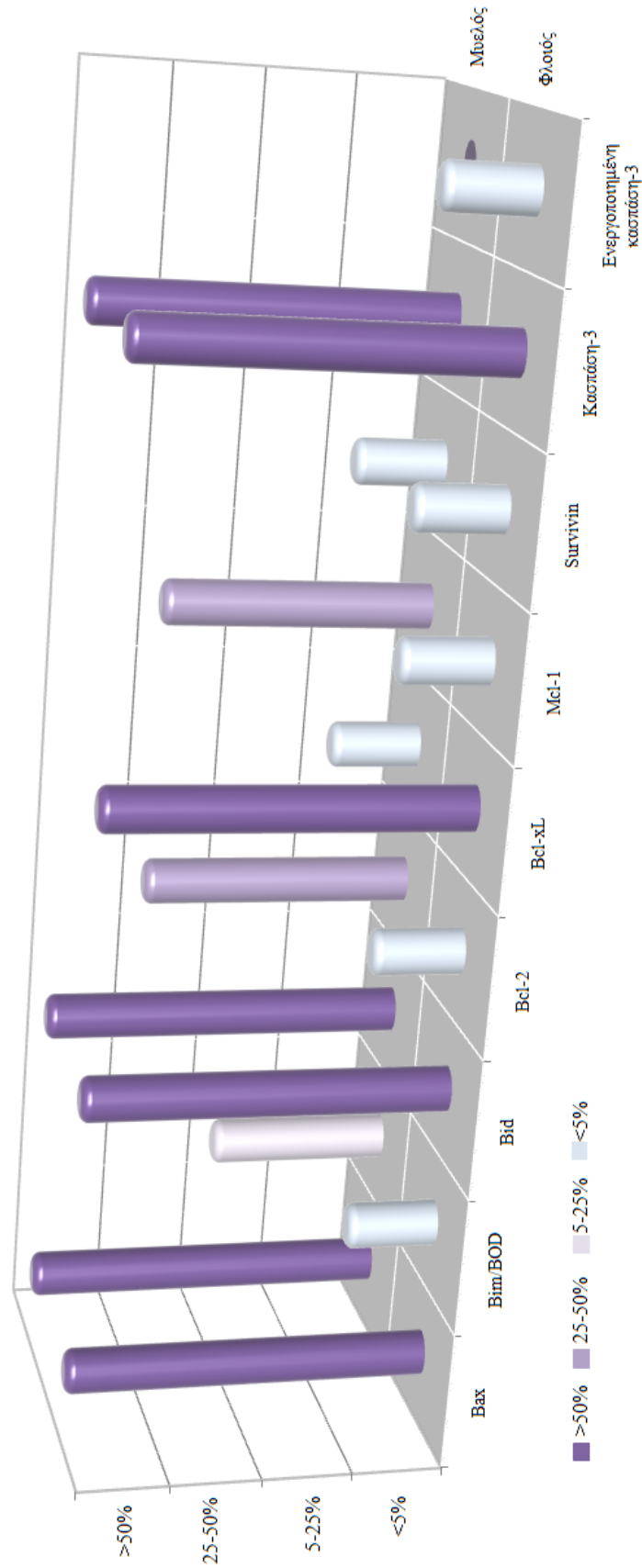




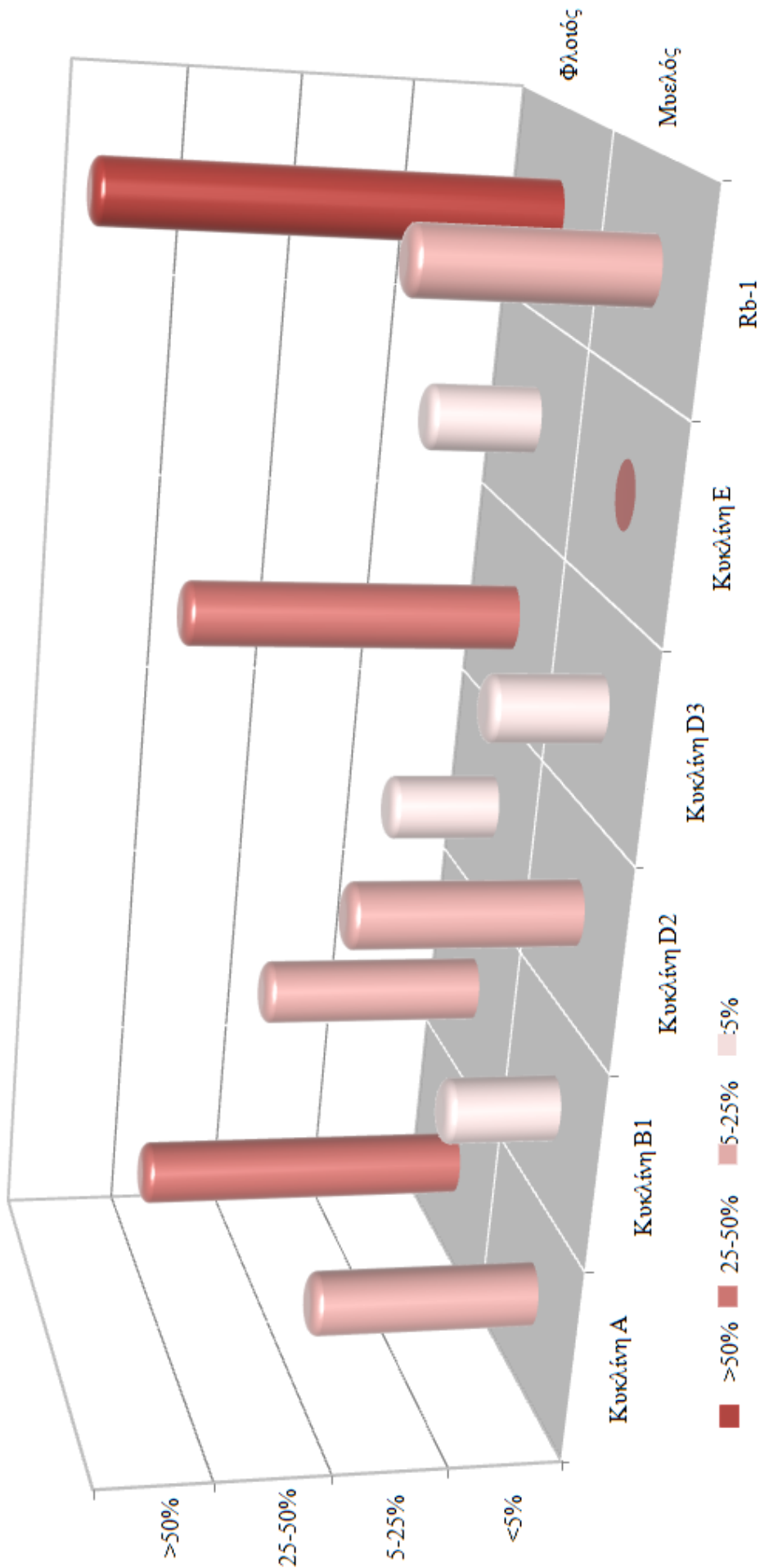
**ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**  
Σχήμα 1γ



**ΘΥΜΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**  
Σχήμα 2α



**ΘΥΜΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**  
Σχήμα 2β







## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης και της τοπογραφικής κατανομής αυτών των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης σε κυτταρικό και σε ιστικό επίπεδο, προσφέρει τη δυνατότητα της ακριβούς μορφολογικής πληροφορίας για την *in situ* εντόπιση των πρωτεϊνών, η οποία συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση του ρόλου τους στη ρύθμιση της κυτταρικής ζωής και του θανάτου.

Προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές μελέτες<sup>77,141,306-314,315-318,320-334,335-337</sup>, αλλά και μελέτες με άλλες τεχνικές (π. χ. ανοσοφθορισμός<sup>315,338,339</sup> western blot<sup>340-342</sup>, κυτταρομετρία ροής<sup>315,326,338-340,342-349</sup>, ανοσοκαθίζηση<sup>350</sup>, ανέδειξαν πρότυπα έκφρασης διάφορων πρωτεϊνών ή mRNA στο θύμο αδένα, οι οποίες σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Οι μελέτες αυτές έχουν γίνει τόσο σε πειραματόζωα (π.χ. διαγονιδιακά ποντίκια), όσο και σε ανθρώπινο ιστό. Επιπρόσθετα, η πραγματοποίησή τους έγινε κυρίως σε βιολογικά υλικά που έχουν υποστεί επίδραση ουσιών (π.χ. κορτικοστεροειδή, φάρμακα), ακτινοβολία, στέρηση θρεπτικών ουσιών ή ήταν βιολογικά υλικά προερχόμενα από νεοπλασματικές αλλοιώσεις<sup>309,317,323,325,328,331</sup>. Σπανιότερα το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν φυσιολογικός ιστός<sup>77,141,306-308,310-313,318-320,322,324,327,334,335-337</sup>.

Επειδή οι διαθέσιμες μελέτες του ανθρώπινου θυμικού ιστού είναι αποσπασματικές, καθόσον συνήθως γίνεται μονοπαραγοντική<sup>306,308,310,314,315,319,328</sup> ή ολιγοπαραγοντική<sup>77,322,324,334,335,340</sup> ανάλυση, στην παρούσα εργασία μας πραγματοποιήσαμε μια ολοκληρωμένη, πολυπαραγοντική μελέτη, που αφορά το συνδυασμένο πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών που ασκούν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου σε φυσιολογικούς ανθρώπινους θύμους από διάφορες ηλικιακές ομάδες. Η μελέτη μας έγινε σε τομές παραφίνης, οι οποίες επιτρέπουν την καλή μορφολογική αναγνώριση και ταυτοποίηση των ανοσοθετικών κυττάρων. Σημειώνουμε πως η μόνη μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία πολυπαραγοντική μελέτη πάνω σε φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο αδένα με ανοσοϊστοχημεία σε ιστολογικές τομές παραφίνης, προέρχεται από την ίδια ερευνητική ομάδα<sup>320</sup>.

Λαμβάνοντας δε υπόψιν πως τα λεμφοκυτταρικά συστήματα, όπως είναι και ο θύμος αδένας, είναι αυτά που κατεξοχήν έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μελέτη κυρίως της απόπτωσης, αφού η τελευταία κατέχει κεντρική θέση στην

στην παρατήρηση της απώλειας έκφρασης ενός ή περισσότερων γονιδίων σε πειραματόζωα, τα οποία κατά κύριο λόγο ήταν ποντίκια. Αυτές δηλαδή, αφορούσαν τη δημιουργία ποντικών με απαλοιφή κάποιου γονιδίου και κατά συνέπεια έλλειψη στην έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Τα γονίδια αυτά αφορούσαν μέλη της bcl-2 οικογένειας π.χ. bax, bak<sup>351</sup>. Οι ιστοί αυτών των πειραματόζωων, μετά τη νεκροτομή τους, μικροσκοπούνταν και προέκυπταν τα συμπεράσματα σχετικά με τις πιθανές αλλοιώσεις, αλλά και την αποτελεσματικότητα αποπτωτικών παραγόντων που είχαν επιδράσει στα εν λόγω ποντίκια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πειραματόζωα άγριου τύπου). Ακόμη, σε *in vitro* μελέτες με κυτταρικές σειρές, το πολύ σημαντικό μικροπεριβάλλον του οργάνου (δηλαδή θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα κ.α.) δεν συμπεριλαμβανόταν, ενώ επιπλέον, το μικροπεριβάλλον παρουσιάζει διαφορές σε κάθε είδος (ανθρώπινο, πτηνών, ποντικών κ.α.). Τα ανωτέρω καθιστούν την πολυπαραγοντική και συνδυαστική μελέτη μας πρωτότυπη, καθώς η έκφραση των πρωτεϊνών, αφενός αναλύεται σε ανθρώπινο ιστό και αφετέρου στο ιστικό περιβάλλον που βρίσκονται τα κύτταρα.

## A) Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση απόπτωσης και κυτταρικού κύκλου στο θύμο αδένα με βάση τους κυτταρικούς τύπους

### A1) Θυμικά Επιθηλιακά Κύτταρα (TECs)

Ανοσοθετικά bax κύτταρα αναγνωρίστηκαν στην κατηγορία των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Αριθμητικά, είναι περισσότερα στο μυελό και σχετικά σπάνια στο φλοιό. Θυμικά επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη bax (αραίωση 1:1000 έως 1:2000), έχουν αναφερθεί και σε παλαιότερη μελέτη<sup>307</sup> που πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης από φυσιολογικό θυμικό ιστό από πειραματόζωα. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή, ο αριθμός των ανοσοθετικών επιθηλιακών κυττάρων ήταν μεγαλύτερος από ότι στη δική μας.

Έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση του κυτταρικού επιφανειακού υποδοχέα Fas, ανιχνεύθηκε στην παρούσα εργασία στα επιθηλιακά κύτταρα σε όλη την έκταση του αδένα. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη, επίσης σε φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο και θύμο από ασθενείς με σύνδρομο DiGeorge<sup>314</sup> με ανοσοϊστοχημεία (Dako, 1:10) σε τομές παραφίνης. Άλλη μελέτη<sup>352</sup> σε τομές από κρουστάτη και με την ίδια τεχνική (ανοσοϊστοχημεία), ανέδειξε αντίστοιχα αποτελέσματα, με τη διαφορά ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Fas, στα φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα, ήταν περιορισμένη. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα με ανοσοϊστοχημεία σε ομάδα ελέγχου (φυσιολογικός θυμικός ιστός) από μελέτη με θυμικούς επιθηλιακούς όγκους<sup>353</sup>.

Ωστόσο όμως, στην παρούσα εργασία για την πρωτεΐνη Fas, δεν παρατηρήθηκε η θετικότητα των σωματίων Hassall που αναφέρεται πως αναδείχθηκε σε ανοσοϊστοχημική μελέτη (Fas, 1:100, polyclonal, Santa Cruz) σε τομές παραφίνης. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρήθηκε σε ιστό από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο και αναφερόταν στην ομάδα ελέγχου της εν λόγω μελέτης<sup>322</sup>, η οποία κατά κύριο λόγο αφορούσε θυμικούς επιθηλιακούς όγκους.

Ο συνδέτης του Fas (FasL), εντοπίζεται όπως και ο Fas, ως επί το πλείστον σε μη λεμφοειδή θυμικά κυτταρικά συστατικά. Εντοπίζεται όμως κυρίως στο επιθήλιο του μυελού και τα σωματία Hassall. Η έκφραση αυτή είναι σύμφωνη με ευρήματα από παλαιότερη μελέτη<sup>354</sup> που πραγματοποιήθηκε με τις τεχνικές της ανοσοκυτταροχημείας (FasL, polyclonal mouse, PE62) σε τομές κρουστάτη και του *in situ* υβριδισμού σε υλικό που ελήφθη από πειραματόζωα (ποντίκια). Πιο έντονη έκφραση της πρωτεΐνης, με την ίδια όμως τοπογραφία, αναφέρεται στην εργασία που πραγματοποίησαν οι Park SH και συν.<sup>322</sup> και πιο συγκεκριμένα στην ομάδα ελέγχου

από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο, που μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία (FasL, 1:100, polyclonal, Santa Cruz) σε τομές παραφίνης.

Οι κυκλίνες που μελετήθηκαν ανοσοϊστοχημικά στην εργασία μας, παρουσίασαν γενικά μικρή έκφραση στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ανοσοτοπογραφική έκφραση των A, B1, E και D3, παρουσίασε μια αλληλοεπικάλυψη, με μεγαλύτερη ανοσοέκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού και τάση ελάττωσης κατά τη μετακίνηση προς το μυελό. Αυτό το πρότυπο συμβαδίζει με το αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων του φλοιού σε σχέση με το μυελό. Η D2 κυκλίνη, από την άλλη, αναγνωρίστηκε στα επιθηλιακά κύτταρα του μυελού, καθώς και σε μεμονωμένα σωμάτια Hassall, εμφανίζοντας μια αντιστροφή στην κλίση έκφρασης σε σχέση με τις υπόλοιπες κυκλίνες, αφού στη φλοιική περιοχή δεν αναγνωρίστηκε καθόλου.

Ειδικά για την κυκλίνη D3 σε προηγούμενη μελέτη έχει αναφερθεί πως έχει ένα ιδιαίτερο ρόλο σε σχέση με τις άλλες κυκλίνες της ομάδας στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα<sup>318</sup>. Πιο ειδικά, παρατηρήθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια για κάθε μία D κυκλίνη, πως αυτά της D3 δεν ανέπτυξαν θυμική υπερπλασία, ενώ τα πειραματόζωα με τις δύο άλλες κυκλίνες ανέπτυξαν αυτό το φαινόμενο<sup>318</sup>.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κυτταρική σειρά από ποντίκια, με θυμικά μυελικού τύπου επιθηλιακά κύτταρα (mouse thymic medullary-type epithelial cell line 1)<sup>355</sup>, οι κυκλίνες E και D1 εκφράζονταν στα εν λόγω κύτταρα της καλλιέργειας. Τα κύτταρα της σειράς που μελετήθηκε έχουν το χαρακτηριστικό να προκαλούν λειτουργική ωρίμανση των CD4<sup>+</sup> θυμοκυττάρων *in vitro*. Όσον αφορά την κυκλίνη D1, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα της μελέτης μας, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι πλακώδη επιθήλια<sup>356</sup> και ορθοκολικές επιθηλιακές νεοπλασίες<sup>357</sup>, εκφράζουν την κυκλίνη D1.

**Συνολικά στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα** παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad και bid από το φλοιό προς το μυελό, η οποία είναι αντίστροφη από την παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών του κύκλου/πολλαπλασιασμού κυκλινών A, B1, D3 και E. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση δυναμικού κυτταρικού θανάτου στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα από το φλοιό προς το μυελό. Η παρουσία όμως ικανού αριθμού θετικών κυττάρων για τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2 και FLIP<sub>SL</sub> στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, η απουσία θετικότητας για ενεργοποιημένη κασπάση-3 και η απουσία TUNEL θετικών κυττάρων στα μυελικά



επιθηλιακά κύτταρα, υποδηλώνουν ενεργοποίηση αντιαποπτωτικού προγράμματος, το οποίο τους προσφέρει δυναμικό επιβίωσης. Στα σωμάτια Hassall παρατηρείται υψηλή έκφραση των προποπτωτικών πρωτεϊνών bak και bad, η οποία φαίνεται να αντισταθμίζεται από την υψηλή έκφραση της αντιαποπτωτικής FLIP<sub>SL</sub> διότι δεν παρατηρείται θετικότητα για ενεργοποιημένη κασπάση-3 και παρατηρούνται πολύ σπάνια TUNEL θετικά κύτταρα. Στα σωμάτια Hassall παρατηρείται σημαντική μείωση πολλαπλασιαστικού δυναμικού (απουσία έκφρασης κυκλινών A, B1, E, πολύ χαμηλή έκφραση κυκλινών D2 και D3 και υψηλή έκφραση p16, p21 και p27). Επιπλέον, τα σωμάτια Hassall παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση πολλών κερατινών και πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης σε σχέση με τα υπόλοιπα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (Γ. Καρατζίας: Διδακτορική Διατριβή 2011, Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας). Συνεπώς, τα συνολικά ευρήματα δείχνουν ότι τα σωμάτια Hassall είναι επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης με πολύ χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, αλλά με στοιχεία κυτταρικής γήρανσης.

## A2) Θυμικά λεμφοκύτταρα (Thymocytes/Thymic Lymphocytes)

Η προαποπτωτική bax πρωτεΐνη εκφράστηκε στα θυμικά λεμφοκύτταρα και στις δύο ανατομικές περιοχές του θύμου αδένου (φλοιός και μυελός). Ωστόσο όμως, παλαιότερες μελέτες δεν κατόρθωσαν να εντοπίσουν την πρωτεΐνη στο φλοιό. Πιο συγκεκριμένα με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης οι Ohta K. και συν.<sup>341</sup> μελέτησαν ανθρώπινο θύμο αδένου, που προερχόταν από παιδιά που χειρουργήθηκαν για καρδιακό πρόβλημα, και χρησιμοποίησαν πολυκλωνικό αντίσωμα (anti-rabbit, 1:2000) για την ανάδειξη της έκφρασης της bax πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη όμως παρουσίασε ελάχιστη μόνο έκφραση στη φλοιική περιοχή. Παρομοίως και οι Krajewski S. και συν.<sup>307</sup>, οι οποίοι σε θύμο αδένου από πειραματόζωα (ποντίκια) και με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, κυρίως σε τομές παραφίνης, αλλά και σε τομές κρυστάτη, δεν κατόρθωσαν να αναδείξουν ιδιαίτερη έκφραση της πρωτεΐνης bax (1:1000 έως 1:2000) στα θυμοκύτταρα του φλοιού.

Η πρωτεΐνη bak, δεν αναγνωρίστηκε ανοσοϊστοχημικά στα θυμοκύτταρα, κάτι το οποίο είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τη μελέτη των Yokoyama T. και συν.<sup>345</sup> όπου με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, σε θυμοκύτταρα που προερχόταν από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο αδένου, ο οποίος είχε αφαιρεθεί στα πλαίσια καρδιοχειρουργικής επέμβασης, δεν αναγνωρίστηκε ποσότητα της πρωτεΐνης bak (αντίσωμα Pharmingen). Αυτή η μη ανάδειξη έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ενδεχομένως υποδηλώνει μια αλληλοεπικάλυψη της δράσης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης από άλλα μόρια που προάγουν την απόπτωση.

Η καθολική σχεδόν έκφραση της bax πρωτεΐνης στα θυμοκύτταρα, επιβεβαιώνει τη διατυπωμένη άποψη σε μία ανοσοϊστοχημική μελέτη σε τομές παραφίνης, βιοπτικού υλικού προερχόμενου από φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ανθρώπινους λεμφαδένες, που πραγματοποίησαν οι Krajewski S. και συν.<sup>358</sup> και που ενστερνίζονται και σε μια ανασκόπηση οι Quaglino D. και Pasquali-Ronchetti I.<sup>359</sup>, πως δηλαδή η bax είναι μια πρωτεΐνη πιο διάχυτα εκφραζόμενη από ότι η αντι-αποπτωτική bcl-2. Αυτό, πιθανώς, να αντικατοπτρίζει ένα γενικότερο ρόλο που η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει σε διάφορα στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης, ως παράγοντα ευόδωσης κυτταρικού θανάτου/απόπτωσης, εφόσον τα σηματοδοτικά μονοπάτια και οι κυτταρικές ή εξωκυττάρειες συνθήκες το απαιτούν.

Μία νέα δράση των πρωτεϊνών bax και bak μετά από μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια με τις τεχνικές της κυτταρομετρίας ροής και του ανοσοφθορισμού,

δημοσιεύτηκε πρόσφατα<sup>338</sup> και δείχνει πως οι πρωτεΐνες αυτές έχουν κριτικό ρόλο στην T-κυτταρική διαφοροποίηση σε πολύ πρώιμο στάδιο, πριν τη β-επιλογή, στα θυμοκύτταρα από αυτά τα πειραματόζωα. Παλαιότερη μελέτη<sup>346</sup> σε πειραματόζωα (ποντίκια) και κυτταρικές σειρές, με κυτταρομετρία ροής, προτείνει επίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών τόσο στη θετική, όσο και στην αρνητική επιλογή, προκειμένου αυτές οι επιλογές να πραγματοποιούνται κατά ορθό τρόπο, αν και οι Williams O. και συν.<sup>348</sup> υποστήριζαν σε μελέτη με πειραματόζωα (ποντίκια) και καλλιέργεια οργάνων, με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, πως το bax δεν επηρεάζει την αρνητική επιλογή.

Ακόμη, άλλοι ερευνητές, μέσω μελέτης πειραματοζώων (ποντίκια) με κυτταρομετρία ροής και άλλες κυτταρικές μετρήσεις, προτείνουν πως στα θυμοκύτταρα, η αναστολή της ενεργοποίησης του bax γίνεται μέσω του bim και αυτό με τη σειρά του, βρίσκεται υπό το ρυθμιστικό ρόλο που ασκεί πάνω του το bcl-2<sup>344</sup>. Η αλληλοεπικαλυπτόμενη ανοσοτοπογραφική έκφραση στη μελέτη μας των bax, bim και bcl-2 πρωτεϊνών συμβαδίζει με την ανωτέρω υπόθεση. Όσον αφορά την έκφραση της bax πρωτεΐνης στα Double Positive κύτταρα του φλοιού, είναι άγνωστο αν η δράση της αναστέλλεται από αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες που εκφράζονται εκεί (π.χ. bcl-xL) ή αν απλά η πρωτεΐνη είναι αδρανής σε αυτό το στάδιο.

Η προαποπτωτική πρωτεΐνη bim, αναγνωρίζεται σε λίγα θυμικά λεμφοκύτταρα στο μυελό και μεμονωμένα στο φλοιό. Αυτά, είναι σε συμφωνία με μελέτη που πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής σε θυμοκύτταρα από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο και η οποία έδειξε ότι η έκφραση της bim αναγνωρίζεται τόσο στα Single Positive θυμοκύτταρα (άρα στο μυελό), όσο και στα Double Positive (άρα εκείνα που βρίσκονται στο φλοιό)<sup>345</sup> και ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται πιο έντονα στο μυελό.

Έχει αναφερθεί πως η bim πρωτεΐνη, δρα κατά προτίμηση στο bax και όχι στο bak, στα θυμοκύτταρα<sup>347</sup>. Αυτό ίσως δείχνει πως επιδρά συνεργιστικά με το bax στο μυελό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της αρνητικής επιλογής και πιο συγκεκριμένα το bim εξαρτώμενο μονοπάτι αυτής<sup>347</sup>. Επιπλέον, έχει βρεθεί σε πειράματα με θυμοκύτταρα, από υλικό που ελήφθη από διαγονιδιακά ποντίκια, πως το bak, δεν είναι “ικανό” να προωθήσει τη εκτέλεση της αρνητικής επιλογής, αν οι πρωτεΐνες bax και bim απουσιάζουν<sup>360</sup>, ενώ οι Bouillet P. και συν.<sup>349</sup> μετά από πειράματα σε άγριου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια με τις τεχνικές της κυτταρομετρίας ροής και της ανοσοκαθίζησης, και αφού πρώτα είχαν επιδράσει στα

πειραματόζωα με ερεθίσματα που προκαλούν κυτταρικό θάνατο (π.χ. γ-ακτινοβολία, έλλειψη κυτταροκινών, κορτιζόνη, ιονομυκίνη κ.α.), πρότειναν πως η απώλεια του bim, οδηγεί σε απώλεια της αρνητικής επιλογής.

Μελέτες από την ομάδα των Bouillet P. και συν. σε διαγονιδιακά ποντίκια (διπλά knockout) με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής<sup>339</sup>, καθώς και σε διαγονιδιακά ποντίκια (knockout) με τις τεχνικές της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και της κυτταρομετρίας ροής, μετά όμως από την επίδραση εξωγενούς ερεθίσματος που επάγει θάνατο<sup>349</sup>, έχουν δείξει πως η έλλειψη του bim, αλλά όχι του bax, είναι επαρκής ώστε να διαφύγουν τον κυτταρικό θάνατο τα πειραματόζωα των μελετών. Αυτό, σε συνδυασμό με τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματά μας που δείχνουν πως η bim πρωτεΐνη εμφανίζεται στο μυελό, όπου κυρίως εκφράζεται και η bcl-2, ίσως υποδηλώνει μια εν μέρει δράση της bcl-2 προς την κατεύθυνση αδρανοποίησης της bim ή το αντίστροφο, πως δηλαδή η bim εξουδετερώνει την αντιαποπτωτική δράση της bcl-2, επιδρώντας έτσι εμμέσως, στην ενεργοποίηση των bak/bax με βάση το έμμεσο μοντέλο που έχουμε αναφέρει στην εισαγωγή.

Σε πειράματα με T-λεμφοκύτταρα από διαγονιδιακά ποντίκια με τις τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Real-Time PCR) και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, προτάθηκε πως σε πρωτεϊνικό επίπεδο το bim και το bcl-2, ρυθμίζονται αμοιβαία<sup>361</sup>. Αντίθετα, η bcl-2 πρωτεΐνη, μπορεί να επιδρά στο bax και να προκαλεί είτε αναστολή της ενεργοποίησής του, είτε αποτροπή της δημιουργίας συμπλεγμάτων με άλλες προαποπτωτικές πρωτεΐνες. Πάντως, πρόσφατα στοιχεία, που προέρχονται από πειράματα σε κυτταρικές σειρές<sup>362</sup> και σε διαγονιδιακά ποντίκια (knockin mice)<sup>363</sup>, αλλά και στοιχεία από παλαιότερες μελέτες σε κυτταρικές σειρές<sup>364</sup>, συνδυάζουν τα ανωτέρω ευρήματα και προτείνουν πως το bim εκδηλώνει την πλήρη προαποπτωτική δραστηριότητά του, τόσο μέσω της έμμεσης ενεργοποίησης (σύνδεση με αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες), όσο και μέσω της άμεσης ενεργοποίησης (σύνδεση με το bax). Συμπληρώνεται δε, πως το bim δρα πριν από τα bax και bak και είναι ο κύριος ανάρους ρυθμιστής τους<sup>365</sup>.

Η bad πρωτεΐνη είναι η δεύτερη (μετά την bak) από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν και η οποία δεν ανέδειξε ανοσοϊστοχημική έκφραση στα θυμοκύτταρα. Αυτό είναι σύμφωνο με μία παλαιότερη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε σε τομές παραφίνης από μια ποικιλία φυσιολογικών ανθρώπινων ιστών που προερχόταν από νεκροτομή ή βιοψία, ανάμεσά τους και ο θύμος αδένας, όπου επίσης δεν αναγνωρίστηκε έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης<sup>366</sup>. Επιπλέον,

σε άλλη μελέτη<sup>367</sup> με διαγονιδιακά ποντίκια και με τεχνικές ανοσοαποτύπωσης κατά Western, δοκιμασίες απόπτωσης και ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν πολύ μικρό και αυξήθηκε μόνο όταν επέδρασε ισχυρό αποπτωτικό ερέθισμα. Αυτά, ενδεχομένως δείχνουν, ένα ρυθμιστικό ρόλο που έχει η bad πρωτεΐνη στην απόπτωση των ωριμαζόντων θυμοκυττάρων. Ακόμη, έχει βρεθεί πως το bad επιδρά άμεσα στις διαδικασίες που εμπλέκονται στην επιλογή των T-κυττάρων. Συγκεκριμένα, διαταράσσει την ομαλή θετική επιλογή και αυξάνει το ποσοστό της αρνητικής, όπως έδειξαν σε μελέτη με πειραματόζωα (διαγονιδιακά ποντίκια) οι Mok CL και συν.<sup>367</sup> Παρόλο λοιπόν που η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά, μάλλον λόγω μικρότερης ευαισθησίας της τεχνικής, φαίνεται να επιδρά στη ρύθμιση ωρίμανσης των T-κυττάρων.

Τελευταία από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, η bid, εμφάνισε όπως και η bax, σχεδόν καθολική έκφραση στα θυμοκύτταρα και στις δύο ανατομικές περιοχές του αδένου. Η εκτεταμένη έκφραση στα θυμικά λεμφοκύτταρα της bid πρωτεΐνης, που αποτελεί το πρόδρομο μόριο της ενεργοποιημένης της μορφής (tBID), ενδεχομένως δείχνει, την ικανότητα του θυμοκυττάρου να παράγει σε όλα τα στάδια της ωρίμανσής του τον BH3-ενεργοποιητή (tBID), που με τη σειρά του θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση των κασπασών και την απόπτωση του κυττάρου<sup>265</sup>. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί πως το bid και το bax μοιράζονται αρκετά βιολογικά χαρακτηριστικά που ρυθμίζουν τη μετανάστευση των πρωτεϊνών τους στις μεμβράνες και τα οποία είναι διαφορετικά από αυτά άλλων BH3-only πρωτεϊνών, όπως της bim και του bad. Για το λόγο αυτό οι Billen LP και συν.<sup>368</sup> προτείνουν πως το bid είναι σημαντικό για τη γρήγορη μετανάστευση και είσοδο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μετά από την πρωτεολυτική του κατάτμηση. Την είσοδο δε στη μεμβράνη την πραγματοποιεί με τρόπο ανάλογο με την πρωτεΐνη bax. Με βάση τα ανωτέρω είναι συμβατή η αλληλοεπικαλυπτόμενη ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των δύο πρωτεϊνών (bid και bax) στα θυμοκύτταρα, καθώς η ενεργοποιημένη μορφή της bid βρίσκεται στο άμεσο περιβάλλον της bax σε όλα τα θυμοκύτταρα προκειμένου να μπορέσουν να προσκολληθούν και να εισέλθουν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να προχωρήσει η αποπτωτική διαδικασία. Τέλος, η αναφερόμενη εμπλοκή του bid στο αρχικό στάδιο επιλογής των προγονικών λεμφοκυττάρων στο θύμο<sup>369</sup> σε μελέτη με πειραματόζωα (ποντίκια) και τεχνικές κυτταρομετρίας ροής, κυτταρικός διαχωρισμός, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-Time PCR) και



ανοσοαποτύπωσης κατά Western, είναι σύμφωνη με την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης στα θυμοκύτταρα της φλοιικής περιοχής στη μελέτη μας.

Όσον αφορά τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, σε κυτταρικό επίπεδο, έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη bcl-2 εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, του πυρηνικού “φακέλου” και στη μιτοχονδριακή<sup>370</sup>. Σε ιστικό επίπεδο, η bcl-2 πρωτεΐνη εντοπίστηκε στα ώριμα T-λεμφοκύτταρα της μυελικής ζώνης. Στη φλοιική περιοχή, όπου κυριαρχούν τα άωρα διπλά-θετικά (CD4+CD8+) λεμφοκύτταρα (Double Positive), η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε μεμονωμένα κύτταρα. Η συντριπτική πλειοψηφία των φλοιικών άωρων λεμφοκυττάρων θα αποπέσουν και μόνο ένα μικρό ποσοστό θα μεταναστεύσει στο μυελό. Εκεί τα άωρα λεμφοκύτταρα ωριμάζουν (CD4+ ή CD8+) και ταυτόχρονα αποκτούν έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης. Φαίνεται λοιπόν, πως η πρωτεΐνη αυτή έχει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης κατά τη διάρκεια της θετικής επιλογής στο φλοιό<sup>371</sup>, όπως φάνηκε σε πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια. Επιπλέον, παρόλο που ο θύμος είναι ένα όργανο εκλεκτικής απόπτωσης, η ανοσοέκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης περιορίζεται στην περιοχή των ώριμων λεμφοκυττάρων που έχουν επιβιώσει και τα οποία είναι οι πρόγονοι των ώριμων T-λεμφοκυττάρων της περιφέρειας, δείχνοντας, πως εμπλέκεται στη διαδικασία επιβίωσης των λεμφοκυττάρων του μυελού. Τα ευρήματά μας αυτά, είναι σε συμφωνία με ευρήματα από μελέτες που προηγήθηκαν με διάφορες τεχνικές όπως ανοσοφθορισμός, ανοσοαποτύπωση κατά Western, κυτταρομετρία ροής και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης<sup>308,341,345,372,373</sup>.

Επιπρόσθετα, εφόσον η πρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται σε όλα τα μυελικά λεμφοκύτταρα, ανεξάρτητα αν είναι CD4+ (4Single Positive) ή CD8+ (8Single Positive), αυτή η ευρεία έκφραση υποδηλώνει ότι ίσως η πρωτεΐνη εκφράζεται μετά την ολοκλήρωση της αρνητικής θυμικής επιλογής<sup>374</sup>. Ακόμη το γεγονός ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια που στερούνταν την έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης υπήρξε παραγωγή ώριμων T-λεμφοκυττάρων, ενισχύει την προηγούμενη υπόθεση. Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία υπάρχουν και ακριβώς αντίθετα συμπεράσματα<sup>348</sup> όπως προκύπτουν από πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια με κυτταρομετρία ροής. Κατά συνέπεια απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση του ρόλου της bcl-2 πρωτεΐνης στη διαδικασία της αρνητικής επιλογής.

Η πρωτεΐνη bcl-xL, είναι μία ακόμη αντιαποπτωτική πρωτεΐνη που παρουσιάζει περιορισμό, όσον αφορά την κυτταρική της κατανομή, στο θύμο αδένα.

Εμφανίζει έντονη ανοσοέκφραση στα κύτταρα του φλοιού, όπου ο κυρίαρχος κυτταρικός πληθυσμός είναι τα Double Positive, ενώ στο μυελό η έκφρασή της περιορίζεται σε σπάνια μεμονωμένα λεμφοκύτταρα. Πιθανώς, τα τελευταία να είναι CD8<sup>+</sup> (8Single Positive) θυμοκύτταρα<sup>345</sup>, αφού πειραματικά δεδομένα με κυτταρομετρία ροής σε ανθρώπινα φυσιολογικά θυμοκύτταρα, δείχνουν πως η έκφραση του bcl-xL είναι πολύ μικρή στα CD4<sup>+</sup> (4Single Positive) που είναι ο κύριος λεμφοκυτταρικός πληθυσμός στο μυελό του θύμου, κάτι που πιθανώς να είναι υπεύθυνο για την απουσία ανοσοχρώσης των θυμικών λεμφοκυττάρων στο μυελό. Η παρουσία όμως της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη φλοιική περιοχή, ενδεχομένως σχετίζεται είτε με τα σήματα επιβίωσης που λαμβάνουν τα περισσότερα άωρα κύτταρα (CD3-CD4+CD8+) που έχουν TCR υποδοχέα, πριν τη διαδικασία της θετικής τους επιλογής<sup>306,342</sup> όπως προκύπτει από μελέτες σε πειραματόζωα και ανθρώπινους ιστούς, είτε με την προστασία των ανώριμων Double Positive κυττάρων από το θάνατο από αμέλεια<sup>375</sup>, όπως επίσης φάνηκε σε μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια, ώστε να τους δοθεί η δυνατότητα να αποκτήσουν αβTCR<sup>342,376</sup>. Εξάλλου, σε καλλιέργειες κυττάρων, έχει βρεθεί πως η έκφραση της bcl-xL δεν είναι περιττή, καθώς η ελάττωσή της οδηγεί σε διαταραχή στην επιβίωση των προεπιλεγμένων Double Positive<sup>377</sup>, ενώ ποντίκια χωρίς έκφραση της bcl-xL παρουσίαζαν μαζική απόπτωση των Double Positive θυμοκυττάρων<sup>378</sup>. Παρατηρήσεις σε θυμοκύτταρα από ποντίκια, έδειξαν πως η bcl-xL πρωτεΐνη βρίσκεται τόσο σε διαλυτή μορφή, όσο και συνδεδεμένη με μεμβρανικές δομές<sup>379</sup>.

Η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη mcl-1, παρουσίασε πρότυπο ανοσοέκφρασης στα θυμοκύτταρα ανάλογο με αυτό της bcl-2 πρωτεΐνης. Σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες<sup>309</sup>, η έκφρασή της είναι εντοπισμένη στην περιοχή με τα πιο ώριμα λεμφοκύτταρα, δηλαδή το μυελό, καθώς και στη φλοιομυελική περιοχή, όπου κυρίως απαντώνται τα Double Negative 1 (DN1) λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαγονιδιακά ποντίκια με κυτταρομετρία ροής και ανοσοαποτύπωση κατά Western, υποστήριξαν πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται και στους υπόλοιπους υπότυπους των θυμικών λεμφοκυττάρων (Double Negative 2-4, Double Positive)<sup>340,343</sup>, προτείνοντας επίδραση της πρωτεΐνης σε όλα τα στάδια της T-κυτταρικής ανάπτυξης. Με βάση τη δική μας μελέτη, η οποία όμως είναι σε ανθρώπινο ιστό και με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, η πρωτεΐνη mcl-1, φαίνεται να ασκεί επίδραση στο εντελώς αρχικό και τελικό στάδιο ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων. Επιπρόσθετα, η ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών mcl-1 και bim

στα ώριμα θυμοκύτταρα (μυελός), είναι σε συμφωνία με μελέτη ανοσοκαθίζησης πρωτεϊνών από ομογενοποιημένα θυμοκύτταρα, προερχόμενα από πειραματόζωα, που έδειξε πως το *mcl-1* αλληλεπιδρά με το *bim* και όχι το *bad*<sup>350</sup>.

Αν και οι πρωτεΐνες *bcl-2*, *bcl-xL* και *mcl-1* είναι γενικά αναστολείς του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, η βιολογική λειτουργία της καθεμίας φαίνεται να είναι ξεχωριστή, επιδρώντας σε διαφορετικά στάδια της T-κυτταρικής ανάπτυξης, με αποτέλεσμα τη διαφορετική επιρροή στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Στις περιπτώσεις σύγκρισης του *bcl-xL* με τα *bcl-2* και *mcl-1*, αυτό είναι εμφανές αφού εντοπίζονται σε διαφορετικό κυτταρικό πληθυσμό. Ανάμεσα στα *bcl-2* και *mcl-1*, παρόλο που η τοπογραφική ανοσοέκφραση είναι σχεδόν ίδια, έχει βρεθεί πως σε κυτταρική σειρά μυελοβλαστικής λευχαιμίας εμφάνισαν αντίθετα πρότυπα έκφρασης<sup>380</sup>, ενώ και σε θυμικά καρκινώματα η δράση τους φαίνεται να είναι διαφορετική<sup>309</sup>. Επίσης θεωρείται πιθανό, πως οι διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες των *bcl-2* και *mcl-1*, εν μέρει αντικατοπτρίζονται και στο διαφορετικό τρόπο που συνδέονται με τη μιτοχονδριακή μεμβράνη (ισχυρότητα σύνδεσης, διαφορετικοί μεμβρανικοί υποδοχείς εισόδου στο οργανίδιο)<sup>381,382</sup>. Αντίθετα, τα αποτελέσματα από μελέτη σε γενετικά μοντέλα σε πειραματόζωα, οδήγησαν στην άποψη πως το *mcl-1* πιθανώς συνεργάζεται με το *bcl-2*, στην αναστολή του *bax*<sup>344</sup>. Ακόμη, έχει προταθεί από πειραματικά δεδομένα πως τα CD8+ T-κύτταρα εξαρτώνται περισσότερο από το *mcl-1*, από ότι τα CD4+ θυμοκύτταρα<sup>343</sup>. Φαίνεται λοιπόν, πως το *mcl-1* έχει διαφορετικούς ρόλους σε διάφορους τύπους κυττάρων και αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε ποικιλία στην έκφραση των διαφόρων πρωτεϊνών της *bcl-2* οικογένειας.

Στη μελέτη μας, η πρωτεΐνη FLIP<sub>S/L</sub> δεν αναδείχθηκε ανοσοϊστοχημικά στα θυμικά λεμφοκύτταρα, παρόλο που από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια και κυτταρικές σειρές, φαίνεται πως το FLIP<sub>S/L</sub> έχει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη των CD4+ (4Single Positive) και CD8+ (8Single Positive) θυμοκυττάρων, αλλά και στα TCRαβ Double Negative κύτταρα<sup>383</sup> και γενικότερα στην επαρκή ανάπτυξη των ώριμων θυμοκυττάρων<sup>384,385</sup>. Μία εξήγηση για τη μη ανίχνευση της ανοσοέκφρασης της FLIP<sub>S/L</sub> είναι το γεγονός πως η ισομορφή L της πρωτεΐνης, η οποία είναι και αυτή που κυριαρχεί, έχει μικρή διάρκεια ζωής<sup>386</sup> και επομένως αυτό, ενδεχομένως οδηγεί στη γρήγορη αποδόμησή της και άρα δύσκολη ανίχνευσή της με την τεχνική που εφαρμόσαμε. Μια άλλη υπόθεση είναι ότι τα επίπεδα έκφρασης ήταν χαμηλά και μη ανιχνεύσιμα με την ανοσοϊστοχημεία.

Η πρωτεΐνη survivin, αν και εκφράζεται σχεδόν καθ' ολοκληρίαν κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του οργανισμού, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός φυσιολογικών ώριμων ιστών (θύμος, όρχις, ενδομήτριο, εντερικός βλεννογόνος) εκφράζει σε αφθονία τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη μαζί με τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα<sup>113,310</sup> υποδηλώνοντας ενδεχομένως έτσι ένα περιορισμένο ρόλο στους φυσιολογικούς ώριμους ιστούς. Ανάμεσα στους ιστούς που εκφράζεται και ανιχνεύεται η πρωτεΐνη, είναι και ο θύμος αδένας<sup>374</sup>. Εκεί πιστεύεται ότι συμμετέχει στην ωρίμανση ή/και ανάπτυξη των T κυττάρων, καθώς και την ομοιόσταση και τον πολλαπλασιασμό τους σε διάφορα στάδια<sup>113</sup>. Η πυρηνική ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης στα λεμφοκύτταρα σε πολύ μικρό ποσοστό, είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα από πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινο φυσιολογικό ιστό<sup>310</sup> σε τομές παραφίνης, με άλλο όμως κλώνο αντισώματος (clone 12C4, Dako, M3624). Συναντούμε εδώ και πάλι το φαινόμενο να υπάρχουν από ένα μόριο (survivin) υψηλά επίπεδα mRNA έκφρασης<sup>220,230</sup>, ενώ το ποσό που εκφράζεται με τη μορφή της πρωτεΐνης να είναι ανιχνεύσιμο σε λίγα μόλις κύτταρα, να είναι δηλαδή πολύ χαμηλό. Αυτό δείχνει πως τα επίπεδα mRNA της survivin δεν αντικατοπτρίζουν επακριβώς την ποσότητα της τελικής έκφρασης της πρωτεΐνης στα κύτταρα του ιστού. Επιπλέον, η έκφραση της survivin, δεν είναι ευθέως ανάλογη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού<sup>388</sup>.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του κυτταρικού επιφανειακού υποδοχέα Fas δεν ανιχνεύθηκε στην παρούσα εργασία στα θυμικά λεμφοκύτταρα, εύρημα σύμφωνο με προηγούμενη ανοσοϊστοχημική μελέτη (Fas, 1:100, polyclonal, Santa Cruz) με τομές παραφίνης σε ομάδα ελέγχου (φυσιολογικός ανθρώπινος θύμος)<sup>322</sup>. Τα ίδια αποτελέσματα διαπίστωσαν και οι Onodera J. και συν.<sup>352</sup> στην ανοσοϊστοχημική τους μελέτη (Fas, mouse monoclonal, MBL) σε τομές κρυστάτη, σε υλικό από ανθρώπινο θύμο με μυασθένεια Gravis και σε φυσιολογικούς ανθρώπινους θύμους (ομάδα ελέγχου). Ωστόσο όμως, μελέτη με κυτταρομετρία ροής σε φυσιολογικά και διαγονιδιακά ποντίκια, αναφέρει πως τα θυμοκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα Fas<sup>389-393</sup>. Οι διαφορές πιθανώς αντανακλούν διαφορετική ευαισθησία στις μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και κυτταρομετρίας ροής.

Ανοσοέκφραση του συνδέτη του Fas (FasL) αναγνωρίζεται σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα στο φλοιομυελικό όριο. Οι Park SH. και συν.<sup>322</sup> στην ομάδα ελέγχου που χρησιμοποίησαν στη μελέτη τους (φυσιολογικός ανθρώπινος θύμος), δεν ανέδειξαν ανοσοϊστοχημικά έκφραση της πρωτεΐνης FasL (1:100, polyclonal, Santa

Cruz) στα θυμοκύτταρα. Από πειράματα σε κυτταρικές σειρές, επιβεβαιώθηκε η πολύ ασθενής έκφραση της πρωτεΐνης FasL στα θυμοκύτταρα και η δυσκολία που κατά συνέπεια αυτή παρουσιάζει στην ανοσοϊστοχημική ανίχνευσή της, παρόλο που για άλλη μια φορά έχει βρεθεί πως το αντίστοιχο mRNA του συνδέτη του Fas εκφράζεται επαρκώς<sup>394</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα ασθενούς έκφρασης της πρωτεΐνης FasL, αναφέρονται και στη μελέτη των Suda T. και συν.<sup>395</sup> Επιπλέον, με την τεχνική του *in situ* υβριδισμού σε ιστό από ανθρώπινο θύμο, αναδείχθηκαν θετικά θυμοκύτταρα τόσο στο φλοιομυελικό όριο, όσο και υποκαψικά, όμως με ανοσοϊστοχημεία σε τομές κρυστάτη από τον ίδιο ιστό, η πρωτεΐνη εμφάνισε ασθενή μόνο ανοσοθετικότητα σε θυμοκύτταρα του φλοιομυελικού ορίου<sup>315</sup>, αποτελέσματα δηλαδή συμβατά με τα δικά μας.

Η καθολική έκφραση της κασπάσης-3 στην ανενεργό της μορφή στα λεμφοκύτταρα τόσο στο μυελό όσο και στο φλοιό, ενδεχομένως καταδεικνύει τη σημασία του μορίου στην απόπτωση, καθώς είναι η κασπάση που ενεργοποιείται και από τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης (εξωγενές και ενδογενές). Επομένως, υπάρχει επαρκής έκφραση της πρωτεΐνης στην ανενεργό μορφή, ώστε μόλις δημιουργηθούν συνθήκες για ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας, το κύτταρο να μπορεί άμεσα να ολοκληρώσει τη διαδικασία μέσω ενεργοποίησής της. Εξάλλου, οι Alam και συν. με τη μελέτη τους σε ποντίκια και την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ανέφεραν πως η κασπάση-3 ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της αρνητικής επιλογής στο θύμο, προτείνοντας έτσι ένα ρόλο αυτής της κασπάσης στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων<sup>396</sup>.

Η εντόπιση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 στη μελέτη μας είναι σύμφωνη με αντίστοιχη εντόπιση που έχει βρεθεί σε πειραματικά δεδομένα από ποντίκια<sup>311,397</sup>. Είναι επίσης σύμφωνη με την ανάδειξη μικρότερου ποσοστού αποπτωτικών κυττάρων σε σύγκριση με τη μέθοδο TUNEL, όπως διατύπωσαν στο πείραμά τους οι Resendes AR. και συν.<sup>311</sup>. Αυτό προφανώς συμβαίνει, διότι η μέθοδος TUNEL ανιχνεύει κατατμήσεις του DNA που μπορεί να συμβούν όχι μόνο στην απόπτωση, αλλά και κατά τη διαδικασία της μίτωσης, στη νέκρωση και στη διόρθωση βλαβών του DNA, αλλά και από την επεξεργασία του ιστού<sup>398-400</sup>.

Η κυκλίνη A είναι μία κυκλίνη της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου, η κυκλίνη B1 είναι μία μιτωτική κυκλίνη, ενώ η κυκλίνη E ονομάζεται κυκλίνη της G1-φάσης. Οι τρεις αυτές κυκλίνες εμφάνισαν παρόμοια ανοσοτοπογραφική κατανομή. Δηλαδή μεγαλύτερη ανοσοέκφραση στα θυμοκύτταρα του φλοιού, με τάση



ελάττωσης αυτής της ανοσοέκφρασης κατά τη μετάβαση προς το μυελό. Αυτό το εύρημα συνδυάζεται με προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας<sup>324</sup> σχετικά με την τοπογραφική ανοσοέκφραση του p27 που είναι αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, αλλά και από ευρήματα των Sanchez-Beato M. και συν.<sup>401</sup> σε φυσιολογικό θύμο. Συνεπώς, η έκφραση του p27 ακολουθεί αντίστροφη φορά σε σχέση με αυτή των αναφερόμενων ανωτέρω κυκλινών, καθώς παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση του p27 στο μυελό και μικρότερη στο φλοιό.

Η αντίστροφη αυτή σχέση έκφρασης του p27 με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έχει υποστηριχθεί και από άλλες μελέτες<sup>402</sup>. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ανοσοτοπογραφική έκφραση του p27 μπορεί να αποδοθεί και στη συμμετοχή του στην απόπτωση. Θυμοκύτταρα που υφίστανται απόπτωση αποδομούν την p27 πρωτεΐνη. Η θυμοκυτταρική όμως απόπτωση είναι εντονότερη στο φλοιό και τη φλοιομυελική περιοχή, όπου και η έκφραση του p27 δικαιολογείται να είναι χαμηλότερη. Συνεπώς, η τοπογραφία της έκφρασης της p27 πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει μέσω βιοχημικών μονοπατιών στα αντίθετα ακριβώς επίπεδα έκφρασης των κυκλινών A, E, καθώς και της D3.

Οι D τύπου κυκλίνες (D2 και D3) που μελετήθηκαν, ονομάζονται κυκλίνες της G1-φάσης του κυτταρικού κύκλου. Εκφράζονται νωρίτερα, πριν την κυκλίνη E, που αποτελεί επίσης μία G1-κυκλίνη. Αμφότερες οι κατηγορίες κυκλινών της G1-φάσης, επιτρέπουν στο κύτταρο να προχωρήσει στην επόμενη φάση, την S. Έχει διατυπωθεί η άποψη με βάση τα αποτελέσματα από διαγονιδιακά ποντίκια<sup>403,404</sup>, πως οι D τύπου κυκλίνες έχουν δράσεις που είναι ειδικές για τον ιστό στον οποίο εκφράζονται<sup>405</sup>. Αρχικά, διάφορες αναφορές υποστήριζαν ένα αλληλοεπικαλυπτόμενο ρόλο των D τύπου κυκλινών. Τα τελευταία χρόνια όμως, είναι εμφανές πως κάθε μέλος αυτής της κατηγορίας έχει έναν ειδικό ρόλο και εκφράζεται με διαφορετικό τρόπο σε κάθε ιστό<sup>406</sup>.

Η D2 κυκλίνη στη μελέτη μας αναγνωρίστηκε στα θυμοκύτταρα του μυελού, καθώς και σε μεμονωμένα φλοιικά θυμοκύτταρα. Δηλαδή η έκφρασή της, εντοπίζεται περισσότερο σε περιοχές όπου δεν υπάρχει υψηλός κυτταρικός πολλαπλασιασμός, όπως είναι ο μυελός, ενώ στο φλοιό έχει χαμηλή έκφραση. Αυτό συμβαδίζει και με ανοσοϊστοχημικά δεδομένα σε τομές παραφίνης από φυσιολογικούς λεμφαδένες, όπου η κυκλίνη D2 δεν ανιχνεύθηκε στο βλαστικό κέντρο<sup>407</sup>, όπου αναγνωρίζεται υψηλός κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Οι Bryja V και συν.<sup>408</sup> υποστήριξαν πως στα κύτταρα του θύμου, τα συμπλέγματα κυκλίνη A/E-CDK2 και κυκλίνη D-CDK4, είναι δραστικά όταν απουσιάζει το p27. Φυσιολογικά το p27 ενώνεται δυναμικά με αυτά τα συμπλέγματα προκειμένου να ρυθμίσει αυτή τη δραστικότητα τους. Ενώ όμως, οι D τύπου κυκλίνες και το p27 λειτουργούν πρωταρχικά με αντίθετο τρόπο στις περιπτώσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η δράση τους προς την ίδια κατεύθυνση φαίνεται να είναι τυπική όταν αυτές οι δύο κατηγορίες μορίων συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση. Αυτή η “διπλή” συμπεριφορά ενδεχομένως εξηγεί και την ίδια “κλίση” ανοσοϊστοχημικής έκφρασης που παρουσιάζουν η κυκλίνη-D2 και το p27, καθώς την ίδια στιγμή όλες οι άλλες κυκλίνες που μελετήθηκαν εμφάνισαν αντίθετα πρότυπα έκφρασης στα φλοιικά και μυελικά λεμφοκύτταρα.

Μία άλλη εξήγηση για την ανοσοτοπογραφική έκφραση της κυκλίνης D2, είναι πως η επαγωγή της έκφρασής της μπορεί να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση, ενώ η έκφραση της κυκλίνης D3 στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα επηρεάζεται από μιτογόνα ερεθίσματα<sup>409-411</sup>. Επιπλέον, από μελέτες κυτταρομετρίας ροής σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος<sup>412</sup>, η κυκλίνη D2, φαίνεται να εκφράζεται σε ηρεμούντα λεμφοκύτταρα, κάτι το οποίο εν πολλοίς ισχύει στο μυελό του θύμου αδένου, όπου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι χαμηλός. Έχει εκφραστεί η άποψη πως η διαφορετική ενζυμική δραστηριότητα των D κυκλινών μπορεί να έχει μια προφανή επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση<sup>412</sup>.

Η ανοσοέκφραση της κυκλίνης D3 αναγνωρίστηκε στα θυμοκύτταρα του φλοιού, εύρημα σύμφωνο με προηγούμενη ανοσοϊστοχημική μελέτη<sup>319</sup>, που μεταξύ των άλλων, χρησιμοποίησε και φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο αδένου σαν ομάδα ελέγχου. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης σε περιοχές αυξημένου πολλαπλασιασμού παρατηρείται γενικά στους λεμφικούς ιστούς<sup>407</sup> (π.χ. λεμφαδένες, αμυγδαλές). Ωστόσο, σε μία μελέτη από ποντίκια η ανοσοθετικότητα των θυμοκυττάρων εντοπίστηκε κοντά στο φλοιομυελικό όριο και μάλιστα σε μικρότερο ποσοστό (10-15%)<sup>320</sup>. Επιπλέον, είναι γνωστό πως η κυκλίνη D3 δεν εκφράζεται σε ηρεμούντα κύτταρα, αλλά η έκφρασή της σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό<sup>409</sup>, καθώς επίσης ότι από πειραματικά δεδομένα υπάρχει η ένδειξη πως έχει ένα διπλό ρόλο, τόσο στην προαγωγή του κυτταρικού κύκλου, όσο και στην κυτταρική διαφοροποίηση φυσιολογικών κυττάρων<sup>413,414</sup> που επηρεάζεται/εξαρτάται όμως από το ιστικό υπόβαθρο. Επίσης τα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης που βρέθηκαν στη

μελέτη μας, επιβεβαιώνουν τα σχετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης της που έχουν παρατηρηθεί σε θύμο αδένα σε πειραματόζωα<sup>320,415</sup>.

Ακόμη, από τις τρεις D τύπου κυκλίνες, μέχρι πριν λίγα χρόνια, βιβλιογραφικά πίστευαν πως μόνο οι D2 και D3 εκφράζονται στα λεμφοκύτταρα<sup>410,416-420</sup>, ωστόσο όμως οι Kaplan D. και συν. έδειξαν σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών, πως η κυκλίνη D1 τελικά εκφράζεται<sup>411</sup>. Στη μελέτη μας δεν ανιχνεύθηκε κυκλίνη D1 σε θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και θυμοκύτταρα. Για τη δυσκολία ανάδειξης της πρωτεΐνης κυκλίνη-D1, οι ερευνητές θεωρούν πως πιθανώς ευθύνεται κάποια ειδική πρωτεάση, η οποία αποδομεί την υπό μελέτη πρωτεΐνη και συνεπώς καθιστά δυσχερή την ανίχνευσή της<sup>343,421</sup>. Μάλιστα παρατηρήθηκε πως σημασία στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης έχει η ενδοκυττάρια εντόπισή της, καθώς η ανίχνευσή της στο κυτταρόπλασμα δεν αποδεικνύει ενεργότητα της πρωτεΐνης, ενώ η πυρηνική της εντόπιση συνοδεύεται από την πολλαπλασιαστική ικανότητα του κυττάρου<sup>320</sup>.

Παρόλα αυτά όμως η ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D1 έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση σε νεοπλασματικούς ιστούς αρκετά χρόνια πριν. Έτσι, έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του λεμφώματος του μανδύα<sup>422,423</sup> όπου πιστεύεται πως η παθογένεση οφείλεται τόσο στην απορύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης, όσο και στην διαταραχή της ενδοκυτταρικής εντόπισής της. Βέβαια, η ένταση της χρώσης και το ποσοστό των ανοσοθετικών κυττάρων ποικίλει από περίπτωση σε περίπτωση<sup>355</sup>. Επίσης η κυκλίνη-D1, στο λεμφικό ιστό ανοσοϊστοχημικά ανιχνεύεται στη λευχαιμία των τριχωτών κυττάρων<sup>424</sup>, ενώ άλλη μελέτη<sup>425</sup> διερεύνησε την έκφρασή της στο πολλαπλούν μυέλωμα. Εκτός όμως από το λεμφικό ιστό η αξιοποίηση της ανοσοέκφρασης της κυκλίνης D1 έχει πραγματοποιηθεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Κάποιες από αυτές είναι η συσχέτιση με την πρόγνωση καρκίνου του πνεύμονα (μη μικροκυτταρικού)<sup>426,427</sup>, καθώς και με την πρόγνωση καρκίνου του μαστού σε άνδρα<sup>428</sup>. Ακόμη σε κουνέλια, ανοσοϊστοχημικά διαπιστώθηκε πως υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκεκριμένη κυκλίνη και την επαγωγή αυξορύθμισης νεοδημιουργίας πνευμονικών αρτηριών όταν τα πειραματόζωα εκτίθεντο σε κάπνισμα.

**Συνολικά στα θυμοκύτταρα** παρατηρείται αύξηση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και mcl1 από το φλοιό στο μυελό, ενώ από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες μόνο οι bax και bid εμφανίζουν υψηλή έκφραση σε φλοιό και μυελό και με μικρή έκφραση της bim στο μυελό. Τα ανωτέρω ευρήματα, σε συνδυασμό με την

παρατηρούμενη, από το φλοιό προς το μυελό, μείωση κυττάρων θετικών για ενεργοποιημένη κασπάση-3, μείωση TUNEL θετικών κυττάρων και μείωση κυττάρων θετικών για κυκλίνες A, B1, D3 και E, υποδηλώνουν μείωση του κυτταρικού δυναμικού πολλαπλασιασμού και αύξηση του δυναμικού επιβίωσης από το φλοιό προς το μυελό. Επιπλέον, η αύξηση έκφρασης της κυκλίνης D2 από το φλοιό προς το μυελό (αντίθετα από τις άλλες κυκλίνες), υποδηλώνει συμμετοχή της κυκλίνης D2 στο πρόγραμμα τελικής διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων.

## **B) Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση απόπτωσης και κυτταρικού κύκλου στο θύμο αδένα με βάση τη διαμερισματοποίηση του οργάνου σε φλοιική και μυελική ζώνη**

Ο θύμος αδένας διαιρείται, σε δύο μεγάλες ανατομικές περιοχές, το φλοιό και το μυελό. Σε καθεμιά από τις λειτουργικά καθορισμένες περιοχές, υπάρχουν οι συνθήκες του αντίστοιχου μικροπεριβάλλοντος, ώστε να επάγονται και να υποστηρίζονται<sup>429</sup> οι διαδικασίες της T-διαφοροποίησης. Έτσι, η μετανάστευση των λεμφοκυττάρων εντός του αδένα και η μετακίνηση δια μέσου κάθε λειτουργικού-σηματοδοτικού μικροπεριβάλλοντος, φαίνεται να είναι κριτικά σημεία για μία ορθή ακολουθία των συμβάντων που σχετίζονται με τη λεμφοκυτταρική διαφοροποίηση. Εξαιτίας του γεγονότος πως τα λεμφικά κυτταρικά συστατικά του θύμου υφίστανται ωρίμανση στο θύμο, καθώς ως ανώριμα κυτταρικά στοιχεία εισέρχονται στο όργανο από το μυελό των οστών και μεταναστεύουν ως ώριμες κυτταρικές μονάδες στην περιφέρεια, η εγκαθίδρυση ενός σταθερού λειτουργικού μικροπεριβάλλοντος, προφανώς εξαρτάται πρωταρχικά από μη-λεμφοειδή κύτταρα. Αν και συνήθως τα κύτταρα αυτά αναφέρονται ως “στρωματικά”, είναι κυρίως επιθηλιακά και μεσεγχυματικά και κατά δεύτερο λόγο νευροενδοκρινικά, μυοειδή, ενδοθηλιακά κ.α.<sup>430</sup> Όλα αυτά, δείχνουν πως τα στρωματικά κύτταρα αποτελούν τις θεμελιώδεις πηγές σημάτων που κατευθύνουν την ωρίμανση των T-θυμικών κυττάρων.

### **B1) Φλοιική Ζώνη**

Στο φλοιό παρατηρούνται θυμοκύτταρα, τα οποία ανάλογα με την ανατομική θέση τους στο φλοιό, επηρεάζεται και το στάδιο ωρίμανσής τους, οι αντιγονικοί υποδοχείς που εκφράζουν και η κατεύθυνση μετακίνησής τους. Συνεπώς, υπάρχουν τα διπλά αρνητικά (Double Negative/DN) λεμφοκύτταρα, που εμφανίζουν διάφορα στάδια ωρίμανσης (stages)<sup>431</sup>. Στον περιμυελικό φλοιό εξέρχονται της αιματικής κυκλοφορίας μέσω της οποίας φτάνουν στο θύμο τα TSP κύτταρα (Thymic Seeding Precursors), τα οποία με τη σειρά τους οδηγούνται στο στάδιο των Double Negative-1 κυττάρων. Μετακινούνται τη συνέχεια στο μέσο του φλοιού όπου μετατρέπονται σε Double Negative-2 και τελικά φτάνουν προς την περιφέρεια, όπου γίνονται Double Negative-3. Σε αυτό το στάδιο υπάρχει και η δέσμευση κυτταρικής σειράς (lineage commitment), για διαφοροποίηση προς κύτταρα της T-σειράς. Με ρυθμίσεις της έκφρασης κάποιων υποδοχέων (π.χ. Rag-1, Rag-2, CD25) προς τα κάτω (downregulation) μεταπίπτουν σε Double Negative-4 και τελικά στην υποκαψική περιοχή μετατρέπονται pre-Double Positive (pre-DP). Στη συνέχεια τα λεμφοκύτταρα



ακολουθούν κεντρομόλο πορεία ως Double Positive (DP) μέχρι περίπου τη φλοιομυελική περιοχή.

Εκτός όμως από τους διάφορους υπότυπους θυμικών λεμφικών κυττάρων, βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>431-435</sup> αναφέρουν και υπότυπους στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (Thymic Epithelial Cells/ TECs), ανάλογα με τα μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά τους χαρακτηριστικά. Υπάρχουν ενδείξεις για πολλές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα στο θύμο αδένα. Πράγματι, σήματα από τα TECs επηρεάζουν την ωρίμανση των θυμοκυττάρων, αλλά και σήματα από τα ωριμάζοντα θυμοκύτταρα επιδρούν στη διαφοροποίηση των TECs.

Στη φλοιική περιοχή, μέσω κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, λαμβάνουν χώρα και διάφορες επιλογές. Αρχικά η β-επιλογή, που θα βεβαιώσει ποια κύτταρα θα αποκτήσουν ικανό/επαρκή λειτουργικά TCR υποδοχέα. Όσα λεμφοκύτταρα δεν αποκτήσουν έναν υποδοχέα αβ-TCR, που να εμφανίζει ικανοποιητική συνάφεια με τα ίδια MHC-πεπτιδικά συμπλέγματα, πεθαίνουν από αμέλεια. Όσα όμως εμφανίσουν μια ενδιάμεση συνάφεια επιλέγονται θετικά (positive selection) και συνεχίζουν την ωρίμανσή τους, με μετατροπή σε Single Positive (SP) CD4+ ή CD8+ και μετακίνηση προς το μυελό, όπου θα γίνει και η αρνητική επιλογή. Τελευταία ωστόσο, υπάρχουν απόψεις<sup>432</sup> που υποστηρίζουν, ότι η αρνητική επιλογή δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά στο μυελό, αλλά πως τα λεμφοκύτταρα που αλληλεπιδρούν με μόρια τάξης MHC-I, υφίστανται τη διαδικασία της αρνητικής επιλογής σε περιοχή του φλοιού.

Με βάση τους ανωτέρω υπότυπους θυμικών λεμφοκυττάρων και επιθηλιακών κυττάρων στο φλοιό, καθώς και τις λειτουργίες που συμβαίνουν στην περιοχή αυτή του φυσιολογικού θύμου αδένα, η ανοσοϊστοχημική μας μελέτη προσφέρει ανοσομορφολογικές ενδείξεις για κάποιους ρόλους που πιθανώς να έχουν οι πρωτεΐνες της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου που εκφράζονται. Η καθολική έκφραση της πρωτεΐνης bax στα θυμοκύτταρα στη φλοιική περιοχή, παρόλο που μελέτες στο παρελθόν δεν κατόρθωσαν να αναδείξουν μια τέτοια έκφραση τοπογραφικά<sup>307,341</sup>, υποδηλώνει έναν ευρύτερο ρόλο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα θυμοκύτταρα, με συμμετοχή σε διάφορα στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης. Παλαιότερη μελέτη αναφέρει<sup>346</sup>, πως για να πραγματοποιηθεί κατά ορθό τρόπο η φλοιική θετική επιλογή, η παρουσία της bax, είναι απαραίτητη. Τελευταία δε, μία ακόμη μελέτη<sup>338</sup>, προτείνει πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ασκεί κάποιο ρόλο στην T-κυτταρική ωρίμανση, πριν

τη β-επιλογή, σε πρώιμο δηλαδή στάδιο φλοιικής ωρίμανσης. Επίσης, μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής περιοχής, εκφράζουν την πρωτεΐνη, εύρημα που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να έχει και κάποιο ρόλο στην επιθηλιακή διαφοροποίηση.

Η πρωτεΐνη bak, δεν αναδείχθηκε ανοσοϊστοχημικά στα φλοιικά T-λεμφοκύτταρα, εύρημα που είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες<sup>345</sup>. Ενδεχομένως η δράση της στα θυμοκύτταρα να επικαλύπτεται από άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον αποπτωτικό μηχανισμό. Παρόλα αυτά, πιο πρόσφατα στοιχεία<sup>346</sup>, θεωρούν πως η πρωτεΐνη bak, συμμετέχει στη διαδικασία της θετικής επιλογής, καθώς και στην ωρίμανση πρώιμων T-λεμφοκυττάρων (πριν τη β-επιλογή). Πιθανώς, με βάση τα δικά μας ανοσοϊστοχημικά ευρήματα, η πρωτεΐνη αυτή να επιδρά στα στάδια της θυμοκυτταρικής ωρίμανσης μέσω του μικροπεριβάλλοντος και πιο συγκεκριμένα μέσω της έκφρασης που παρουσιάζει η bak σε μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού. Σχετικά με την πρωτεΐνη bim, παλαιότερη έρευνα<sup>342</sup> που πραγματοποιήθηκε σε κυτταρικές σειρές και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, αναφέρει πως εντοπίστηκε σε Double Positive κύτταρα, κάτι που συμφωνεί με την ανοσοέκφραση που αναδείξαμε, σε μεμονωμένα όμως, θυμοκύτταρα του φλοιού.

Η έκφραση της πρωτεΐνης bad, δεν αναδείχθηκε στη μελέτη μας, όπως και σε παλαιότερες μελέτες<sup>366</sup>, εκτός και αν επιδρούσε εξωτερικό ερέθισμα. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι η bad εμπλέκεται στις T-κυτταρικές επιλογές και συγκεκριμένα για το φλοιό, φαίνεται πως διαταράσσει τη θετική επιλογή. Η πρωτεΐνη bid, όπως και η bax, εμφάνισε καθολική έκφραση στα θυμοκύτταρα του φλοιού, επιβεβαιώνοντας με την ανοσοϊστοχημική της παρουσία, πως εμπλέκεται στο αρχικό στάδιο επιλογής προγονικών λεμφοκυττάρων, όπως μελέτη αναφέρει<sup>369</sup>. Ακόμη, η αλληλοεπικάλυψή της με την πρωτεΐνη bax, δεδομένου πως χρησιμοποιούν κοινά “μονοπάτια” στην ενδοκυττάρια μετακίνησή τους, υποστηρίζει έναν ευρύτερο ρόλο της πρωτεΐνης bid στην T-κυτταρική διαφοροποίηση. Η έκφραση της bid σε όλα τα θυμοκύτταρα, υποδηλώνει τη δυνατότητα δημιουργίας της ενεργοποιημένης μορφής της πρωτεΐνης bid (tBid) που μπορεί να συντελέσει στην περαιτέρω εκτέλεση της αποπτωτικής διαδικασίας. Επιπρόσθετα, η μικρή υποκαψική και μέτρια φλοιική έκφραση της πρωτεΐνης bid στα επιθηλιακά κύτταρα, υποδηλώνει πως και το φλοιικό μικροπεριβάλλον συμμετέχει με ερεθίσματα σχεδόν σε όλα τα στάδια της κυτταρικής ωρίμανσης. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλειστεί και ένας ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και στη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του φλοιού.

Η bcl-2 πρωτεΐνη εκφράστηκε σε μεμονωμένα λεμφικά και επιθηλιακά κύτταρα. Η μικρή της έκφραση στα ανώριμα T-λεμφοκύτταρα του φλοιού, υποστηρίζει την άποψη πως έχει κάποιο ρόλο μέσω δυναμικού επιβίωσης στη θετική επιλογή των θυμικών λεμφοκυττάρων. Η bcl-xL πρωτεΐνη εμφανίζει καθολική έκφραση στα θυμοκύτταρα του φλοιού. Η αναγνώρισή της στην περιοχή αυτή, πιθανώς σχετίζεται με τις διαδικασίες ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων και πιο συγκεκριμένα με την παροχή δυνατότητας στα Double Positive κύτταρα, ώστε να αποκτήσουν αβTCR υποδοχέα ή με την επιβίωση πιο άωρων κυττάρων (CD3-CD4+CD8+) που διαθέτουν TCR υποδοχέα πριν “υποστούν” τη θετική επιλογή. Επιπλέον, μελέτες<sup>377,378</sup> (σε καλλιέργεια κυττάρων και ποντίκια) έχουν υποστηρίξει πως διαταραχή έκφρασης (ελλάτωση ή απώλεια) της bcl-xL, οδηγεί και σε διαταραχή του αριθμού των Double Positive κυττάρων που τελικά θα επιβιώσουν. Τα τελευταία ευρήματα συγκλίνουν με την ανοσοτοπογραφική έκφραση της πρωτεΐνης bcl-xL, ώστε να συμβάλλει, με βάση και τα στοιχεία των ανωτέρω μελετών<sup>378,381</sup>, στην ομαλή ωρίμανση των άωρων θυμοκυττάρων του φλοιού.

Η mcl-1, παρουσίασε στη μελέτη μας μια πιο περιορισμένη έκφραση, σε σχέση με αυτή που έχει περιγραφεί σε άλλες μελέτες<sup>340,343</sup> (οι οποίες όμως δεν έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπινο ιστό, ούτε με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές). Έτσι, ενώ περιγράφεται έκφραση της πρωτεΐνης σε όλα τα στάδια των διπλά αρνητικών θυμοκυττάρων (Double Negative 1-4) στο φλοιό, επομένως και μια πιο διάχυτη εντόπισή της στο φλοιό, στη μελέτη μας η πρωτεΐνη αναδείχθηκε μόνο στην περιοχή όπου εντοπίζονται τα T-κύτταρα στο πρώτο στάδιο ωρίμανσής τους. Συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκε στην φλοιομυελική περιοχή, δηλαδή κυρίως στα κύτταρα Double Negative-1 που συναντώνται εκεί. Με βάση τα ευρήματά μας, φαίνεται πως η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη mcl-1, επιδρά στο πρώιμο/αρχικό στάδιο ωρίμανσης των θυμοκυττάρων. Επιπρόσθετα, μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα, διάσπαρτα σε όλη την έκταση του φλοιού, εμφάνισαν έκφραση mcl-1. Μια τέτοια έκφραση θα μπορούσε και να αποδοθεί, έστω και σε μικρό βαθμό, στη συμμετοχή της mcl-1 στη φλοιική επιθηλιακή διαφοροποίηση.

Η πρωτεΐνη FLIP<sub>S/L</sub>, στη μελέτη μας δεν αναγνωρίστηκε στα θυμοκύτταρα, παρόλο που αναφέρεται σε άλλες μελέτες<sup>383</sup>, όμως παρουσίασε έντονη ανοσοέκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα της φλοιικής περιοχής. Μάλιστα, η εντόπισή της είναι εντονότερη στη φλοιομυελική ζώνη και την υποκαψική περιοχή, με καθολική έκφραση, ενώ στο φλοιό σημαντικά μικρότερος αριθμός κυττάρων είναι

ανοσοθετικός. Η κατανομή αυτή υποδηλώνει ότι η αύξηση δυναμικού επιβίωσης που προσφέρει η FLIP<sub>S/L</sub> στα TECs, μπορεί να αυξάνει την επιβίωση των TECs στην περιοχή, τα οποία είναι σημαντικά για τις αλληλεπιδράσεις με τα θυμοκύτταρα στις εν λόγω περιοχές.

Η πρωτεΐνη survivin εκφράστηκε από μικρό αριθμό θυμοκυττάρων του φλοιού. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες<sup>113</sup>, που υποστηρίζουν πως η survivin συμμετέχει γενικά σε διάφορα στάδια ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων και πως επιπλέον, επιδρά και στον πολλαπλασιασμό τους, αν και η έκφρασή της δεν είναι ευθέως ανάλογη του τελευταίου.

Οι πρωτεΐνες Fas και FasL, αναγνωρίστηκαν ανοσοϊστοχημικά στην παρούσα μελέτη στα επιθηλιακά κύτταρα, με διαφορετική όμως μεταξύ τους κατανομή. Ο επιφανειακός υποδοχέας Fas, αναγνωρίστηκε σε όλες τις κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων, ενώ αντίθετα, ο συνδέτης του Fas (FasL), αναγνωρίστηκε σε μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού και της φλοιομυελικής ζώνης και στο μυελό. Φαίνεται πως οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες θα μπορούσαν να έχουν κάποιο ρόλο στη διαφοροποίηση των TECs. Όσον αφορά τα λεμφοκύτταρα, στη μελέτη μας δεν ανιχνεύθηκε η Fas, αν και παλαιότερες μελέτες κάνουν λόγο για έκφρασή της<sup>393</sup>, ενώ η FasL ανιχνεύθηκε σε μεμονωμένα κύτταρα στη φλοιομυελική ζώνη, αποτέλεσμα σύμφωνο με βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>384,421</sup>. Βέβαια, δεν υπάρχει η διευκρίνιση αν τα συγκεκριμένα κύτταρα ανηκούν σε διπλά θετικά ή διπλά αρνητικά, που κυρίως εντοπίζονται στη συγκεκριμένη περιοχή<sup>431,432</sup>. Παρόλα αυτά όμως, δεν μπορεί να αποκλειστεί πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και των θυμοκυττάρων μέσω της Fas οδού, να ασκεί ένα σημαντικό ρόλο στη θυμική ανάπτυξη και θυμοκυτταρική διαφοροποίηση. Εξάλλου, αρκετές μελέτες προτείνουν ότι το Fas και το FasL εμπλέκονται στη δημιουργία των ώριμων θυμοκυττάρων<sup>357,440,441</sup>.

Η πρωτεΐνη κασπάση-3 (ανεργής μορφή), παρουσίασε καθολική έκφραση στους βασικούς κυτταρικούς τύπους του φλοιού (λεμφοκυτταρικούς και επιθηλιακούς). Δεδομένου ότι τα αποπτωτικά μονοπάτια “συναντιούνται” σε αυτό το μόριο, η ευρεία έκφρασή του στα λεμφικά θυμοκύτταρα, υποδηλώνει τη σημασία της πρωτεΐνης στην απόπτωση, αφού η ενεργοποιημένη της μορφή, εμπλέκεται στο τελικό στάδιο αποπτωτικής διαδικασίας. Τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στη μελέτη μας (όπως δείχτηκε με συνεκτίμηση ενεργοποιημένης κασπάσης-3, μεθόδου TUNEL και μορφολογίας) στις περιοχές του φλοιού και του φλοιομυελικού ορίου

συσχετίζονται με τον αυξημένο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις συγκεκριμένες περιοχές, καθώς εκεί εντοπίζονται τα κύτταρα που βρίσκονται στα πιο έντονα στάδια κυτταρικής διαίρεσης, τα preDP και DN3<sup>438,439</sup>. Επίσης, άλλη μελέτη επιβεβαιώνει τα αποτελέσματά μας υποστηρίζοντας πως τα DP θυμοκύτταρα είναι στο στάδιο εκείνο της ωρίμανσης/ανάπτυξης, όπου τα γεγονότα της θυμικής επιλογής περιλαμβάνουν και την απόπτωση<sup>440</sup>. Ακόμη, η παρουσία αποπτωτικών κυττάρων στη φλοιομυελική περιοχή, έχει υποστηριχτεί πως ίσως υποδηλώνει ένα ρόλο της εκεί περιοχής στην αρνητική επιλογή των θυμοκυττάρων<sup>397</sup>.

Η ενεργοποιημένη μορφή της κασπάσης-3, αναγνωρίστηκε σε μεμονωμένα λεμφικά θυμοκύτταρα του φλοιού και της φλοιομυελικής ζώνης. Η ανίχνευσή της μέσω ανοσοϊστοχημείας, προτείνεται ως μια εύκολη και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων σε ιστολογικές τομές παραφίνης<sup>441</sup>. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια πειραμάτων με οστεοκλάστες από ποντίκι, πως ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του bim, επιδρώντας στην αποδόμησή του, μέσω αρνητικής ανάδρασης<sup>442</sup>. Στην ανοσοϊστοχημική μας μελέτη, δεδομένου ότι η ενεργοποιημένη κασπάση-3 εκφράζεται στο φλοιό όπου η έκφραση της πρωτεΐνης bim είναι περιορισμένη, θα μπορούσε να συνδυαστεί με το ανωτέρω εύρημα του αρνητικού άξονα ανατροφοδότησης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Από τις κυκλίνες που μελετήθηκαν, στα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζονται όλες πλην της D2, ενώ στα θυμικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίστηκε έκφραση από όλες, με πιο έντονη την ανοσοέκφραση των κυκλινών A και D3.

Στη φλοιική περιοχή τα θυμικά λεμφοκύτταρα λαμβάνουν κυτταρικά σήματα από τον pre-TCR υποδοχέα προκείμενου να προχωρήσει η ωρίμανσή τους. Από μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια και κυτταρικές σειρές<sup>443</sup> διαπιστώθηκε πως η κυκλίνη D3 συμμετέχει στην ωρίμανση, καθώς βρέθηκε ότι DN3 κύτταρα που έχουν απωλέσει την έκφραση της κυκλίνης D3, στερούνται της δυνατότητας εισόδου στον κυτταρικό κύκλο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαφοροποιηθούν ανταποκρινόμενα σε σήματα από τον pre-TCR, οπότε να παρουσιάζουν σημαντική έλλειψη σε CD4+CD8+ double positive κύτταρα. Σε φυσιολογικά ποντίκια τα DN3 μεταβαίνουν στο στάδιο των DN4, συνοδευόμενα όμως από μία έντονη αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D3 ώστε να συντελεστεί η πολλαπλασιαστική έκρηξη (burst) των θυμοκυττάρων. Συνεπώς, η κυκλίνη D3 μπορεί να προστεθεί στο πλαίσιο των πρωτεϊνών που φαίνεται να συμμετέχουν, ευοδώνοντας τα σηματοδοτικά γεγονότα



που απαιτούνται, προκειμένου να υπάρξει η πολλαπλασιαστική έκρηξη των DN κυττάρων<sup>444</sup>. Τα ανωτέρω λοιπόν βιβλιογραφικά δεδομένα συμβαδίζουν με την τοπογραφία της έκφρασης της κυκλίνης D3 στη μελέτη μας, αφού τα DN3 θυμοκύτταρα εντοπίζονται στο φλοιό, όπου εκφράστηκε και η κυκλίνη D3.

Από την ανοσοτοπογραφική έκφραση των D-τύπου κυκλινών προκύπτει μία ποικιλία στην έκφραση ανάλογα με το κύτταρο και την περιοχή του οργάνου. Αυτό είναι σε συμφωνία με *in vitro* μελέτες από T-κυτταρικές σειρές, όπου προτάθηκε πως οι D-τύπου κυκλίνες εκφράζονται διαφορετικά ανάλογα με το στάδιο της λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης<sup>417,445</sup>. Συγκεκριμένα η κυκλίνη D2 είχε αυξημένη έκφραση στην H9 κυτταρική σειρά, ενώ δεν εκφράστηκε στα Jurkat cells. Επειδή οι δύο αυτές κυτταρικές σειρές αποτελούν διαφορετικά στάδια T-κυτταρικής διαφοροποίησης, η έκφραση της συγκεκριμένης ομάδας (D-τύπου) κυκλινών, ρυθμίζεται διαφορετικά στον ίδιο τύπο κυττάρου σε διαφορετικά στάδια. Επιπρόσθετα, οι D-τύπου κυκλίνες έχουν θεμελιώδη ρόλο στη σύνδεση των εξωκυττάρων σημάτων με τα βιοχημικά μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου<sup>446</sup>. Τέλος, η κυκλίνη D2, από μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια και κυτταρικές σειρές<sup>443</sup>, παρατηρήθηκε πως εκφραζόταν στο ακριβώς προηγούμενο, σε σχέση με την κυκλίνη D3 στάδιο ωρίμανσης, το εξαρτώμενο δηλαδή από τις κυτταροκίνες (DN1-DN3) και πως η έκφρασή της απουσίαζε από τη στιγμή που λάμβανε χώρα η TCRβ αναδιάταξη (β-επιλογή). Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν στο φλοιό και θα δικαιολογούσαν ανοσοθετικότητα της πρωτεΐνης κυκλίνη- D2 στην περιοχή. Στη μελέτη μας υπήρξε αναγνώριση της έκφρασης, όμως ήταν σε μεμονωμένα κύτταρα.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη p53, η παρουσία λίγων p53 θετικών επιθηλιακών κυττάρων και η απουσία έκφρασής της από τα θυμοκύτταρα του φλοιού, όπου κυρίως συμβαίνει η απόπτωση, θα μπορούσε να υποδεικνύει μια p53-ανεξάρτητη αποπτωτική οδό για τα εν λόγω κύτταρα. Αυτό, φαίνεται να είναι σε συμφωνία με στοιχεία από *in vitro* μελέτες<sup>447</sup> που αφορούν την επαγόμενη από θυμικά επιθηλιακά κύτταρα απόπτωση των διπλά θετικών (CD4+CD8+) θυμοκυττάρων. Από παλαιότερη δε μελέτη της ομάδας μας<sup>324</sup>, έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη p21 εκφράζεται σε φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα. Αυτή η έκφραση θα μπορούσε να επάγεται από το p53 μετά από κυτταρικό stress ή μετά από DNA βλάβη και να συμμετέχει έτσι σε μια αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στα συγκεκριμένα κύτταρα. Όμως, δεδομένα από άλλη μελέτη<sup>448</sup> υποστηρίζουν πως η έκφραση της p21 πρωτεΐνης φαίνεται να μην εξαρτάται από την p53 πρωτεΐνη.

## B2) Μυελική Ζώνη

Στη μυελική ζώνη, ο πληθυσμός των θυμικών λεμφοκυττάρων που συναντάται, είναι ο πλεον ώριμος στον αδένα. Συγκεκριμένα, στην περιοχή αυτή βρίσκονται τα Single Positive CD4+ ή CD8+ θυμοκύτταρα, καθώς και λίγα (5-10% των ώριμων CD4+) ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Treg). Στο μυελό τα θυμοκύτταρα έχουν κυρίως τον ώριμο φαινότυπο CD3/TCR<sup>hi</sup>. Παρόλα αυτά όμως, δε θεωρούνται ώριμα προς έξοδο κύτταρα, καθώς πρέπει να υποστούν και λειτουργική ωρίμανση. Φαίνεται, πως η λειτουργική ωρίμανση, καθορίζει την T-κυτταρική μετανάστευση, βασιζόμενη στην ηλικία του θυμοκυττάρου. Σχετικά με τους τύπους των επιθηλιακών κυττάρων που υπάρχουν στο μυελό, όπως και στο φλοιό, ανοσοϊστοχημικά και πάλι, συναντούμε δύο κατηγορίες, τα θυμικά μυελικά επιθηλιακά κύτταρα και τα σωματίδια Hassall. Για τα τελευταία, αν και έχουν διατυπωθεί διάφορες απόψεις<sup>431,449,450</sup>, πιστεύεται πως συμμετέχουν ενεργά στην επικοινωνία με τον T-κυτταρικό πληθυσμό. Επιπλέον, τα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, όπως και στο φλοιό, διακρίνονται σε υπότυπους που πιθανώς αντανakλούν την κυτταρική τους ωρίμανση.

Στο μυελό διενεργείται η αρνητική επιλογή (negative selection), η οποία οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο τα λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν με σχέση υψηλής συνάφειας αντιγονικούς επίτοπους του ίδιου του οργανισμού. Δηλαδή, απορρίπτονται κύτταρα που διατηρούν την ικανότητα αναγνώρισης και προσβολής ιδίων κυττάρων του οργανισμού. Σχετικά πρόσφατα πειραματικά δεδομένα<sup>133</sup>, έχουν αποκαλύψει δύο ακόμη πτυχές αυτής της διαδικασίας. Το πρώτο είναι πως τα MHC-I τάξης κύτταρα, υπάρχει η πιθανότητα να υφίστανται αρνητική επιλογή στο φλοιό και το δεύτερο πως κάποια από τα θυμοκύτταρα που υπέστησαν αρνητική επιλογή, δεν οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο, αλλά πραγματοποιούν TCR editing και τελικά επιβιώνουν<sup>133</sup>. Επιπλέον, πάλι από πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, προκύπτει πως στο μυελό συμβαίνει και η δευτερογενής θετική επιλογή<sup>141</sup>. Σε αυτή τη διαδικασία, τα σωματίδια Hassall έχουν κεντρικό ρόλο, καθώς δίνουν το αρχικό ερέθισμα στα δενδριτικά κύτταρα, προκειμένου τα τελευταία να οδηγήσουν αυτοδραστικά T-κύτταρα στη δημιουργία ρυθμιστικών CD4+CD25+ Treg κύτταρα.

Ανοσοϊστοχημικά, η πρωτεΐνη bax αναδείχθηκε και στα θυμοκύτταρα του μυελού, όπως και σε αυτά του φλοιού, και ενισχύει την άποψη πως πιθανώς ασκεί έναν ευρύ ρόλο σε διάφορα στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης. Επιπλέον, η παρουσία της στο μυελό είναι σύμφωνη με την άποψη πως επίδρα στη διαδικασία της αρνητικής επιλογής<sup>346</sup>. Βέβαια, μελέτες σε ποντίκια και οργανική καλλιέργεια

προσφέρουν στοιχεία για το ακριβώς αντίθετο<sup>348</sup>, πως δηλαδή η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν επηρεάζει την αρνητική επιλογή. Η bax πρωτεΐνη, αναγνωρίστηκε και σε λίγα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα σε συμφωνία με προηγούμενα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα<sup>307</sup>. Πιθανώς η bax συμμετέχει, ως ένα βαθμό, στη διαφοροποίηση των μυελικών TECs.

Η πρωτεΐνη bak, όπως και στα θυμοκύτταρα του φλοιού, δεν αναγνωρίστηκε και σε αυτά του μυελού, παρόλο που υπάρχει μελέτη<sup>346</sup> που πραγματοποιήθηκε σε κυτταρικές καλλιέργειες με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και που αναφέρει πως επιδρά στην αρνητική επιλογή. Ενδεχομένως, όπως ίσως και στο φλοιό, η δράση της να επικαλύπτεται από τη δράση κάποιας άλλης προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης. Τα επιθηλιακά κύτταρα της περιοχής εκφράζουν την πρωτεΐνη σε ανάλογο βαθμό με την πρωτεΐνη bax και επιπλέον τα σωματίδια Hassall εμφανίζουν καθολική θετικότητα. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η bak πρωτεΐνη συμμετέχει στη μυελική επιθηλιακή διαφοροποίηση. Ακόμη, η αρνητική επιλογή, δεν μπορεί να προωθηθεί ως διαδικασία, μόνο με την πρωτεΐνη bak, αν οι πρωτεΐνες bax και bim απουσιάζουν<sup>463</sup>.

Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη bim, με την έκφρασή της έστω και σε λίγα θυμοκύτταρα στο μυελό, επιβεβαιώνει το εύρημα<sup>345</sup> της αναγνώρισής της σε Single Positive θυμοκύτταρα, αφού τα τελευταία συναντούνται στο μυελό. Από μελέτες έχει προταθεί<sup>359</sup> πως η απώλεια της bim, οδηγεί σε απώλεια της αρνητικής επιλογής που συμβαίνει στο μυελό, ενώ στα θυμοκύτταρα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί το bim εξαρτόμενο μονοπάτι της αρνητικής επιλογής, φαίνεται πως δραστηριοποιείται σε συνεργασία με το bax. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζονται από τη μελέτη μας διότι υπάρχει αλληλοεπικαλυπτόμενη ανοσοτοπογραφική έκφραση των bim και bax.

Η πρωτεΐνη bad ανιχνεύεται σε σημαντικό αριθμό επιθηλιακών κυττάρων του μυελού και σε όλα τα σωματίδια Hassall. Ενδεχομένως αυτή η ανοσοτοπογραφία υποδηλώνει ένα ρόλο στις διαδικασίες επιλογής και λεμφοκυτταρικής ωρίμανσης που συμβαίνουν στο μυελό, αφού από μελέτη φαίνεται<sup>367</sup> πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αυξάνει το ποσοστό αρνητικής επιλογής. Ενδεχομένως μαζί με αυτά να επιδρά και στη διαφοροποίηση των μυελικών TECs. Τέλος, η πρωτεΐνη bid, όπως και στο φλοιό, παρουσιάζει καθολική έκφραση στα μυελικά λεμφοκύτταρα, υποδηλώνοντας ότι συμμετέχει στα τελικά στάδια ωρίμανσης των T-κυττάρων. Σε αυτή την ωρίμανση φαίνεται να συμμετέχει και το μικροπεριβάλλον του μυελού με τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία επίσης καθολικά εκφράζουν την bid πρωτεΐνη. Η συγκεκριμένη

πρωτεΐνη λόγω της τόσο εκτεταμένης έκφρασής της στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, ίσως μεσολαβεί και στη δημιουργία των διαφόρων μυελικών υποτύπων.

Από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες η *bcl-2* εκφράζεται σε σημαντικό αριθμό μυελικών θυμικών λεμφοκυττάρων και φαίνεται να έχει ρόλο στη διαδικασία επιβίωσης των μυελικών λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, η διάχυτη έκφρασή της στο μυελό, ανεξαρτήτως τύπου λεμφοκυττάρων ( $CD4+$  ή  $CD8+$ ), υποδηλώνει πως μπορεί να δρά μετά τη διαδικασία της αρνητικής επιλογής, δηλαδή επί της ουσίας, στη λειτουργική ωρίμανση των T-κυττάρων. Λόγω του ότι όμως υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με αυτό το γεγονός στη βιβλιογραφία<sup>348,374</sup>, η υπόθεση αυτή παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση.

Μαζί με τα λεμφοκύτταρα και τα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη *bcl-2* σε σημαντικό ποσοστό τους. Τα τελευταία με τις αλληλεπιδράσεις τους με τα λεμφοκύτταρα, πιθανώς να συμμετέχουν στην ωρίμανσή τους και να στέλνουν σήματα επιβίωσης στα θυμοκύτταρα.

Η πρωτεΐνη *bcl-xL*, αναγνωρίστηκε σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα του μυελού και φαίνεται πως ο κύριος προστατευτικός της ρόλος στην επιβίωση των θυμοκυττάρων εντοπίζεται κυρίως στο φλοιό, όπου η έκφρασή της είναι σαφώς αυξημένη. Η επόμενη αντιαποπτωτική πρωτεΐνη που μελετήθηκε, η *mcl-1*, αναγνωρίστηκε στα ώριμα λεμφοκύτταρα του μυελού, δείχνοντας πως πιθανότατα έχει ρόλο στα τελικά στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης. Παράλληλα η ανοσοέκφρασή της σε αρκετά μυελικά θυμοκύτταρα μαζί με την προαποπτωτική πρωτεΐνη *bim*, επιβεβαιώνει την αναφερόμενη βιβλιογραφικά αλληλεπίδρασή τους<sup>350</sup>, αναδεικνύοντας την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μορίων στο ίδιο κύτταρο, τα οποία θα κρίνουν τη “μοίρα” του (επιβίωση ή θάνατος). Φαίνεται επίσης, πως παρόλο που οι *bcl-2* και *mcl-1* αναγνωρίζονται και οι δύο στα μυελικά λεμφοκύτταρα, πιθανώς να εκφράζονται διαφορετικά στους διαθέσιμους T-κυτταρικούς υπότυπους, όπως για παράδειγμα τα  $CD8+$  κύτταρα, τα οποία να εξαρτώνται περισσότερο από το *mcl-1*<sup>343</sup>.

Η πρωτεΐνη *FLIP<sub>S/L</sub>* ανιχνεύθηκε σε όλα τα επιθηλιακά κυτταρικά στοιχεία του μυελου (μυελικά επιθηλιακά κύτταρα και σωματίδια Hassall). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει σημαντική συμμετοχή της *FLIP<sub>S/L</sub>* στην επιβίωση των TECs. Η πρωτεΐνη *survivin*, εκφράστηκε σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα του μυελού –όπως άλλωστε και στο φλοιό- δείχνοντας πως επιδρά στην ωρίμανση των κυττάρων σχεδόν σε όλα τα στάδια, ακόμη και στα τελευταία και πιο ώριμα.

Οι πρωτεΐνες Fas και FasL, αμφοτέρως εμφάνισαν έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα του μυελού. Η μεν Fas εμφάνισε καθολική έκφραση στα εν λόγω κύτταρα, η δε FasL αναγνωρίστηκε σε μικρό αριθμό. Σχετικά αντίστροφη ήταν η ανοσοέκφραση στα σωματίδια Hassall, όπου σε μεμονωμένα αναγνωρίστηκε η Fas πρωτεΐνη, ενώ ο συνδέτης της (FasL) εκφράστηκε σε σημαντικό αριθμό σωματίων Hassall. Οι πρωτεΐνες αυτές, πιθανώς συμμετέχουν στις διαδικασίες ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων μέσω αλληλεπιδράσεων με τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, καθώς έχει εκφραστεί η άποψη, βασιζόμενη σε πειραματικά δεδομένα, πως μέσω της Fas εξαρτώμενης οδού προωθείται η ανοσοανοχή από τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (mTECs)<sup>451</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιθανό μέσω της εντόπισής τους στα TECs να επιδρούν και στις διαδικασίες διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων.

Η κασπάση-3 είναι η πρωτεΐνη που εκφράστηκε καθολικά στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, καθώς και στα σωματίδια Hassall. Αντίθετα, η έκφραση της ενεργοποιημένης μορφής της κασπάσης-3 δεν αναγνωρίστηκε καθόλου στα κύτταρα της περιοχής. Η εκτεταμένη έκφραση της κασπάσης-3, ενδεχομένως καταδεικνύει το σημαντικό της ρόλο και στην περιοχή του μυελού, που θα αφορά τα γεγονότα ωρίμανσης και ανάπτυξης των θυμοκυττάρων που επισυμβαίνουν στο διαμέρισμα αυτό του αδένου, αλλά και τη διαφοροποίηση των μυελικών TECs. Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας είναι η μελέτη που προτείνει πως η κασπάση-3 έχει ρόλο στην αρνητική επιλογή<sup>397</sup>, διαδικασία που πραγματοποιείται στο μυελό, όπου και ανιχνεύθηκε εκτενώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Αντίθετα, σχετικά με την καταταμημένη μορφή της κασπάσης-3, πιστεύεται πως τα Single Positive θυμοκύτταρα έχουν περάσει σε πιο προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης όπου η δραστηριότητα των κασπασών είναι πολύ μικρή<sup>452</sup>.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, όλες, πλην της απουσίας ανοσοχρώσης της κυκλίνης-E στα λεμφοκύτταρα, παρουσίασαν, έστω και μεμονωμένη ανοσοθετικότητα στα κύτταρα (θυμοκύτταρα και TECs) του μυελού. Μάλιστα σπάνια σωματίδια Hassall, ήταν θετικά για τις D-τύπου κυκλίνες που μελετήσαμε (D2 και D3). Η μικρότερη έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου στη μυελική περιοχή σε σχέση με το φλοιό, υποδεικνύει ότι ο μυελός στο θύμο αδένου διαθέτει χαμηλότερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό.

Στα σωματίδια Hassall παρατηρούμε ότι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η bax και η bad, εμφανίζουν έντονη έκφραση, ενώ οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η bcl-2, η bcl-xL, η mcl-1 και η survivin δεν αναγνωρίζονται. Επιπλέον, η πρωτεΐνη



FasL εκφράζεται, άρα υπάρχει η δυνατότητα απόπτωσης, όμως η ενεργοποιημένη κασπάση-3 δεν ανιχνεύθηκε και η χρώση TUNEL ήταν σπάνια θετική. Συνεπώς στα σωματία Hassall δε φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη απόπτωση ή γενικότερα κυτταρικός θάνατος. Η πιθανότητα αυτό να συμβαίνει επειδή άλλες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες εκφράζονται δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί, καθώς βιβλιογραφικά δεδομένα προς αυτή την κατεύθυνση δεν υπάρχουν προς το παρόν. Ωστόσο όμως, τα ευρήματά μας μπορούν να συνδυαστούν από αποτελέσματα από προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας<sup>324</sup>, όπου προέκυψε πως στα σωματία Hassall εκφράζονται οι πρωτεΐνες p21 και p16. Η ανίχνευση της p21 στηρίζει την άποψη πως τα σωματία αυτά αποτελούν μυελικές επιθηλιακές δομές που βρίσκονται στο τελικό στάδιο ωρίμανσης και επιπλέον, αποτελούν δομές που έχουν φτάσει στην τελευταία φάση διαφοροποίησης<sup>324</sup>. Όσον αφορά την p16, έχει βρεθεί πως εκτός από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, εμπλέκεται και στην κυτταρική γήρανση (senescence)<sup>324</sup>. Συνεπώς, συνδυάζοντας όλα τα ανωτέρω υποθέτουμε ότι στα σωματία Hassall, δημιουργείται κυρίως δυναμικό κυτταρικής γήρανσης, παρά μια ενεργός αποπτωτική διαδικασία.

Συνολικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι η επιβίωση ή ο θάνατος των θυμοκυττάρων, καθώς και ο κυτταρικός τους πολλαπλασιασμός, επηρεάζεται άμεσα από το μικροπεριβάλλον του αδένου και πιο συγκεκριμένα το δίκτυο των επιθηλιακών κυττάρων, μαζί με τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα<sup>453</sup>. Τα προγονικά θυμοκύτταρα υφίστανται ένα πρόγραμμα πολλαπλών σταδίων και σημαντικών αλλαγών, τα οποία συμβαίνουν σε αυτό το μικροπεριβάλλον του θύμου και είναι αυστηρά ρυθμιζόμενα από τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις με τα κύτταρα του στρώματος και φυσικά τους διαλυτούς παράγοντες.

Εδώ και αρκετά χρόνια υπάρχουν ενδείξεις ότι ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση είναι δύο βιοχημικές διαδικασίες που επικοινωνούν/συνδέονται. Πολλές μελέτες δείχνουν πως ρυθμιστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης, επιδρούν άμεσα και στη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου<sup>303,454-456</sup>. Πιο συγκεκριμένα σε bad διαγονιδιακά ποντίκια αυξάνεται ο αριθμός των θυμοκυττάρων που βρίσκονται στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου κατά δύο με τρεις φορές<sup>367</sup>. Αυτή η επίδραση είναι παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται για ένα άλλο μέλος της Bcl-2 οικογένειας, το bax. Στην περίπτωση του τελευταίου, έχει φανεί πως η επίδραση στον κυτταρικό κύκλο είναι άμεση, καθώς επιδρά στα μόρια που ρυθμίζουν τη μετάβαση G1-S του κυτταρικού κύκλου<sup>303</sup>. Η survivin εκτός του ρόλου της στην απόπτωση, είναι σημαντική και για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, με την έκφρασή της να επάγεται στη G2-M

φάση<sup>229</sup>. Η Bcl-2 πρωτεΐνη επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ρυθμίζοντας τη μετάβαση από τη G0 στη G1 φάση. Ακόμη, μια πρόσφατη μελέτη σε T-λεμφώματα προτείνει πως η πρωτεΐνη αυτή καθυστερεί σημαντικά την αύξηση έκφρασης των κυκλινών D2 και D3, με τρόπο ανεξάρτητο του p27, επηρεάζοντας έτσι την έξοδο των κυττάρων από τη φάση G1<sup>457</sup>.

Γενικά, επιπλέον μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διευκρινίσουν τους πολλούς ρόλους και τις σχέσεις των μορίων που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου. Παραδείγματα όπως αυτό του προαποπτωτικού μορίου bak, στο οποίο πλέον εξετάζεται η πιθανότητα να λειτουργεί και ως πρωτεΐνη που προάγει την κυτταρική επιβίωση, κάτι το οποίο έχει δειχθεί να συμβαίνει στους νευρώνες<sup>458</sup>, επιβεβαιώνουν την αναγκαιότητα των περαιτέρω μελετών.

### Γ) Σχέση πρωτεϊνών απόπτωσης και κυτταρικού κύκλου με διαφοροποίηση, γήρανση και DNA-damage response

Η θυμοκυτταρική διαφοροποίηση εμπλέκει μια πολύπλοκη “συνένωση” εξωγενών ερεθισμάτων που προέρχονται από το θυμικό στρωματικό κυτταρικό δίκτυο, καθώς και από ερεθίσματα που προέρχονται από το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Διάφορες μελέτες έχουν περιγράψει την εμπλοκή των πρωτεϊνών της απόπτωσης στους μηχανισμούς διαφοροποίησης.

Μελέτη<sup>459</sup> σε θυμοκύτταρα από πειραματόζωα (ποντίκια) με έγχυση 5-azacytidine (5AzC), ουσία που προκαλεί βλάβη του DNA (πιθανώς και απόπτωση) και DNA υπομεθυλίωση (άρα και επαναφορά ελέγχου φυσιολογικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης), έδειξε πως το συγκεκριμένο φάρμακο αύξησε την έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3, ενώ τα επίπεδα των πρωτεϊνών p53 και Fas, έμειναν αμετάβλητα. Επίσης, από άλλη μελέτη<sup>347</sup> σε πειραματόζωα (διαγονιδιακά ποντίκια) προτάθηκε πως σε έλλειψη της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης bim, η διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων που έχουν επιλεγεί, μέσω της αρνητικής επιλογής, δεν προχωρά προς την ώριμη single positive μορφή τους. Πρόσφατα<sup>338</sup> προτάθηκε, ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια με ταυτόχρονη έλλειψη των πρωτεϊνών bak και bax, αθροίζονται στο θύμο αδένα πρόδρομα T-κύτταρα, με σχετική ελάττωση των ώριμων T-κυττάρων. Φαίνεται δηλαδή οι πρωτεΐνες αυτές να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη φυσιολογική T-διαφοροποίηση δρώντας στα πρώιμα στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης.

Μελέτη σε πειραματόζωα<sup>346</sup> (διαγονιδιακά ποντίκια), τα οποία παρουσίαζαν ταυτόχρονη έλλειψη των bak και bax, έδειξε ότι επηρεάζονται οι διαδικασίες της θυμικής επιλογής και ότι αθροίζονται κύτταρα, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες θα απορρίπτονταν από τις πρωτεΐνες που θα εκφράζονταν από τα προ-αποπτωτικά bcl-2 σχετιζόμενα γονίδια. Συνεπώς η διαφοροποίηση των θυμικών λεμφοκυττάρων εμφανίζει έντονη διαταραχή. Μελέτη σε οργανικές καλλιέργειες από εμβρυικό θύμο (fetal thymic organ cultures)<sup>348</sup> ανέδειξε τον ειδικό ρόλο που έχουν οι πρωτεΐνες bax and bcl-2 στις διαδικασίες επιλογής των θυμοκυττάρων, κατά τα στάδια της διαφοροποίησής τους. Συμπερασματικά υποθέτουν, πως οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορεί σε ένα αποπτωτικό μονοπάτι να ανταγωνίζεται η μία τη λειτουργία της άλλης, ενώ σε κάποιο άλλο όχι.

Άλλοι ερευνητές<sup>460</sup>, μελέτησαν την προαποπτωτική πρωτεΐνη bad και διαπίστωσαν (σε υλικό από ποντίκια) πως συγκεκριμένες φωσφορυλιώσεις του

μορίου επηρεάζουν τα επίπεδα απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, προκειμένου να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι της απόπτωσης και έτσι να τροποποιηθεί η διαδικασία διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων. Σε άλλη μελέτη<sup>365</sup> υποστηρίχθηκε πως το bim εξασφαλίζει την ομοιόσταση των ώριμων θυμοκυττάρων στον αδένα, καθώς έλλειψή του σε διαγονιδιακά ποντίκια, έδειξε πως υπήρχε μια διαταραχή στη διαφοροποίηση των πρώιμων T-λεμφοκυττάρων με συσσώρευσή τους στο στάδιο των ώριμων double negative κυττάρων (CD4-/CD8-/CD25-/CD44-/CD3+/TCRβ+). Μελέτη σε διαγονιδιακά πειραματόζωα<sup>347</sup> έδειξε ότι η έλλειψη της bim ελάττωσε μεν το βαθμό απόπτωσής των T-λεμφοκυττάρων του θύμου, όμως δεν προήγαγε τη διαδικασία διαφοροποίησής τους.

Επιπλέον, η πρωτεΐνη bim, σε άλλη μελέτη<sup>461</sup> φαίνεται να επηρεάζει τα στάδια διαφοροποίησης των Treg κυττάρων (T-ρυθμιστικών), προδιαθέτοντας σε απόπτωση τις πιο ανώριμες μορφές τους. Από άλλη μελέτη σε πειραματόζωα<sup>369</sup>, προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες bim και bid, εμπλέκονται στην πρώτη διαδικασία επιλογής στα θυμοκύτταρα, εκείνη δηλαδή που έχει να κάνει με την ύπαρξη ή όχι TCR. Η εμπλοκή των πρωτεϊνών στο πρώιμο αυτό στάδιο ωρίμανσης, αναδεικνύει το ρόλο των ανωτέρω μορίων στη διαδικασία διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων στον αδένα. Άλλη ομάδα ερευνητών<sup>462</sup>, πρότεινε πως η πρωτεΐνη bim έχει θεμελιώδη ρόλο στην αρνητική επιλογή και επομένως σε ένα σημαντικό “βήμα” της θυμοκυτταρικής διαφοροποίησης. Σε διαγονιδιακά ποντίκια πάλι, μελετητές<sup>463</sup> έδειξαν πως η ταυτόχρονη έλλειψη δύο προαποπτωτικών μορίων της bcl-2 οικογένειας (bak και bim ή bax και bim) επηρέαζε το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης και συνεπώς έμμεσα και τη διαδικασία διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων κατά την ωρίμανσή τους.

Άλλη μελέτη σε πειραματόζωα (ποντίκια)<sup>350</sup> περιέγραψε τον ουσιώδη ρόλο της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης mcl-1 στην πρώιμη λεμφοκυτταρική διαφοροποίηση. Μελέτη σε knock-in ποντίκια<sup>343</sup>, έδειξε ότι η πρωτεΐνη mcl-1 συμμετέχει στη θετική επιλογή –άρα και τη διαδικασία διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων εντός του θύμου. Γενετικές μελέτες<sup>340</sup> έχουν προτείνει πως η mcl-1 και η bcl-xL λειτουργούν μαζί προκειμένου να προωθήσουν την επιβίωση των double positive θυμοκυττάρων, ενώ ειδικά η mcl-1, φαίνεται να συμμετέχει σε διάφορα στάδια κυτταρικής διαφοροποίησης in vivo. Πολλές μελέτες<sup>350,464-468</sup> σε πειραματόζωα, ανέδειξαν τη σημασία των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (bcl-2, bcl-xL, mcl-1) στη διαφοροποίηση, καθώς φάνηκε πως οι δύο πρώτες πιθανώς έχουν

ρόλο στο στάδιο διαφοροποίησης των double positive κυττάρων, ενώ η mcl-1 στα στάδια των double negative 2 και 3.

Επιπλέον, μελέτη πάνω σε ανθρώπινο θύμο αδέν<sup>324</sup> πρότεινε με βάση την ανοσοτοπογραφική έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2, ένα ρόλο για την πρωτεΐνη αυτή και στα τελικά στάδια μυελικής διαφοροποίησης των σχετικά ώριμων πλέον θυμοκυττάρων. Η survivin σε θυμοκύτταρα από πειραματόζωα<sup>469</sup> έδειξε να επηρεάζει την κυτταρική διαφοροποίηση στο θύμο μέσω της ρύθμισής της από μία άλλη πρωτεΐνη που επίσης επιδρά στη θυμοκυτταρική διαφοροποίηση, τη CD226. Επιπλέον, άλλη ομάδα<sup>313</sup> πρότεινε πως η πρωτεΐνη survivin πιθανώς συμμετέχει στην T-κυτταρική ανάπτυξη, μετά από μελέτη σε ανθρώπινο θύμο. Η πρωτεΐνη FLIP, κατόπιν μελέτης σε διαγονιδιακά ποντίκια<sup>383</sup>, αναδείχθηκε ως πρωτεΐνη που προστατεύει τα θυμοκύτταρα από την απόπτωση και έχει έτσι σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων αυτών.

Σε κυτταρικές καλλιέργειες θυμοκυττάρων (in vitro)<sup>470</sup> διαπιστώθηκε ότι η Fas επαγόμενη οδός σχετίζεται με τη διαφοροποίηση στο θύμο αδέν. Από μελέτη<sup>471</sup> με θυμοκύτταρα σε ποντίκια και καλλιέργεια οργάνων προέκυψε πως τα CD3medium Single Positive κύτταρα, είναι πιο ευαίσθητα σε αποπτωτικά σήματα από την πρωτεΐνη Fas, απ' ότι τα CD3high Single Positive κύτταρα. Άλλη μελέτη<sup>472</sup> σε πειραματόζωα (DO10 ποντίκια) πρότεινε ότι η πρωτεΐνη Fas εμπλέκεται στην T-κυτταρική ανάπτυξη/διαφοροποίηση στο θύμο αδέν, στη δημιουργία των Double Positive θυμοκυττάρων και στη θετική επιλογή, ενώ δεν εμπλέκεται στο θάνατο by neglect. Άλλοι πάλι ερευνητές θεωρούν πως η πρωτεΐνη Fas, είναι ένα από τα μόρια της T-κυτταρικής επιφάνειας που ίσως έχουν δράση κατά την αρνητική επιλογή. Τέλος, ομάδα ερευνητών<sup>473</sup> πρότειναν πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμπλέκεται στις διαδικασίες και των δύο επιλογών (θετική και αρνητική), επομένως πιθανώς να έχει έναν ευρύτερο ρόλο στη θυμική T-κυτταρική διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη FasL, όπως μελετητές<sup>353</sup> αναφέρουν σε εργασία τους εμπλέκεται έμμεσα στη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων μέσω της οδού Fas-FasL, η οποία συμμετέχει στις επιλογές στο θύμο αδέν.

Σχετικά με τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, διαπίστωθηκε<sup>474</sup> ότι η έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, κυκλίνη A και B1, επηρεάζεται άμεσα από το μεταγραφικό παράγοντα FoxM1 και επομένως διαταραχή του τελευταίου, επιδρά μέσω διαταραγμένης έκφρασης των εν λόγω κυκλινών σε στάδια της T-κυτταρικής διαφοροποίησης. Από πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια<sup>443</sup>



διαπιστώθηκε ότι η κυκλίνη D3 ασκεί σημαντικό ρόλο κατά την T-κυτταρική διαφοροποίηση μέσω ενεργού συμμετοχής κατά τη μετάβαση από το στάδιο του double negative στο στάδιο του double positive θυμοκυττάρου. Σε άλλη μελέτη<sup>475</sup> σε υλικό από ανθρώπινη T-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα, βρέθηκε πως η κυκλίνη D3 ασκεί ένα σημαντικό ρόλο στην T-κυτταρική ανάπτυξη.

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τη γήρανση του ανοσοποιητικού συστήματος, έχουν εστιαστεί στις αλλαγές στην περιφέρεια και στην, ποσοτικά, μειωμένη παραγωγή του T-κυτταρικού πληθυσμού<sup>476,477,478,479</sup>. Λίγα όμως έχουν περιγραφεί για τις ποιοτικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων στο θύμο αδένα. Επιπλέον, το γεγονός πως μελέτες σε ανθρώπινο θύμο έχουν δείξει ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στις αναλογίες των B-κυττάρων, των ουδετερόφιλων και άλλων λευκοκυττάρων σε σχέση με την ηλικία<sup>480</sup>, σημαίνει πως οι κυτταρικές μεταβολές σε σχέση με την ηλικία, αφορούν σχεδόν αποκλειστικά τον T-κυτταρικό πληθυσμό.

Η υποστροφή του θύμου αδένα και ο σημαντικός περιορισμός της ποικιλίας του T-κυτταρικού “ρεπερτορίου” προόδου της βιολογικής ηλικίας, επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Ανάλυση<sup>481</sup> σε “φρέσκα” T-κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος, έδειξε πως τα γηρασμένα T-κύτταρα πραγματοποίησαν de novo σύνθεση CD56 και παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2, p16 και p53 ήταν υψηλά. Επίσης, ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων μέσω του CD56 οδήγησε σε χαμηλά επίπεδα την bax πρωτεΐνη. Άλλη μελέτη<sup>422,482</sup> πρότεινε πως τα παρθένα (naïve) T-κύτταρα μειώνουν τα επίπεδα της προ-αποπτωτικής bim πρωτεΐνης. Τα στοιχεία από τις μελέτες αυτές συνηγορούν υπέρ της ενεργοποίησης προγράμματος επιβίωσης των κυκλοφορούντων T-κυττάρων.

Εντός του θύμου αδένα, η έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο παρουσίασαν αρκετές διαφορές. Ερευνητές με πειράματα σε κουνέλια<sup>483</sup> προχωρημένης ηλικίας μελέτησαν την έκφραση των πρωτεϊνών bax, κασπάση-3 και p53, και έδειξαν ότι αύξηση της ηλικίας συσχετίστηκε με αύξηση στην έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Άλλες μελέτες<sup>484-486</sup> έδειξαν πως η απόπτωση σε θυμοκύτταρα ηλικιωμένων οργανισμών συσχετίζεται με μείωση των επιπέδων της bcl-2 πρωτεΐνης και αύξηση αυτών της προ-αποπτωτικής bad πρωτεΐνης. Επίσης, από έρευνα σε πειραματόζωα<sup>487</sup>, προέκυψε πως σε ενήλικο θύμο εξακολουθεί να διατηρείται η έκφραση των πρωτεϊνών bim και κασπάση-3 σε

επίπεδα αντίστοιχα με των νεογνών και επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ελάττωση των TUNEL θετικών κυττάρων.

Πειράματα σε ηλικιωμένα ποντίκια<sup>484</sup> έδειξαν ότι αναστέλλεται η διαδικασία θυμοποίησης στο στάδιο των DN1 θυμοκυττάρων, διότι είναι ελαττωμένος ο αριθμός των κυττάρων που μεταβαίνουν στο DN2 στάδιο. Επιπρόσθετα, σε αυτό το στάδιο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η πρωτεΐνη bcl-2, η οποία διευκολύνει την ανωτέρω μετάβαση των κυττάρων από DN1 σε DN2. Επίσης, στο ίδιο πείραμα διαπιστώθηκε, πως ένα δεύτερο σημείο ανασχεσης της T-κυτταρικής ωρίμανσης, αποτελεί ο χαμηλός κυτταρικός πολλαπλασιασμός των DN4 θυμοκυττάρων.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53 και mcl-1 μελετήθηκε σε θυμικό ιστό<sup>488-491</sup>. Οι ερευνητές πρότειναν πως η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης mcl-1 και η αύξηση της αντίστοιχης του p53, είναι σύμφωνες με την υποστροφή του αδένου που συμβαίνει από τους πρώτους μήνες της μετεμβρυικής ζωής του οργανισμού. Μάλιστα θεωρήθηκε<sup>488-491</sup>, πως ελάττωση του βαθμού υποστροφής κατά την γήρανση θα μπορούσε να συνδυαστεί με μείωση των επιπέδων έκφρασης της p53, όχι όμως και με αύξηση της έκφρασης της mcl-1.

Μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια<sup>492</sup> πρότεινε πως η έκφραση της πρωτεΐνης Fas, στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, ασκεί κεντρικό ρόλο στην υποστροφή του θύμου αδένου τη συσχετιζόμενη με την ηλικία. Επίσης, από έρευνα σε πειραματόζωα (κουνέλια)<sup>483</sup>, προτάθηκε πως η γήρανση των θυμοκυττάρων συνοδεύεται από την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, όπως είναι αυτό της κασπάσης-3.

Σε περιπτώσεις βλάβης του DNA, η κλασική αντίδραση του θυμοκυττάρου, είναι να αυξήσει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53, η οποία είτε θα επιτρέψει την επιδιόρθωση της βλάβης του γενετικού κώδικα, είτε θα προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Ωστόσο όμως, η πρωτεΐνη p53 φαίνεται να εμπλέκεται και στην αναστολή ωρίμανσης των double negative θυμοκυττάρων, τα οποία απέτυχαν να αναδιατάξουν επιτυχώς τα γονίδια του TCR υποδοχέα τους. Το τελευταίο αναδεικνύει ένα ρόλο της p53 στη ρύθμιση της ωρίμανσης των double negative πρόδρομων θυμοκυττάρων<sup>447</sup>. Ομάδα ερευνητών<sup>369</sup> πρότεινε πως σε περίπτωση βλάβης του DNA, η έκφραση του Bid ρυθμίζεται από τη δράση του p53.

Μελετητές<sup>493</sup> διαπίστωσαν πως τα θυμοκύτταρα που εκφράζουν ένα λειτουργικό pre-TCR, είναι περισσότερο ανθεκτικά σε διαδικασίες απόπτωσης που επάγονται μετά από βλάβη του DNA. Προτείνουν πως η παρουσία του λειτουργικού

pre-TCR, προάγει ενδοκυττάρια βιοχημικά μονοπάτια, ικανά να διασφαλίσουν την επιβίωση του θυμοκυττάρου στην περίπτωση παρουσίας DNA βλάβης.

Βλάβη του DNA μετά από ακτινοβολία σε πειραματόζωα<sup>494</sup>, ανέδειξε την αύξηση της έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών, Από τις πρώτες πρωτεΐνες που αυτό συνέβη ήταν οι bax, PUMA και NOXA, ενώ η bid ακόμη και μετά από 20 ώρες δεν παρουσίασε μεταβολή. Επιπλέον, έπειτα από την αύξηση των επιπέδων των αρχικών πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε και αύξηση της ποσότητας της ενεργοποιημένης κασπάσης-3. Μελέτη<sup>495-498,114,431</sup> που αφορούσε το ρόλο της απόπτωσης σε θυμικά λεμφοκύτταρα από πειραματόζωα που είχαν υποστεί βλάβη μετά από ακτινοβολία, ανέδειξε ένα ρόλο των πρωτεϊνών bax και bcl-2 στη λεμφοκυτταρική απόπτωση. Παλαιότερη δε μελέτη<sup>499</sup>, υποστήριξε πως δεν υπάρχει ένα μόνο/μοναδικό μόριο που να είναι υπεύθυνο για την p53-εξαρτώμενη απόπτωση σε απάντηση μιας DNA βλάβης, in vivo.

Σε πειραματόζωα<sup>500</sup> (ποντίκια) διαπιστώθηκε μετά από επίδραση γ-ακτινοβολίας, ότι οι πρωτεΐνες Bim και PUMA, είναι οι κύριοι εναρκτές της αποπτωτικής διαδικασίας στα θυμικά λεμφοκύτταρα in vivo. Σε κυτταρική σειρά (3SB) με θυμικό λέμφωμα<sup>501</sup>, προτάθηκε ότι η ενδοκυττάρια αναδιανομή και συσσώρευση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση μετά από βλάβη του DNA, εξαρτάται από το είδος του ερεθίσματος που προκάλεσε τη γενετική βλάβη, καθώς και το είδος της κριτικής βλάβης επάνω στο γενετικό κώδικα.

Κλινικές δοκιμές (στάδιο I) με κυτταροτοξικούς θεραπευτικούς παράγοντες (1,12-bisethylspermine και bisnaphthalimide)<sup>502</sup>, έδειξαν πως προκαλούν στα κύτταρα που εξετάστηκαν αύξηση των επιπέδων της κασπάσης-3 και στη συνέχεια βλάβη στον γενετικό κώδικα. Τέλος, μελετητές<sup>503</sup> προσπάθησαν να διερευνήσουν το βιοχημικό μηχανισμό με τον οποίο το p53 απενεργοποιεί το G2 checkpoint. Διαπίστωσαν πως υπήρξε αποφωσφορυλίωση του Cdc2, καθώς επίσης και μία αύξηση της δραστηριότητας του συμπλέγματος κυκλίνη B1/Cdc2 κινάση.

**Δ) Χρησιμότητα της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης για την κατανόηση νεοπλασιών (π.χ. Θυμώματα) και αυτοανοσίας (π.χ. Μυασθένεια Gravis)**

Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, εκτός από τη συνεισφορά της στην κατανόηση της ιστολογικής δομής και του μικροπεριβάλλοντος του θύμου αδένα, προσέφερε αρκετές και σημαντικές πληροφορίες και στο πεδίο της φυσιολογικής λειτουργίας του οργάνου, με τις διαδικασίες της κυτταρικής ωρίμανσης και των επιλογών που εκεί συμβαίνουν. Εκτός όμως από τις περιπτώσεις που αφορούν το φυσιολογικό θυμικό ιστό -και ήδη έχουν αναφερθεί σε προηγούμενα σημεία της παρούσης εργασίας- η ανοσοϊστοχημεία, ως μέθοδος μελέτης και διερεύνησης, προσέφερε πληροφορίες και σε επίπεδο παθολογικού ιστού, κυρίως στις περιπτώσεις που ο τελευταίος αφορούσε είτε νεοπλασίες (π.χ. θυμώματα, θυμικά καρκινώματα), είτε αυτοανοσία (π.χ. μυασθένεια Gravis).

Στις θυμικές νεοπλασίες η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης συνεισέφερε σε ιστολογικές ταξινομήσεις βασισμένες σε συνδυασμό μορφολογικών χαρακτηριστικών και έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών, με παράλληλη συσχέτιση με την πρόγνωση και την κλινική συμπεριφορά του όγκου. Οι Chen FF και συν.<sup>309</sup> μελέτησαν την έκφραση των πρωτεϊνών *mcl-1* και *bcl-2* σε θυμικούς επιθηλιακούς όγκους, καθώς και σε υλικό από ασθενείς με μυασθένεια Gravis. Η τελευταία ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Από τη μελέτη προέκυψε το συμπέρασμα πως οι πρωτεΐνες έχουν διαφορετική έκφραση στα νεοπλασματικά κύτταρα και ότι η *mcl-1* θα μπορούσε να είναι χρήσιμος διαγνωστικός δείκτης για πιο “επιθετικά” θυμικά νεοπλάσματα.

Οι Stefanaki K. και συν.<sup>323</sup> μελέτησαν την έκφραση πρωτεϊνών (*p53*, *mdm2*, *p21*, *bcl-2*) που αφορούσαν τόσο την απόπτωση, όσο και τον κυτταρικό κύκλο, σε υλικό που προερχόταν από θυμώματα και φυσιολογικό θύμο. Από τη μελέτη τους προέκυψε πως υπάρχει μια διαταραχή στο κατασταλατικό μονοπάτι της αύξησης (*p53*, *mdm2*, *p21*) όπου εμπλέκονται οι ανωτέρω πρωτεΐνες και οι οποίες ίσως έχουν ένα ρόλο στην παθογένεση ενός μέρους αυτών των όγκων. Επιπλέον, προέκυψε μια αντιστροφή στη σχέση του *p53* με το *bcl-2* στους όγκους της μελέτης, με το πρώτο να σχετίζεται περισσότερο με φλοιικούς ισότυπους, ενώ το δεύτερο με μυελικά και μικτά θυμώματα.

Οι Khoury T.<sup>317</sup> και συν. διερεύνησαν την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση (survivin, bcl-2), τον κυτταρικό κύκλο (p53) και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ki67) σε υλικό που προερχόταν από θυμικά νεοπλάσματα. Από τη μελέτη προέκυψε πως η έκφραση του p53 μπορεί να προβλέψει υποτροπή σε ένα θύμωμα, ενώ η κυτταροπλασματική ανοσοέκφραση της survivin σχετίζεται με υποτροπή θυμικού καρκινώματος.

Οι Park SH. και συν.<sup>322</sup> μελέτησαν την απόπτωση σε θυμικούς επιθηλιακούς όγκους. Οι πρωτεΐνες που μελέτησαν αφορούσαν την απόπτωση (bcl-2, Fas, FasL) και προέκυψε πως το FasL θα μπορούσε να σχετίζεται με τις ενδοκυτταροπλασματικές διαδικασίες που αφορούν την T-κυτταρική επιλογή, καθώς και τη ρύθμιση των λεμφοειδών κυττάρων εντός του όγκου. Όμως, τόσο η παύση του συστήματος Fas/FasL, όσο και του bcl-2, δε φαίνεται να αποτελούν εναρκτήριους μηχανισμούς ογκογένεσης.

Οι Zhou H. και συν.<sup>314</sup> μελέτησαν την ανοσοέκφραση πρωτεϊνών της απόπτωσης (Fas, bcl-2), του κυτταρικού κύκλου (p53) και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Mib-1) σε ασθενείς με σύνδρομο DiGeorge όπου ο θύμος αδένας ήταν υποπλαστικός. Από τη μελέτη προέκυψε πως η ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών ήταν όμοια με αυτή της ομάδας ελέγχου (φυσιολογικοί θύμοι αδένες) και συνεπώς μηχανισμοί διαφορετικοί από αυτούς της απόπτωσης προκαλούν την υποπλασία ή απουσία του θύμου αδένος σε αυτούς τους ασθενείς.

Οι Engel P. και συν.<sup>328</sup> μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 σε νεοπλασματικό ανθρώπινο ιστό (θυμικοί επιθηλιακοί όγκοι). Από τα αποτελέσματά τους πρότειναν πως ίσως η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης να συνηγορεί υπέρ της ιστογενετικής θεωρίας που υποστήριζε το σύστημα ταξινόμησης κατά Muller-Hermelink.

Οι Onodera J. και συν.<sup>352</sup> μελέτησαν την ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών Fas και bcl-2 σε θυμικό ιστό που προερχόταν από ασθενείς με μυασθένεια Gravis, εκ των οποίων κάποιοι (3 περιπτώσεις) είχαν αναπτύξει και θύμωμα. Από τη μελέτη προέκυψε πως η bcl-2 πρωτεΐνη μπορεί να αυτορυθμίζεται σε μυασθενικούς θύμους και ότι το φαινόμενο αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη διαταραγμένη αποπτωτική διαδικασία των αυτοδραστικών θυμοκυττάρων στη μυασθένεια Gravis.

Οι Brocheriou I. και συν.<sup>326</sup> μελέτησαν σε θυμώματα την ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2, από όπου επιβεβαιώθηκε η ποικιλία των επιθηλιακών υπότυπων στο θύμο αδένος.



Οι Hiroshima K. και συν.<sup>325</sup> προσπάθησαν να εκτιμήσουν την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα και το ποσοστό απόπτωσης σε θυμικούς επιθηλιακούς όγκους. Επιπλέον, εκτιμήθηκε και η σημασία αποπτωτικών πρωτεϊνών (bcl-2, bax, survivin) και της p53 πρωτεΐνης σε αυτούς τους όγκους. Προέκυψε πως υπερέκφραση της p53 πρωτεΐνης σχετίζεται με υψηλότερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και ότι το bcl-2 λειτουργεί ως αναστολέας της απόπτωσης στα θυμώματα. Επίσης η έκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών (bcl-2, p53) ίσως είναι χρήσιμοι δείκτες στη διαφορική διάγνωση υποτύπων των θυμωμάτων.

Οι Salakou S. και συν.<sup>329</sup> διερεύνησαν την ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών bcl-2, bax και Ki67, σε θύμους από ασθενείς με μυασθένεια Gravis. Από τη μελέτη προέκυψε πως αυτές οι πρωτεΐνες σχετίζονται θετικά ή αντίστροφα με τα μικροσκοπικά ευρήματα στον αδένα. Αυξημένη απόπτωση και πολλαπλασιασμός συνδυάζονται με προχωρημένο στάδιο της ασθένειας και πιθανώς χειρότερη πρόγνωση.

Οι Masunaga A. και συν.<sup>330</sup> ερεύνησαν την ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης Fas σε θύμους μυασθενικών ασθενών. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να έχει ένα ρόλο σε αυτοάνοσα νοσήματα, με τη μυασθένεια Gravis να συμπεριλαμβάνεται σε αυτά. Πάλι σε ομάδα ασθενών με μυασθένεια Gravis, οι Bornemann A. και συν. μελέτησαν την ανοσοέκφραση της δεσμίνης, στην προσπάθεια διερεύνησης της παρουσίας και του ρόλου των μυοειδών κυττάρων στη νόσο.

Οι Gal A. και συν.<sup>504</sup> μελέτησαν νευροενδοκρινικούς όγκους του θύμου αδένα για πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση (Bcl-2, Bcl-x, Bax), για την πρωτεΐνη p53, καθώς και το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1. Από τη μελέτη προέκυψε πως η έκφραση της πρωτεΐνης p53 και των συγκεκριμένων αποπτωτικών δεικτών συσχετίζονται με την επιβίωση. Επιπρόσθετα, η ανοσοέκφραση αυτών των δεικτών μπορεί να συνυπολογιστεί για διαφορές στην βιολογική συμπεριφορά.

Οι Dorfman DM. και συν.<sup>505</sup> μελέτησαν ανοσιστοχημικά την έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 και mcl-1 σε ενδοθυρεοειδικά επιθηλιακά θυμώματα/καρκινώματα και τραχηλικά θυμικά καρκινώματα. Από τη διερεύνηση προέκυψε πως η διπλή ανοσοέκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, είναι ένα χαρακτηριστικό των κακοήθων νεοπλασμάτων με θυμική διαφοροποίηση γενικά, τόσο εντός του θύμου αδένα, όσο και σε έκτοπες θέσεις.

Οι Pan CC. και συν.<sup>506</sup> πραγματοποίησαν ανοσοϊστοχημική μελέτη για την έκφραση μιας πληθώρας πρωτεϊνών σε ιστολογικές τομές από υλικό θύμου αδένος με διάγνωση θυμώματος ή καρκινώματος. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως οι πρωτεΐνες bcl-2 και p53 εμπλέκονται περισσότερο στην ανάπτυξη θυμικού καρκινώματος από ότι θυμώματος. Μάλιστα τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και το ισχυρό ανοσοθετικό πρότυπο έκφρασης της bcl-2 στα θυμικά καρκινώματα, έχει ενδεχόμενη αξία στη διαφορική διάγνωση και πρόγνωση της επιθετικότητας και εξαιρεσιμότητας του νεοπλασματος.

Οι Kaïra K. και συν.<sup>507</sup> διερεύνησαν τη βιολογική συσχέτιση της πρόσληψης της 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose, κατά την πραγματοποίηση PET εξέτασης σε θυμικούς επιθηλιακούς όγκους, σε σχέση με την έκφραση διάφορων πρωτεϊνών για τις οποίες έγινε ανοσοϊστοχημικός έλεγχος. Έτσι, προέκυψε μια ισχυρά θετική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη του ραδιοφαρμάκου και την ανοσοέκφραση του ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, p53.

Οι Tomita M. και συν.<sup>508</sup> πραγματοποίησαν μια κλινική και ανοσοϊστοχημική μελέτη λίγων (8) περιστατικών με θυμικό καρκίνωμα. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν και οι bcl-2 και p53 και οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα πως η έκφραση, μεταξύ άλλων, και των πρωτεϊνών αυτών, ίσως σχετίζεται με μια πιο επιθετική συμπεριφορά του καρκινώματος.

Οι Kawanami S. και συν.<sup>509</sup> διερεύνησαν, μεταξύ άλλων, και την ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης Fas σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis, κάποιοι εκ των οποίων είχαν αναπτύξει και θύμωμα. Από τη μελέτη προέκυψε πως οι πρωτεΐνες που διερευνήθηκαν, άρα και η πρωτεΐνη Fas, πιθανώς να επιδρούν προωθώντας το μηχανισμό της αυτοανοσίας στους συγκεκριμένους ασθενείς.

Οι Tateyama H. και συν.<sup>353</sup> μελέτησαν την έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 και της πρωτεΐνης Fas σε επιθηλιακούς όγκους. Από τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών προκύπτει πως είναι πιο πιθανό τα καλά διαφοροποιημένα θυμικά καρκινώματα να ανήκουν σε κάποια κατηγορία θυμώματος, παρά στην κατηγορία των υψηλής κακοηθείας θυμικών καρκινωμάτων.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν με ανοσοϊστοχημεία και TUNEL σε ιστολογικές τομές παραφίνης, 32 θύμοι (15 από ενήλικες, 3 από εφήβους (12-18 ετών), 8 από παιδιά και 6 από νεογνά). Ο στόχος της μελέτης ήταν η πολυπαραγοντική και συνδυαστική μελέτη των επιπέδων έκφρασης και της ανοσοτοπογραφικής κατανομής πρωτεϊνών που παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (bax, bak, bad, bim/BOD, bid, bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin, FLIP<sub>S/L</sub>, Fas, FasL, κασπάση-3, ενεργοποιημένη κασπάση-3, των κυκλινών A, B1, D2, D3 και E και των πρωτεϊνών p53, Rb1 και Hdm2).

Στα πλαίσια της μελέτης θέσαμε τα ακόλουθα ερωτήματα:

α) ποιοι κυτταρικοί πληθυσμοί και σε ποιο διαμέρισμα του θυμικού παρεγχύματος εκφράζουν τις ανωτέρω πρωτεΐνες και ποια είναι τα επίπεδα έκφρασης κάθε πρωτεΐνης σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς

β) υπάρχουν μεταβολές έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και των θυμικών λεμφοκυττάρων

γ) υπάρχουν διαφορές έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών μεταξύ θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και θυμικών λεμφοκυττάρων.

Στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα οι πρωτεΐνες bim/BOD, bcl-xL και survivin, καθώς και η ενεργοποιημένη κασπάση-3, δεν ανιχνεύθηκαν. Η πρωτεΐνη mcl-1 εμφάνισε τόσο στο φλοιό, όσο και στο μυελό μεμονωμένα ανοσοθετικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες bax, bak, bad, bid, bcl-2 και FasL, εμφάνισαν ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης, με αύξηση των ανοσοθετικών κυττάρων από την υποκαψική περιοχή προς το μυελό. Εξάιρεση σε αυτές τις περιπτώσεις αποτέλεσαν τα σωματίδια Hassall, στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες bax, bid και bcl-2, αλλά οι bak και bad είχαν υψηλή έκφραση. Οι πρωτεΐνες κασπάση-3, Fas και FLIP<sub>S/L</sub> αναγνωρίστηκαν με ένα καθολικό πρότυπο έκφρασης σε όλα τα επιθηλιακά θυμικά κύτταρα. Στην περίπτωση μόνο του FLIP<sub>S/L</sub> η φλοιική έκφραση ήταν ελαττωμένη. Σπάνια TUNEL θετικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν στα σωματίδια Hassall.

Στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, οι κυκλίνες A, B1, D3 και E και η πρωτεΐνη Rb-1 (retinoblastoma) παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα έκφρασης, με ελάττωση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό. Αντίθετη ήταν η κλίση έκφρασης της κυκλίνης D2 με αύξηση έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό.

Στα θυμικά λεμφοκύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες bak, bad, FLIP<sub>S/L</sub> και Fas. Η πρωτεΐνη survivin αναγνωρίστηκε σε μεμονωμένα κύτταρα σε φλοιό και μυελό, ενώ η FasL σε μεμονωμένα κύτταρα στο φλοιομυελικό όριο. Αντίθετα, οι bax, bid και κασπάση-3 εμφάνισαν υψηλή και καθολική έκφραση. Οι πρωτεΐνες bim/BOD, bcl-2 και mcl-1 παρουσίασαν αύξηση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό, ενώ η bcl-xL εμφάνισε ακριβώς την αντίθετη κλίση έκφρασης, δηλαδή μείωση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3, αναγνωρίστηκε σε κάποια κύτταρα στην περιοχή του φλοιού και τη φλοιομυελική ζώνη. Στις ίδιες περιοχές και λιγότερο στο μυελό, ανιχνεύθηκαν και TUNEL θετικά κύτταρα.

Στα θυμικά λεμφοκύτταρα, η έκφραση των κυκλινών και της πρωτεΐνης Rb-1, παρουσίασε την ίδια κλίση με αυτή στα επιθηλιακά κύτταρα, δηλαδή από το φλοιό προς το μυελό, ελάττωση έκφρασης κυκλινών A, B1, D3 και E, αύξηση έκφρασης κυκλίνης D2 και ελάττωση έκφρασης Rb-1 πρωτεΐνης.

Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή ανοσοέκφρασης και κατανομής στις διάφορες ηλικιακές ομάδες που μελετήθηκαν, αλλά στις περιπτώσεις όπου η υποστροφή ήταν έντονη, ο προς μελέτη κυτταρικός πληθυσμός ήταν σαφώς ελαττωμένος και τα ανοσοθετικά κύτταρα σαφώς λιγότερα. Στις περιπτώσεις με λεμφοζιδιακή υπερπλασία δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές κατανομής και έκφρασης ποσοστών των πρωτεϊνών σε σχέση με τις άλλες περιπτώσεις.

**Συνολικά στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad και bid από το φλοιό προς το μυελό, η οποία είναι αντίστροφη από την παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών του κύκλου/πολλαπλασιασμού κυκλινών A, B1, D3 και E. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση δυναμικού κυτταρικού θανάτου στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα από το φλοιό προς το μυελό. Η παρουσία όμως ικανού αριθμού θετικών κυττάρων για τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2 και FLIP<sub>S/L</sub> στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, η απουσία θετικότητας για ενεργοποιημένη κασπάση-3 και η απουσία TUNEL θετικών κυττάρων στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, υποδηλώνουν ενεργοποίηση αντιαποπτωτικού προγράμματος, το οποίο τους προσφέρει δυναμικό επιβίωσης. Στα σωματίδια Hassall παρατηρείται υψηλή έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bak και bad, η οποία φαίνεται να αντισταθμίζεται από την υψηλή έκφραση της αντιαποπτωτικής FLIP<sub>S/L</sub> διότι δεν**

παρατηρείται θετικότητα για ενεργοποιημένη κασπάση-3 και παρατηρούνται πολύ σπάνια TUNEL θετικά κύτταρα. Στα σωματίδια Hassall παρατηρείται σημαντική μείωση πολλαπλασιαστικού δυναμικού (απουσία έκφρασης κυκλινών A, B1, E, πολύ χαμηλή έκφραση κυκλινών D2 και D3 και υψηλή έκφραση p16, p21 και p27). Επιπλέον, τα σωματίδια Hassall παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση πολλών κερατινών και πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης σε σχέση με τα υπόλοιπα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (Γ. Καρατζίας: Διδακτορική Διατριβή 2011, Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας). Συνεπώς, τα συνολικά ευρήματα δείχνουν ότι τα σωματίδια Hassall είναι επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης με πολύ χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, αλλά με στοιχεία κυτταρικής γήρανσης.

**Συνολικά στα θυμοκύτταρα** παρατηρείται αύξηση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και mcl1 από το φλοιό στο μυελό, ενώ από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες μόνο οι bax και bid εμφανίζουν υψηλή έκφραση σε φλοιό και μυελό και με μικρή έκφραση της bim στο μυελό. Τα ανωτέρω ευρήματα, σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη, από το φλοιό προς το μυελό, μείωση κυττάρων θετικών για ενεργοποιημένη κασπάση-3, μείωση TUNEL θετικών κυττάρων και μείωση κυττάρων θετικών για κυκλίνες A, B1, D3 και E, υποδηλώνουν μείωση του κυτταρικού δυναμικού πολλαπλασιασμού και αύξηση του δυναμικού επιβίωσης από το φλοιό προς το μυελό. Επιπλέον, η αύξηση έκφρασης της κυκλίνης D2 από το φλοιό προς το μυελό (αντίθετα από τις άλλες κυκλίνες), υποδηλώνει συμμετοχή της κυκλίνης D2 στο πρόγραμμα τελικής διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων.

**Συμπερασματικά**, τα ευρήματά μας **α)** αναδεικνύουν τη διαφορετική ανοσοτοπογραφική κατανομή και τις διαφορές των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, **β)** αποκαλύπτουν μεταβολές έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση των επιθηλιακών και λεμφικών κυττάρων του θύμου και **γ)** αναδεικνύουν διαφορές προτύπων έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών μεταξύ θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και λεμφοκυττάρων.

Τα αποτελέσματά μας προσφέρουν ανοσο-ιστολογικές πληροφορίες για την περαιτέρω κατανόηση της φυσιολογίας του θυμικού μικροπεριβάλλοντος στον άνθρωπο και για την περαιτέρω κατανόηση της ιστογένεσης των θυμωμάτων και των διαταραχών της ιστοφυσιολογίας στις περιπτώσεις αυτοανοσίας.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Εισαγωγή

Ο θύμος αδένας είναι ένα λεμφοεπιθηλιακό όργανο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και μετανάστευση στο περιφερικό αίμα ανοσοϊκανών T-λεμφοκυττάρων. Στην πολύπλοκη διαδικασία της T-κυτταρικής ωρίμανσης και διαφοροποίησης, θεμελιώδη ρόλο διαδραματίζει το μικροπεριβάλλον του θύμου αδένου. Αυτό αποτελείται από δομικά συστατικά (laminin, fibronectin, κολλαγόνο), βασικές μεμβράνες, καθώς και κυτταρικά συστατικά (δακτυλιοειδή επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες). Ανάμεσα σε αυτά τα συστατικά, τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είναι εκείνα που κατέχουν εξέχουσα θέση στη λειτουργία του θύμου, διότι επιδρούν στην πορεία μετακίνησης των λεμφοκυττάρων μέσα στο όργανο και στη διαφοροποίησή τους. Αυτή η επίδραση επιτελείται τόσο με διακυττάρειες αλληλεπιδράσεις, όσο και με την παραγωγή διαλυτών παραγόντων (κυτταροκίνες, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες κ.α.).

Τα πολλαπλά λεμφοεπιθηλιακά κυτταρικά γεγονότα περιλαμβάνουν στάδια ωρίμανσης των θυμοκυττάρων με σημαντικούς σταθμούς σε αυτή τη διαδικασία τις “επιλογές“ (β-επιλογή, θετική, αρνητική). Σε όλες αυτές τις φάσεις εμπλέκονται πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν την ανοσοϊστοχημική έκφραση κάποιων από αυτές τις πρωτεΐνες σε φυσιολογικό θυμικό ιστό, ωστόσο όμως περισσότερο συχνά χρησιμοποιούνται σαν ιστοί ελέγχου (control tissues) σε μελέτες με παθολογικούς ιστούς. Επιπλέον, οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε θύμο από πειραματόζωα (π.χ. διαγονιδιακά ποντίκια). Πιο πρόσφατες μελέτες, με τη βοήθεια σύγχρονων τεχνικών, μελετούν το φαινότυπο που προκύπτει μετά από απαλοιφή γονιδίων και απώλεια έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών, συχνά πραγματοποιούνται *in vitro*, με αποτέλεσμα να μη λαμβάνεται υπόψιν το ιστικό μικροπεριβάλλον του αδένου.

Συνεπώς, η ιστολογική μελέτη της ανοσοτοπογραφικής κατανομής του πρωτεϊνικού δικτύου που εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου, προσφέρει ακριβείς ανοσομορφολογικές πληροφορίες, τόσο για την κατανόηση της ιστοφυσιολογίας του θύμου αδένου, όσο και για την ιστογενετική προέλευση και ταξινόμηση των θυμικών επιθηλιακών νεοπλασιών. Όμως παρόλες τις πολυάριθμες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, δεν έχει γίνει πολυπαραμετρική-πολυπαραγοντική ανοσοϊστοχημική μελέτη σε τομές παραφίνης (που εξασφαλίζουν

αξιόπιστη ανοσομορφολογική ανάλυση) που να αφορά στην ανοσοτοπογραφική κατανομή και στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης ή/και του κυτταρικού κύκλου (σε σχέση με την ηλικία). Συνεπώς, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συστηματική διερεύνηση του πρότυπου έκφρασης στο φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση κυτταρικού κύκλου/απόπτωσης, καθώς και η αναζήτηση της παρουσίας αποπτωτικών κυττάρων. Στα πλαίσια της μελέτης θέσαμε τα ακόλουθα ερωτήματα:

α) ποιοι κυτταρικοί πληθυσμοί και σε ποιο διαμέρισμα του θυμικού παρεγχύματος εκφράζουν τις ανωτέρω πρωτεΐνες και ποια είναι τα επίπεδα έκφρασης κάθε πρωτεΐνης σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς

β) υπάρχουν μεταβολές έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και των θυμικών λεμφοκυττάρων

γ) υπάρχουν διαφορές έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών μεταξύ θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και θυμικών λεμφοκυττάρων.

Επιπρόσθετα, η ανοσοτοπογραφική έκφραση των πρωτεϊνών αναλύθηκε σε σχέση με την ηλικιακή ομάδα από την οποία προερχόταν το προς εξέταση υλικό και αναλύθηκε και σε περιπτώσεις με λεμφοζιδιακή υπερπλασία.

### **Υλικό και Μέθοδος**

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ιστολογικές τομές παραφίνης 32 περιπτώσεων φυσιολογικού ανθρώπινου θύμου αδένου, από διάφορες ηλικιακές ομάδες (νεογνά, παιδιά, έφηβοι, ενήλικες). Η επιλογή έγινε με βάση την ύπαρξη επαρκούς και κατάλληλου για ανοσοχρώσεις υλικού. Μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (bax, bak, bad, bim/BOD, bid), αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin και FLIP<sub>S/L</sub>), οι πρωτεΐνες Fas (CD95) και FasL, που συμμετέχουν στο εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης, καθώς και η εκτελεστική κασπάση-3, στην ανενεργή (caspase-3) και ενεργοποιημένη της μορφή (cleaved-caspase-3). Επιπλέον, μελετήθηκαν και πρωτεΐνες που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο (κυκλίνη-A, κυκλίνη-B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη-D2, κυκλίνη-D3 και κυκλίνη-E) και οι πρωτεΐνες p53, Rb-1 και Hdm2. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη της έκφρασης των πρωτεϊνών ήταν αυτή της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (LSAB) υπεροξειδάσης και πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος ανοσοϊστοχημείας (Ventana Benchmark) σύμφωνα

με τα πρωτόκολλα και τις οδηγίες που το συνοδεύουν (Ventana Medical Systems). Ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε συσχέτιση με την κυτταρική μορφολογία, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοϊστοχημική χρώση ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και με τη μέθοδο *in situ* σήμανσης TUNEL.

Η ιστοχημική μέθοδος TUNEL αναγνωρίζει ως θετικά όχι μόνο κύτταρα σε απόπτωση, αλλά και νεκρωμένα κύτταρα, κύτταρα με υψηλό ρυθμό ανανέωσης, καθώς και αποπτωτικά σωμάτια μέσα στο κυτταρόπλασμα μακροφάγων. Για τους λόγους αυτούς η συγκεκριμένη μέθοδος με τη θετική της χρώση, δηλώνει πως ένα κύτταρο είναι αποπτωτικό, μόνο όταν και μορφολογικά τα κυτταρικά χαρακτηριστικά συνάδουν με την κυτταρική διαδικασία της απόπτωσης.

### **Αποτελέσματα**

Η έκφραση των πρωτεϊνών συσχέτισθηκε με τον υπότυπο των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και τα θυμικά λεμφοκύτταρα, ανάλογα με τη θέση τους στις μονάδες των λοβίων του θύμου.

- **Θυμικά Επιθηλιακά Κύτταρα (Thymic Epithelial Cells/TECs)**

Στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα οι *bim/BOD*, *bcl-xL* και *survivin* δεν ανιχνεύθηκαν. Η *mcl-1* εμφάνισε τόσο στο φλοιό, όσο και στο μυελό μεμονωμένα ανοσοθετικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι *bax*, *bak*, *bad*, *bid*, *bcl-2* και *FasL*, εμφάνισαν ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης, με αύξηση των ανοσοθετικών επιθηλιακών κυττάρων από την υποκαψική περιοχή προς το μυελό. Εξαίρεση σε αυτές τις περιπτώσεις αποτέλεσαν τα σωμάτια Hassall, στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν οι *bax*, *bid* και *bcl-2*. Τέλος, οι κασπάση-3, *Fas* και *Flips<sub>S/L</sub>* αναγνωρίστηκαν σε όλα τα επιθηλιακά θυμικά κύτταρα. Στην περίπτωση μόνο του *Flips<sub>S/L</sub>* η φλοιική έκφραση ήταν ελαττωμένη.

Οι κυκλίνες A, B1, D3 και E και η πρωτεΐνη Rb-1, παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα, με ελάττωση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό. Αντίθετη ήταν η “πορεία” έκφρασης της κυκλίνης D2.

- **Θυμοκύτταρα**

Στα θυμικά λεμφοκύτταρα οι *bak*, *bad*, *Flips<sub>S/L</sub>* και *Fas* δεν ανιχνεύθηκαν. Η *survivin* αναγνωρίστηκε σε μεμονωμένα κύτταρα σε φλοιό και μυελό, ενώ η *FasL* σε μεμονωμένα κύτταρα στο φλοιομυελικό όριο. Αντίθετα, οι *bax*, *bid* και κασπάση-3

εμφάνισαν καθολική έκφραση. Οι bim/BOD, bcl-2 και mcl-1 παρουσίασαν αύξηση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό, ενώ η bcl-xL εμφάνισε ακριβώς την αντίθετη κλίση έκφρασης, δηλαδή μείωση της έκφρασης από το φλοιό προς το μυελό.

Παρατηρήθηκε αλληλοεπικάλυψη της έκφρασης των κυκλινών A, B1, D3 και E, μέσω της αναγνώρισης ενός παρόμοιου πρότυπου έκφρασης, με υψηλότερη ανοσοέκφραση στο φλοιό και ελάττωση αυτής προς το μυελό. Ανάλογη ήταν η κλίση έκφρασης της πρωτεΐνης Rb-1. Η δε κυκλίνη D2, παρουσίασε αντίστροφο πρότυπο έκφρασης, με αυξημένη έκφραση στο μυελό και ελαττωμένη στο φλοιό.

Τα αποπτωτικά κύτταρα μελετήθηκαν με την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και με τη μέθοδο TUNEL. Κύτταρα με θετική ανοσοχρώση για την ενεργοποιημένη κασπάση-3, αναγνωρίστηκαν στην περιοχή του φλοιού και στη φλοιομυελική ζώνη. Κύτταρα θετικά με τη μέθοδο TUNEL, εντοπίστηκαν κυρίως στη φλοιική ζώνη και το φλοιομυελικό όριο. Στη μυελική ζώνη και στα σωματίδια Hassall σπάνια αναγνωρίστηκαν TUNEL θετικά κύτταρα. Η αναλογία θετικών (+) TUNEL κυττάρων συγκριτικά στο φλοιό και το μυελό είναι περίπου 4:1.

Στις διάφορες ηλικιακές ομάδες δεν αναγνωρίστηκαν αξιοσημείωτες διαφορές κατανομής και έκφρασης ποσοστών των πρωτεϊνών, αλλά στις περιπτώσεις όπου η υποστροφή ήταν έντονη, ο προς μελέτη κυτταρικός πληθυσμός ήταν σαφώς ελαττωμένος και τα ανοσοθετικά κύτταρα πολύ λιγότερα. Ανάλογη είναι και η παρατήρηση για τις περιπτώσεις με λεμφοζιδιακή υπερπλασία, όπου και πάλι δεν προέκυψε σημαντική διαφορά στην ανοσοέκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών, σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις.

## Συζήτηση

Η ανοσοθετικότητα που παρατηρήθηκε στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα για τις πρωτεΐνες bax και Fas, είναι γενικά σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές σε πειραματόζωα και ανθρώπινο φυσιολογικό ιστό. Κύρια διαφορά είναι ότι τα σωματίδια Hassall, στην εργασία μας δεν παρουσίασαν την ανοσοθετικότητα που περιγράφεται σε μελέτη για την πρωτεΐνη Fas. Αντίθετα, ο συνδέτης της πρωτεΐνης Fas (FasL), εντοπίστηκε κυρίως στο μυελό και τα σωματίδια Hassall, εύρημα που συμβαδίζει με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Από τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, η κυκλίνη D3 αναγνωρίστηκε στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, όπου από άλλη μελέτη προκύπτει πως, σε αντίθεση με

τις υπόλοιπες κυκλίνες της ομάδας D, δεν προκαλεί θυμική υπερπλασία. Οι κυκλίνες E και D1, έχει βρεθεί να εκφράζονται σε μυελικά επιθηλιακά κύτταρα και μάλιστα εικάζεται πως η συγκεκριμένη έκφραση προκαλεί λειτουργική ωρίμανση των CD4+θυμοκυττάρων *in vitro*.

Η μη-ανίχνευση της πρωτεΐνης bak στα θυμοκύτταρα, ενδεχομένως υποδηλώνει μια αλληλοεπικάλυψη της προ-αποπτωτικής δράσης της από άλλα μόρια που προάγουν την απόπτωση. Αντίθετα, η διάχυτη έκφραση της bax πρωτεΐνης στα θυμοκύτταρα, πιθανώς να αντικατοπτρίζει ένα γενικότερο ρόλο που η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει σε διάφορα στάδια της T-κυτταρικής ωρίμανσης. Η αλληλοεπικαλυπτόμενη ανοσοτοπογραφική κατανομή των πρωτεϊνών bax, bim/BOD και bcl-2 στα θυμοκύτταρα, υποδηλώνει τη σχέση ρυθμιστικής αλληλουχίας που έχει προταθεί μεταξύ των τριών αυτών μορίων. Η bim/BOD πρωτεΐνη, με την έκφραση της στις δύο λειτουργικές περιοχές του θυμικού λοβίου (φλοιός και μυελός) επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από άλλη μελέτη με κυτταρομετρία ροής σε θυμοκύτταρα από φυσιολογικό ανθρώπινο θύμο και η οποία έδειξε πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρουσίασε έκφραση τόσο στα Single Positive θυμοκύτταρα (άρα στο μυελό) όσο και στα Double Positive (άρα εκείνα που εντοπίζονται στο φλοιό). Επίσης, η παρουσία της στο μυελό ενισχύει και την άποψη πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διενέργεια της αρνητικής επιλογής, η οποία με βάση μελέτες ανοσοφυσιολογίας εκτελείται σε αυτή την περιοχή. Η bad είναι η δεύτερη προ-αποπτωτική πρωτεΐνη που δεν ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά στα θυμοκύτταρα. Με βάση άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια με τεχνικές ανοσοαποτύπωσης κατά western, δοκιμασίες απόπτωσης και κυτταρομετρία ροής, ανίχνευση της bad στα θυμοκύτταρα έγινε εφικτή μόνο μετά από επίδραση ισχυρού αποπτωτικού ερεθίσματος. Το τελευταίο όμως είναι πιθανό να μη συμβαίνει κάτω από συνθήκες, όπως είναι αυτές του ιστού που μελετήθηκε. Επομένως, η πρωτεΐνη bad ενδεχομένως να έχει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στα θυμοκύτταρα, ο οποίος όμως εκδηλώνεται κάτω από ειδικές συνθήκες. Η bid πρωτεΐνη συναντάται καθολικά στο θύμο αδένα και αυτό ενδεχομένως υποδηλώνει πως είναι διαθέσιμη με την ανενεργή τη μορφή τόσο στο φλοιό όσο και στο μυελό, ώστε όταν παρουσιαστούν οι κατάλληλες συνθήκες, η bid να μετατραπεί στην ενεργοποιημένη της μορφή.

Από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, η bcl-2 με την εντόπιση της κυρίως στα ώριμα θυμικά λεμφοκύτταρα (μυελός), φαίνεται να



εμπλέκεται στη διαδικασία επιβίωσης των λεμφοκυττάρων του μυελού. Η πρωτεΐνη bcl-xL έχει την ακριβώς αντίθετη εντόπιση από τη bcl-2 στα θυμοκύτταρα. Η έκφρασή της συναντάται κυρίως στο φλοιό, όπου πιθανώς να σχετίζεται με σήματα επιβίωσης που λαμβάνουν τα περισσότερα ώριμα κύτταρα πριν τη θετική επιλογή ή με την προστασία ανώριμων Double Positive από κυτταρικό θάνατο by neglect. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη mcl-1 φαίνεται να ασκεί επίδραση στο αρχικό (Double Negative 1) και τελικό στάδιο ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων. Η εντόπιση της mcl-1 κυρίως στη μυελική μοίρα υποδεικνύει το ρόλο της στην επιβίωση των λεμφοκυττάρων του μυελού. Η εντόπισή της δε στα μυελικά θυμοκύτταρα ταυτόχρονα με την bim/BOD πρωτεΐνη είναι υπέρ της αλληλεπίδρασης που έχει δείχθει να έχουν οι πρωτεΐνες mcl-1 και bim/BOD. Αντίθετα, η πρωτεΐνη FLIP<sub>S/L</sub> δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά στα θυμοκύτταρα, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται σε μικρά επίπεδα έκφρασης. Η survivin αναγνωρίστηκε σε λίγα μόλις θυμοκύτταρα στο φυσιολογικό θύμο αδένος και πιστεύεται πως επιδρά στη ωρίμανση, την ομοιόσταση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων σε διάφορα στάδια.

Η καθολική έκφραση της κασπάσης-3 στα θυμοκύτταρα, ενδεχομένως υποδηλώνει την άμεση διαθεσιμότητά της όποτε παρουσιαστεί η ανάγκη στο κύτταρο, ώστε να ολοκληρωθούν οι διάφορες επιλογές και να αναπτυχθούν τα θυμοκύτταρα. Τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στις περιοχές του φλοιού και του φλοιομυελικού ορίου που ανιχνεύονται με την ανοσοέκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και με τη μέθοδο TUNEL, συσχετίζονται με τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που παρουσιάζουν τα κύτταρα που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, οι κυκλίνες A, B1, E και D3, εμφάνισαν αναλογία όσον αφορά την τοπογραφία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης στα θυμοκύτταρα, η οποία παρουσιάζει μείωση από το φλοιό προς το μυελό και έχει αντίθετη “κλίση” σε σχέση με την έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξααρτώμενων κινασών p27, p21 και p16. Η κυκλίνη-D2, με την εντόπιση της στο μυελό, δείχνει μια προτίμηση έκφρασης σε περιοχές χωρίς έντονο πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο διπλό ρόλο που έχει η συγκεκριμένη κυκλίνη στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση, οπότε όταν δραστηριοποιείται στην κατευθυνση της κυτταρικής διαφοροποίησης, δρα μαζί με το p27, ενώ στα πλαίσια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δρα αντίθετα. Μία

άλλη ερμηνεία θα μπορούσε να αποτελεί ένα φαινόμενο ανάλογο με αυτό που συμβαίνει στην κυκλίνη-D3, όπου δηλαδή η έκφρασή της εξαρτάται ή επηρεάζεται από διάφορα ερεθίσματα και το ειδικό κάθε φορά κυτταρικό υπόστρωμα. Επιπρόσθετα, η κυκλίνη- D2 δείχνει να εκφράζεται σε ηρεμούντα λεμφοκύτταρα, κάτι που εν πολλοίς ισχύει στο μυελό του θύμου αδένου. Αντιθέτως, η κυκλίνη-D3 αναγνωρίζεται στο φλοιό, όπου ο θύμος παρουσιάζει μεγαλύτερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό.

**Συνολικά στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα** παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad και bid από το φλοιό προς το μυελό, η οποία είναι αντίστροφη από την παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών του κύκλου/πολλαπλασιασμού κυκλινών A, B1, D3 και E. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση δυναμικού κυτταρικού θανάτου στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα από το φλοιό προς το μυελό. Η παρουσία όμως ικανού αριθμού θετικών κυττάρων για τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2 και FLIP<sub>S/L</sub> στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, η απουσία θετικότητας για ενεργοποιημένη κασπάση-3 και η απουσία TUNEL θετικών κυττάρων στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, υποδηλώνουν ενεργοποίηση αντιαποπτωτικού προγράμματος, το οποίο τους προσφέρει δυναμικό επιβίωσης. Στα σωματίδια Hassall παρατηρείται υψηλή έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bak και bad, η οποία φαίνεται να αντισταθμίζεται από την υψηλή έκφραση της αντιαποπτωτικής FLIP<sub>S/L</sub> διότι δεν παρατηρείται θετικότητα για ενεργοποιημένη κασπάση-3 και παρατηρούνται πολύ σπάνια TUNEL θετικά κύτταρα. Στα σωματίδια Hassall παρατηρείται σημαντική μείωση πολλαπλασιαστικού δυναμικού (απουσία έκφρασης κυκλινών A, B1, E, πολύ χαμηλή έκφραση κυκλινών D2 και D3 και υψηλή έκφραση p16, p21 και p27). Επιπλέον, τα σωματίδια Hassall παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση πολλών κερατινών και πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης σε σχέση με τα υπόλοιπα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (Γ. Καρατζίας: Διδακτορική Διατριβή 2011, Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας). Συνεπώς, τα συνολικά ευρήματα δείχνουν ότι τα σωματίδια Hassall είναι επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης με πολύ χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, αλλά με στοιχεία κυτταρικής γήρανσης.

**Συνολικά στα θυμοκύτταρα** παρατηρείται αύξηση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και mcl1 από το φλοιό στο μυελό. Ενώ από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες μόνο οι bax και bid εμφανίζουν υψηλή έκφραση σε φλοιό και μυελό και με μικρή έκφραση της bim στο μυελό. Τα ανωτέρω ευρήματα, σε συνδυασμό με την

παρατηρούμενη, από το φλοιό προς το μυελό, μείωση κυττάρων θετικών για ενεργοποιημένη κασπάση-3, μείωση TUNEL θετικών κυττάρων και μείωση κυττάρων θετικών για κυκλίνες A, B1, D3 και E, υποδηλώνουν μείωση του κυτταρικού δυναμικού πολλαπλασιασμού και αύξηση του δυναμικού επιβίωσης από το φλοιό προς το μυελό. Επιπλέον, η αύξηση έκφρασης της κυκλίνης D2 από το φλοιό προς το μυελό (αντίθετα από τις άλλες κυκλίνες), υποδηλώνει συμμετοχή της κυκλίνης D2 στο πρόγραμμα τελικής διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων.

**Συμπερασματικά**, τα ευρήματά μας **α)** αναδεικνύουν τη διαφορετική ανοσοτοπογραφική κατανομή και τις διαφορές των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, **β)** αποκαλύπτουν μεταβολές έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση των επιθηλιακών και λεμφικών κυττάρων του θύμου και **γ)** αναδεικνύουν διαφορές προτύπων έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών μεταξύ θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και λεμφοκυττάρων.

Συνεπώς, η ποικιλία της ανοσοτοπογραφικής κατανομής και των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών της απόπτωσης και των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου στα ωριμάζοντα θυμοκύτταρα και τους διακριτούς υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, μπορεί να αντανακλά την ποικιλία των βιολογικών τους λειτουργιών στο μικροπεριβάλλον του θύμου αδένος και τα διαφορετικά στάδια στη διαδικασία ωρίμανσης των άωρων προγονικών θυμοκυττάρων ως τα ώριμα, έτοιμα προς έξοδο στην περιφερική αιματική κυκλοφορία, θυμικά λεμφοκύτταρα.

Τα αποτελέσματά μας πιστοποιούν ανοσοϊστοχημικά την πολυπλοκότητα του θυμικού μικροπεριβάλλοντος στον άνθρωπο και προσφέρουν πληροφορίες για την περαιτέρω κατανόηση της ιστογένεσης του θύμου και των θυμικών νεοπλασμάτων, καθώς και των διαταραχών στα πλαίσια αυτοανοσίας.

## **SUMMARY in ENGLISH / ABSTRACT**

The human thymus is a lymphoepithelial organ which supports the production of self-tolerant T-cells and their migration to the peripheral blood circulation. In this multistep process of T-cell maturation and differentiation essential role plays the cellular components of the thymic microenvironment [Thymic Epithelial Cells (TECs), dendritic cells, macrophages, fibroblasts]. Among them, TECs have been regarded as the main drivers of thymocyte development and maturation through cell to cell contacts and the production of soluble factors (cytokines, hormones, growth factors etc. )

The multiple lymphoepithelial cellular events include the processes of selection ( $\beta$ -selection, positive selection and negative selection of thymic lymphocytes). These “selections” involve proteins regulating the apoptosis and the cell-cycle. Previous studies reported the immunohistochemical expression of some of these proteins in normal human thymuses which were mostly used as control tissues in histopathological studies.

The immunotopographical distribution of protein networks involved in apoptosis and cell-cycle regulation is useful not only for the understanding of thymic histophysiology but also for the pathogenesis of thymic tumors and autoimmune diseases. Despite numerous studies, there is paucity of multiparametric, combined immunohistological information regarding apoptosis and cell cycle in human thymus in relation to age. Prompted by the above data, we investigated the expression levels and the immunotopographical distribution of major proteins involved in cell cycle and apoptosis regulation and the presence of apoptotic cells.

Therefore, thymuses from adults, adolescents, infants and newborns were studied for the immunohistochemical expression patterns of major apoptosis and cell cycle proteins including bax, bak, bad, bim/BOD, bcl-2, bcl-xL, mcl-1, survivin, FLIP<sub>S/L</sub>, Fas, FasL, caspase-3, cleaved-caspase-3, p53, Rb-1, Hdm2, cyclin A, cyclin B1, cyclinD1, cyclin D2, cyclin D3 and cyclin E. In addition, the distribution of apoptotic cells using the TUNEL method in combination with morphology and cleaved caspase-3 immunostaining was also analysed. Most immunostainings were performed by the LSAB procedure with the use of the Ventana autoimmunostainer and according to manufacturer's protocols and instructions.

The aim of the study were:

- a) to indentify the immunotopographical distribution and the expression levels of the above mentioned proteins in thymic tissue
- b) to identify differences in the immunotopography and the expression levels of the above mentioned proteins in relation to the differentiation of Thymic Epithelial Cells and thymocytes
- c) to identify differences in the expression levels of the above mentioned proteins between Thymic Epithelial Cells and thymocytes
- d) to detect and describe the topographical distribution of apoptotic cells
- e) to analyze the relationship between localization of apoptotic cells and immunotopography/expression levels of proteins involved in the regulation of cell cycle/apoptosis
- f) to identify age-related changes in immunotopography and expression levels of the above mentioned proteins.

Protein expression was correlated with the Thymic Epithelial Cells subtype and thymic lymphocytes, taking into consideration their localization in the thymic parenchyma.

Concerning TECs, Bim/BOD, bcl-xL and survivin expressions were undetectable. Rare isolated cortical and medullary TECs were positive for mcl-1 protein. Bax, bak, bad, bid, bcl-2 and FasL showed a rather similar expression pattern with increasing number of immunopositive cells from the subcapsular region to the medulla. In Hassall Bodies bax, bid and bcl-2 were undetectable. TECs showed widespread caspase-3, Fas and FLIP<sub>S/L</sub> expression, with a less frequent expression of FLIP<sub>S/L</sub> in the cortex.

Concerning thymic lymphocytes, bak, bad, FLIP<sub>S/L</sub> and Fas expressions were undetectable. Survivin and FasL were recognized in isolated cells, the first in cortex and medulla and the second at the corticomedullary region. On the other hand, bax, bid and caspase-3 were widely expressed. Bim/BOD, bcl-2 and mcl-1 showed increasing frequency of positive cells parallel to the direction from the subcapsular region to the medulla, while bcl-xL protein showed the opposite expression pattern.

The expression levels of cyclin A, cyclin B1, cyclin D3, cyclin E and Rb-1 proteins were high in the cortex, mainly in thymocytes but also in epithelial cells, with a tendency for decreasing expression towards the medulla. Cyclin D2 protein

expression was lower in the cortex and higher in the medulla and cyclin D1 was detected only in macrophages. P53 was only detected in rare epithelial cortical cells.

Taken together, immunohistochemistry using cleaved-caspase-3, the TUNEL method and the morphological evaluation revealed that apoptotic cells were lymphoid cells mainly scattered throughout the cortex and in the corticomedullary junction. TUNEL positive cells were very rarely detected in Hassall's corpuscles, but no cleaved caspase-3 positive cells found in Hassall's corpuscles. The proportion of TUNEL positive cells in relation to the topography was 4:1 (cortex:medulla).

The cases with age-related significant thymic involution showed decreased numbers of immunopositive cells including cells expressing proliferation markers while the numbers of apoptotic cells were slightly increased.

The widespread expression of bax possibly reflects a role of the protein in the regulation of apoptosis throughout the multiple stages of T-cell maturation. The overlapping immunotopographical expression of bax, bim/BOD and bcl-2 supports the regulatory relationship suggested for these three proteins by previous in vitro studies. Moreover bim/BOD localization in cortical and medullary lymphocytes is consistent with studies showing expression in Single Positive and Double Positive cells. Immunophysiological evidence indicates that negative selection takes place in the medulla, and bim/BOD expression in this area suggests a role for this proapoptotic protein in this process. Bad protein was undetectable in thymocytes, although in a study in animals it has been detected, but after an intense apoptotic stimulus. This suggests that bad protein may have a regulatory role in thymocytes but under special conditions. Bak expression was undetectable suggesting that this protein does not play a major role in thymocyte apoptosis. Bid protein was expressed throughout the thymus and this possibly means that it is available in its inactive form in all compartments of the thymus in order to be able to become truncated and activated when needed.

Anti-apoptotic proteins Bcl-2 and mcl1 were preferentially located at the medullary thymocytes indicating a role of the protein in the survival of mature lymphocytes, while Bcl-xL was preferentially located at the cortical thymocytes. At this localization Bcl-xL may be related to the survival signals that the immature lymphoid cells receive before their positive selection or related to the protection of immature Double Positive lymphoid cells from death by neglect. FLIP<sub>S/L</sub> was undetectable in thymocytes suggesting that this protein does not play a major role in cell survival events in thymic



lymphocytes. Survivin was detected in isolated thymocytes and it is believed that this protein may have a role at different stages at the maturation, homeostasis and proliferation of T-cells.

Fas and FasL, except a few thymocytes at the corticomedullary junction which are positive for FasL, are only expressed in TECs indicating a functional significance of these cells in the regulation of thymic apoptotic process.

Widespread expression of caspase-3 is possibly associated with its immediate availability during the cell function in order to complete the selection and maturation processes. Increased number of apoptotic lymphoid cells at the cortex and corticomedullary junction, as it has been indicated by the immunohistochemical expression of cleaved-caspase-3 and the TUNEL method, may be associated to the increased lymphoid cell proliferation at these areas.

Cell cycle proteins cyclin A, cyclin B1, cyclin D3 and cyclin E (and Ki67 from our previous studies) showed higher expression in the cortical area, which is characterized by higher proliferative activity than the medulla. In contrast cyclin D2 localization in the medulla indicates an increased expression at the areas with low proliferative activity and increased cell differentiation, suggesting a role for cyclin D2 in cell differentiation from the cortex to the medulla. Our results emphasize the differential usage of cyclins in cell proliferation or differentiation process.

**In total, in TECs** there is increasing expression of proapoptotic proteins bax, bak, bad and bid and a decreasing expression of the cyclins A, B1, D3 and E from the cortex to the medulla. This suggests concordant decrease of cell proliferation and increase of cell death potential from the cortex to the medulla. Nevertheless, the high expression of the antiapoptotic proteins bcl-2 and FLIP<sub>S/L</sub> in medullary TECs, the absence of cleaved caspase-3 immunostaining and the absence of TUNEL positive medullary TECs, suggests activation of cell survival program in medullary TECs. These findings suggest reduction of the proliferative and a balance between apoptotic potential and survival potential of Thymic Epithelial Cells from the cortex to the medulla.

**In Hassall Bodies**, there are high expression levels of proapoptotic proteins bak and bax but the proapoptotic potential seems to be balanced by the high expression of the antiapoptotic protein FLIP<sub>S/L</sub> since cleaved caspase-3 positive cells were not detected and that only rare TUNEL positive cells were observed in Hassall Bodies. In Hassall Bodies there is important decrease of the proliferative potential since only a few cells

with expression of cyclins D2 and D3 were found while cyclins A, B1 and E were undetectable, and our previous studies showed high expression of CDK Inhibitors p16, p21 and p27. In addition, we found in our previous studies that Hassall Bodies express higher levels of many cytokeratins and neural/neuroendocrine proteins than other TECs. Taken together, the above data suggest that Hassall Bodies are highly differentiated epithelial structures with low potential of cell proliferation and cell death and evidence of cell senescence. In favor of this hypothesis are also our previous findings that HBs are characterized by high p21 expression which has been associated with terminal cell differentiation and high p16 expression which has been associated with cell senescence.

**In thymocytes**, there is high expression of the pro-apoptotic proteins bax and bid and low bim expression in both cortex and medulla, absence of expression of the pro-apoptotic proteins bak and bad, increasing expression of the anti-apoptotic proteins bcl-2 and mcl1, decreasing expression of cyclins A, B1, D3 and E, decreasing expression of cleaved caspase-3 and decreasing number of TUNEL positive cells from the cortex to the medulla. These findings suggest reduction of the proliferative and apoptotic potential and increase of the survival potential of thymocytes from the cortex to the medulla.

The present study a) reveals the variability of the immunotopographical distribution and the expression levels of proteins playing central roles in the regulation of apoptosis and cell cycle in the human thymuses from various age groups, b) shows changes in the expression levels of these proteins in relation to the differentiation of lymphoid and epithelial cells, c) demonstrates differences in the expression patterns of these proteins between TECs and thymocytes, and d) shows reduction of the proliferative and apoptotic potential and increase of the survival potential of thymocytes and TECs from the cortex to the medulla. Moreover, our findings might be helpful for the further understanding of pathogenesis of thymic tumors and the autoimmune disorders involving thymus.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Hong R. The thymus. Finally getting some respect. *Chest. Surg. Clin. N. Am.* 2001;11:295-310
2. Robbins and Cotran, *Pathologic Basis of the Disease*, 8<sup>th</sup> edition, 2010. Kumar V, Abas A, Fausto N, Aster J (Eds), Elsevier Saunders. Aster J, Chapter 13, Diseases of white blood cells, lymph nodes, spleen and thymus
3. Leonidas JC. The thymus: from past misconception to present recognition. *Pediatr. Radiol.* 1998;28:275-282
4. Gray's Anatomy, *The anatomical Basis of Clinical Practice*, 14<sup>th</sup> Edition, 2008. Editor in Chief Standring S, Churchill Livingstone, Elsevier. Section 7 Thorax, Thymus, p. 945-949.
5. Junqueira LC, Carneiro J, *Βασική Ιστολογία*, Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2008. Τόμος α ISBN 960399182-1, Τόμος β ISBN 960399183-x
6. Stevens A, Lowe J, *Ιστολογία του Ανθρώπου*, Εκδόσεις Πασσαλίδης, Αθήνα, 2008. ISBN 978960399652-1
7. Moore K, Persaud T, *Η ανθρώπινη διάπλαση – Εμβρυολογία κλινικού προσανατολισμού*. Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2009. ISBN 978960399806-8
8. Kirschner PA. The history of surgery of the thymus gland. *Chest. Surg. Clin. N. Am.* 2000;10:153-165
9. Miller JF. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961;2:748-749
10. Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF. Thymus marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1966;122:1167-1171
11. Miller JF, Mitchell GF. The thymus and the precursors of antigen reactive cells. *Nature* 1967;216:659-663
12. Mitchell GF, Miller JF. Immunological activity of thymus and thoracic duct lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968;59:296-303
13. Miller JF, Basten A, Sprent J, Cheers C. Interaction between lymphocytes in immature responses. *Cell Immunol.* 1970;2:469-495
14. Miller JF, Sprent J. Cell to cell interaction in the immune response. VI. Contribution of thymus derived cells and antibody forming cell precursors to immunological memory. *J. Exp. Med.* 1971;134:66-82
15. Gartner LP, Hiatt JL, *Εγχειρίδιο Ιστολογίας*. Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2010. ISBN 9789603946762
16. Larsen WJ, *Ανατομία-Ανάπτυξη, Λειτουργία, Κλινικές Συσχετίσεις*, Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2007. ISBN 9789603944881
17. Moore KL, *Κλινική Ανατομία*, Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 1998. Τόμος α ISBN 9607398599, Τόμος β ISBN 9607398602
18. *Roitt's Essential Immunology*, 10<sup>th</sup> Edition, 2001. Roitt IM, Delves PJ (Eds), Blackwell Publishing. Chapter 5, p. 80-107
19. Elmore SA. Histopathology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 2006;34:656-665
20. Jaretzki A III, Wolff M. "Maximal" thymectomy for myasthenia gravis. Surgical anatomy and operative results. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1988;96:711-776
21. Bodey B, Bodey BJR, Siegel SE, Kemshead JT, Kaiser HE. Identification of Neural Crest Derived Cells within the Cellular Microenvironment of the human thymus employing a Library of Monoclonal Antibodies Raised Against Neuronal tissues. *In Vivo* 1996;10:39-48
22. *Neoplastic Hematopathology*, 2<sup>nd</sup> edition, 2001. Daniel M. Knowles (Eds), Lippincott Williams & Wilkins. DeWolf-Peters C, Tierens A, Achten R, Chapter 6, Normal Histology and Immunoarchitecture of the Lymphohematopoietic System, p. 271-305
23. Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:278-289
24. Campana D, Janossy G, Coustan-Smith E, Amlot PL, Tian WT, Ip S, Wong L. The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man. *J. Immunol.* 1989;142:57-66
25. Haynes BF. The human thymic microenvironment. *Advances in Immunology*, 1984;36:87-142

26. Kurtzberg J, Bigner SH, Herdfield MS. Establishment of the DU528 human lymphohemopoietic stem cell line. *J. Exp. Med.* 1985;162:1561-1578
27. Strominger JL. Developmental biology of T cell receptors. *Science* 1989;244:943-950
28. Cahill RN, Kimpton WG, Washington EA, Holder JE, Cunningham CP. The ontogeny of T cell recirculation during fetal life. *Semin. Immunol.* 1999;11(2):105-114
29. Wilson CB. The ontogeny of T lymphocyte maturation and function. *J. Pediatr.* 1991;118:S4-S9
30. Siegel I, Gleicher N. Development of the fetal immune system. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1981;70:31-40
31. Fontaine-Perus JC, Calman FM, Kaplan C, Le Douarin NM. Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. *J. Immunol.* 1981;126(6):2310-2316
32. Jotereau F, Hauze F, Salomon-Vie V, Gascan H. Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration. *J. Immunol.* 1987;138:1026-1030
33. Vicente A, Varas A, Sacedon R, Zapata AG. Histogenesis of the epithelial component of rat thymus: an ultrastructural and immunohistochemical analysis. *Anat. Rec.* 1996;244:506-519
34. Gale RP. Development of the immune system in human fetal liver. *Thymus* 1987;10:45-56
35. Lobach DF, Haynes BF. Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J. Clin. Immunol.* 1987;7:81-97
36. Res P, Martinez-Caceres E, Jaleco AC, Staal F, Noteboom E, Weijer K, Spits H. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>dim</sup> cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 1996;87:5196-5206
37. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 2005;6:331-337
38. Hammar JA. Uber progressive und regressive formen von Hassallschen Korpern. *Z. Anat.* 1924;70:466-488
39. Lobach DF, Scarce RM, Haynes BF. The human thymic microenvironment. Phenotypic characterization of Hassall's bodies with the use of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1985;134:250-257
40. Bodey B, Kaiser HE. Development of Hassall's bodies of the thymus on humans and other vertebrates (especially mammals) under physiological and pathological conditions: immunocytochemical, electromicroscopic and in vitro observations. *In vivo* 1997;11:61-86
41. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 2006;34:504-514
42. Kato S. Thymic Microvascular system. *Micr. Res. Tech.* 1997;38:287-299
43. Vaughan DW, A learning system in histology, Oxford University Press, 2002. Chapter Lymphoid Tissues and Organs, Thymus, p. 115-125
44. Bloom and Fawcett: A textbook of histology, 12<sup>th</sup> edition, 1997. Fawcett DW and Raviola E (Eds), Chapman and Hall: New York, NY. Chapter 14, Thymus, p. 432-446
45. Hiramane C, Hojo K, Koseto M, Nakagawa T, Mukasa A. Establishment of a murine thymic epithelial cell line capable of inducing both thymic nurse cell formation and thymocytes apoptosis. *Lab Invest.* 1990;62(1):41-54
46. Elmore SA. Histopathology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 2006;34:656-665
47. Von Gaudecker B, Muller-Hermekinck HK. Ontogeny and organization of the stationary non-lymphoid cells in the human thymus. *Cell Tissue Res.* 1980;207:287
48. Van de Wijngaert P, Kendall MD, Schurman HJ, Rademakers, LH, Kaler L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus: an ultrastructure study. *Cell Tissue Res.* 1984;237:227
49. Brelinska R, Malinska A. Homing of hemopoietic precursor cells to the fetal rat thymus: intercellular contact-controlled cell migration and development of the thymic microenvironment. *Cell Tissue Res.* 2005;322:393-405
50. Sands SS, Meek WD, Hayashi J, Ketchum RJ. Medium calcium concentration determines keratin intermediate filament density and distribution in immortalized cultured thymic epithelial cells (TECs). *Microsc Microanal.* 2005;11(4):283-292

51. Balercia G, Accordini C, Franceschini F, Blazsek I, Osculati F. An ultrastructural study of normal human thymic epithelium in primary cultures. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1990;22(2):311-325
52. Hendrix TM, Chilukuri RV, Martinez M, Olushoga Z, Blake A, Brohi M, Walker C, Samms M, Guyden JC. Thymic nurse cells exhibit epithelial progenitor phenotype and create unique extra-cytoplasmic membrane space for thymocyte selection. *Cell Immunol.* 2010;261(2):81-92
53. Von Gaudecker B, Kendall MD, Ritter MA. Immuno-electron microscopy of the thymic epithelial microenvironment. *Microsc Res Tech.* 1997;1(38):237-249
54. Koble C, Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med.* 2009;206(7):1505-1513
55. Nowell CS, Farley AM, Blackburn CC. Thymus organogenesis and development of the thymic stroma. *Methods Mol Biol.* 2007;380:125-162
56. Senelar R, Escola MJ, Escola R, Serrou B, Serre A. Relationship between Hassall's corpuscles and thymocytes fate in guinea pig fetus. *Biomed.* 1976;24(2):112-122
57. Nishio H, Matsui K, Tsuji H, Tamura A, Suzuki K. Immunolocalization of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in Hassall's corpuscles of the human thymus. *Acta Histochem.* 2001;103(1):89-98
58. Romagnani P, Annunziato F, Manetti R, Mavilia C, Lasagni L, Manuelli C, Vannelli GB, Vanini V, Maggi E, Pupilli C, Romagnani S. High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassall's corpuscles in the medulla of human thymus. *Blood* 1998;91(9):3323-3332
59. Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J. Immunol.* 2002;168(6):2609-2617
60. Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Beltrame C, Steiner BH, Lazzeri E, Raport CJ, Galli G, Manetti R, Mavilia C, Vanini V, Chantry D, Maggi E, Romagnani S. Macrophage-derived chemokine and EB11-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection. *J. Immunol.* 2000;165(1):238-246
61. Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* 1997;18:350-361
62. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol. Rev.* 2006;209:290-296
63. *Histology for Pathologists, 3<sup>rd</sup> Edition.* Mills SE (Eds), Lippincott Williams and Wilkins. Suster S, Rosai J, Chapter 19, Thymus, p. 505-527
64. Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin. Immunol.* 2005;17:304-312
65. Pakurar AS, Bigbee JW. *Digital Histology, Wiley-Liss, 2004.* Chapter 14, Lymphoid System, pages 135-144
66. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr. Topics Pathol.* 1986;75:43-88
67. Bodey B, Bodey BJR, Siegel ES, Kaiser ES. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In vivo* 1997;11:421-440
68. Pido Lopez J, Imami N, Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic emigrants in females than males as they age. *Clin. Exp. Immunol.* 2001;125:409-413
69. Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelinelink HK. The involution of the aging human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* 1985;22:563-575
70. Kendall MD, Johnson HRM, Singh J. The weight of the thymus gland at necropsy. *J Anat.* 1980;131:485-499
71. Kaiser HE, Krenn M, Bodey BJR, Bodey B. Involution and neoplasms of the thymus. *In vivo* 2000;14:189-198
72. Simmons VP. Thymic "atrophy" at puberty is a myth. *Med. Hypotheses* 1987;22:299-301
73. Simpson JG, Gray ES, Beck JS. Age involution in the normal adult thymus. *Clin. Exp. Immunol.* 1975;19:261-265
74. George AJT, Ritter MA. Thymic involution with aging: obsolescence or good housekeeping? *Immunol. Today* 1996;17:267-272



75. Aw D, Silva AB, Maddick M, Von Zglinicki T, Palmer DB. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell* 2008;7(2):158-167
76. Bertho JM, Demarquay C, Moulian N, Van Der Meeren A, Berrih-Aknin S, Gourmelon P. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell. Immunol.* 1997;179:30-40
77. Charleton W. *De oeconomia minimalum. Exercitat. Phys. Anat.* , Amstelod, 1659
78. Shiraiishi J, Utsuyama M, Seki S, Akamatsu H, Sunamori M, Kasai M, Hirokawa K. Essential microenvironment for thymopoiesis is preserved in human adult and aged thymus. *Clin. Devel. Immunol.* 2003;10(1):53-59
79. Hartwig M, Steinmann G. On a causal mechanism of chronic thymic involution in man. *Mech. Ageing Develop.* 1994;75:151-156
80. Deschaux P, Khan NA. Immunophysiology: the immune system as a multifactorial physiologic unit. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1995;41:1-10
81. Tolosa E, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids and the regulation of antigen-specific T-cell development. *Neuroimmunomodulation* 1999;6:90-96
82. Kinkade PW, Medina KL, Smithson G. Sex hormones as negative regulators of lymphopoiesis. *Immunol. Rev.* 1994;137:119-134
83. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998;396:690-695
84. Flores KG, Li J, Sempowski GD, Haynes BF, Hale LP. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J. Clin. Invest.* 1999;104:1031-1039
85. Douek KC, Koup RA. Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine* 2000;18:1638-1641
86. Sen J. Signal transduction in thymus development. *Cell. Mol. Biol.* 2001;47:197-215
87. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Is thymocyte development functional in the aged? *Aging* 2009;1(2):146-153
88. Utsuyama M, Hirokawa K, Kurashima C, Fukayama M, Inamatsu T, Suzuki K, Hashimoto W, Sato K. Differential age-change in the number of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T and CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>T cells in the human peripheral blood. *Mech. Ageing Dev.* 1992;63(1):57-68
89. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *J. Immunol.* 2004;173:245-250
90. Heng TS, Goldberg GL, Gray DH, Sutherland JS, Chidgey AP, Boyd RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J. Immunol.* 2005;175:2982-2993
91. Zhu X, Gui J, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su DM. Lymphohematopoietic progenitors do not have a synchronized defect with age-related thymic involution. *Aging Cell* 2007;6:663-672
92. Li L, Hsu HC, Grizzle WE, Stockard CR, Ho KJ, Lott P, Yang PA, Zhang HG, Mountz JD. Cellular mechanism of thymic involution. *Scand. J. Immunol.* 2003;57:410-422
93. Aspinall R, Andrew D. Age-associated thymic atrophy is not associated with a deficiency in the CD44(+)CD25(-)CD3(-)CD4(-)CD8(-) thymocyte population. *Cell. Immunol.* 2001;212:150-157
94. Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.* 2000;20:250-256
95. Ceredig R, Streyer M. Immunohistochemical localization of host and donor-derived cells in the regenerating thymus of radiation bone marrow chimeras. *Thymus* 1984;6:15-26
96. Brahim F, Osmond DG. Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective bone marrow labeling with thymidine-H3. *Anat. Rec.* 1970;168:139-159
97. Brumby M, Metcalf D. Migration of cells to the thymus demonstrated by parabiosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967;124:99-103
98. Haynes BF, Sempowski GD, Wells AF, Hale LP. The human thymus during aging. *Immunol. Res.* 2001;22:253-261
99. Haynes BF, Heinly CS. Early human T-cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J. Exp. Med.* 1995; 181:1445-1458

100. Haynes BF. Phenotypic characterization and ontogeny of components of the human thymic microenvironment. *Clin. Res.* 1984;32:500-507
101. Moore MA, Owen JJ. Experimental studies on the development of the thymus. *J. Exp. Med.* 1967;126:168-174
102. Itoi M, Kawamoto H, Katsura Y, Amagai T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int. Immunol* 2001;13:1203-1211
103. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 1990;2:3-12
104. Foss DL, Donskoy E, Goldschneider I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J. Exp. Med.* 2001;193:365-374
105. Ushiki T, Takeda M. Three-dimensional ultrastructure of the perivascular space in the rat thymus. *Arch. Histol. Cytol.* 1997;60:89-99
106. Kato S, Schoefl GI. Microvasculature of normal and involved mouse thymus. Light and electron-microscopic study. *Acta Anat.* 1989;135:1-11
107. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development
108. Haynes BF, Hale LP. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. *Immunol. Res.* 1998;18:175-192
109. Wu L, Livak F, Petrie HT. TCR-independent development of pluripotent T-cell precursors. In: Monroe JC, Rothenberg EV (Eds). *Molecular Biology of B-cell and T-cell Development*. Totowa NJ. Humana Press, Inc, 1998:285-303
110. Shortman K, Vremec D, Corcoran LM, Georgopoulos K, Lucas K, Wu L. The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol. Rev.* 1998;165:39-46
111. Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 1993;150:4244-4252
112. Petrie HT, Livak F, Burtrum D, Mazel S. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J. Exp. Med.* 1995;182:121-127
113. Anderson MK. At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol. Reviews* 2006;209:191-211
114. Xing Z, Conway EM, Kang C, Winoto A. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis *J. Exp. Med.* 2004;199(1):69-80
115. Hernandez JB, Newton RH, Walsh CM. Life and death in the thymus – cell death signaling during T cell development. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22:865-871
116. Terstappen LW, Huang S, Picker LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood* 1992;79:666-677
117. Spits H, Blom B, Jaleco AC, Weijer K, Verschuren MC, Van Dongen JJ, Heemskerk MH, Res PC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol. Rev.* 1998;165:75-86
118. Penit C. Localization and phenotype of cycling and post-cycling murine thymocytes studied by simultaneous detection of bromodeoxyuridine and surface antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 1988;36:473-478
119. Von Boehmer H, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J, Azogui O. Pleiotropic changes controlled by pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 1999;11:135-142
120. Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, Von Boehmer H. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 1995;375:795-798
121. Wiest DL, Berger MA, Carleton M. Control of early thymocyte development by the pre-T-cell receptor complex: a receptor without a ligand? *Semin. Immunol.* 1999;11:251-262
122. Petrie HT, Tourigny M, Burtrum DB, Livak F. Precursor thymocyte proliferation and differentiation are controlled by signals unrelated to the pre-TCR. *J. Immunol.* 2000;165:3094-3098

123. Jameson SC, Bevan MJ. T-cell selection. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10:214-219
124. Sebzda E, Mariathanasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Oshashi P. Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:829-874
125. Chidgey AP, Boyd RL. Thymic stromal cells and positive selection. *APMIS* 2001;109:481-492
126. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100-103
127. Von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:219-228
128. Alberola-Ila J, Takaki S, Kerner JD, Perlmutter RM. Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:125-154
129. Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2001;356:609-616
130. Res P, Spits H. Developmental stages in the human thymus. *Sem. Immunol.* 1999;11:39-46
131. Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:229-239
132. Palmer E. Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev.* 2003;3:383-391
133. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101:455-458
134. Wagner DH Jr. Re-shaping the T cell repertoire: TCR editing and TCR revision for good and for bad. *Clin. Immunol.* 2007;123:1-6
135. Xing X, Conway EM, Kang C, Winoto A. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. *J. Exp. Med.* 2004;199(1):69-80
136. Dyal R, Nikolic-Zugic J. The majority of postselection CD4<sup>+</sup> single-positive thymocytes requires the thymus to produce long-lived, functional T cells. *J. Exp. Med.* 1995;181:235-245
137. Berzins SP, Godfrey DI, Miller JF, Boyd RL. A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:9787-9791
138. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. *Science* 1994;265:1237-1240
139. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, De Vries JE, Roncarolo MG. *Nature* 1997;389:737-742
140. Mosmann TR, Coffman RL. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:145-173
141. Liu YJ. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol.* 2006;27(5):215-221
142. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;436(7054):1181-1185
143. Debrinski J, Kyewski B. Linking signaling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2005;26:503-506
144. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, Von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 2005;6:1219-1227
145. Hadden JW. Thymic endocrinology. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1998;840:216-226
146. Schuurman HJ, Kuper F, Kendall M. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Micr. Res. Tech.* 1997;38:216-226.
147. Ritter MA, Boyd LR. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol. Today* 1993;14:462-468
148. Dardenne M. Role of thymic peptides as transmitters between the neuroendocrine and immune systems. *Ann. Med.* 1999;31(Suppl):S34-S39
149. Laquer L. Beitrage zur lehre von der Erbsche krankheit. I. Ueber die (myasthenia graics). *Neurol. Centralbl.* 1901;20:594-597
150. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972;26:239-257
151. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15:2922-2933
152. Hortvitz HR. Worm, life and death. *ChemBiochem.* 2003;4:697-711

153. Danial NN, Krosmeier SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219
154. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:2239-2244
155. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98:2603-2614
156. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634-1635
157. Sheikh MS, Fornace AJ. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 2000;14:1509-1513
158. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 2002;6:191-197
159. Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001;15:1022-1032
160. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;26:1324-1337
161. Schultz DR, Harrington WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Sem. Arthr. Rheumat.* 2003;32:345-369
162. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999;59 Suppl 7:1693s-1700s
163. Van der Heiden M, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xl prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* 1999;3:159-167
164. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana C, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR, Newmeyer DD. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J. Cell Biol.* 1999;147: 809-822
165. Mayer A, Neupert W, Lill R. Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1995;270:12390-12397
166. Peter ME, Kramer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10:26-35
167. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspases-9 activation and apoptosis. *EMBO* 1999;18:3586-3595
168. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and ATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 1999;274:17941-17945
169. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An Apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999;274:17941-17945
170. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1999;15:269-290
171. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspases cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspases-9 dependent manner. *J. Cell Biol.* 1999;144:281-292
172. Van der Heiden M, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biol.* 1999;1:209-216
173. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biol.* 2000;2:156-162
174. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement of dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157
175. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the incorrect bystander scenario. *Cell Death Differ.* 2006;13:1396-1402

176. Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S, Martinou JC. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J. Cell Biol.* 1999;144:883-889
177. Potts MB, Vaughn AE, McDonough H, Patterson C, Deshmukh M. Reduced apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J. Cell Biol.* 2005;171:925-930
178. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, De la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998;94:339-352
179. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 2002;419:634-637
180. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003;112:481-490
181. Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad: hardened killers or incorrect bystanders? *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005;17:626-630
182. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626-629
183. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53
184. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42
185. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-304
186. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997;16:6914-6925
187. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 1997;186:27-37
188. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 1996;184:1331-1341
189. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green D, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136
190. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132
191. Van der Heiden M, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xl regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627-637
192. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:4997-5002
193. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 2008;18:157-164
194. Hacker G, Weber A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch. Biochem. Biophys.* 2007;462:150-155
195. Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int. J. Cancer* 2006;19:2036-2043

196. Giam M, Huang DCS, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 2009;27:S128-S136
197. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675-1687
198. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002;7:433-440
199. Rathmell JC, Thimpson CB. The central effectors of cell death in the immune system *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:781-828
200. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-446
201. Yuan J, Shahan S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *c. Elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-652
202. Ellis RE, Yuan J. , Horvitz HR. Mechanisms and function of cell death. *Annu Rev. Cell Biol.* 1991;7:663-698
203. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: on the on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2001;14:1514-1525
204. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6:1028-1042
205. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005;21:35-56
206. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochem. Biophys. Acta* 1998;1387:17-31
207. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000;103:273-282
208. Roth KA. Caspases, apoptosis, and Alzheimer's disease: causation, correlation, and confusion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001;60:829-838
209. Grutter MG. Caspases: Key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000;10:649-655
210. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997;326:1-16
211. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424
212. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwanatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50
213. Froelich CJ, Dixit VM, Yang X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol. Today* 1998;19:30-36
214. Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Kramer PH. Cleavage of FLICE (caspases-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 1997;27:3492-3498
215. Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I, Turner PC, Moyer RW, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase-3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J. Biol. Chem.* 1998;273:21261-21266
216. Heibin JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* 2000;192:1391-1402
217. Barry M, Heibin JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* 2000;192:1391-1402
218. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3:401-410
219. Deveraux QL, Roy HR, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula M, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspases-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;17:2215-2223



220. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:239-252
221. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med.* 1997;3:917-921
222. Silke J, Vaux DL. Two kinds of BIR-containing protein-inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J. Cell Sci.* 2001;114:1821-1827
223. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
224. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature Cell Biol.* 1999;1:461-466
225. Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J.* 2002;21:2602-2615
226. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* 2003;22:2729-2740
227. Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh WK, Duncan GS, Ciofani M, Rottapel R, Zúñiga-Pflücker JC, Mak TW. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J. Exp. Med.* 2004;199:399-410
228. Speliotes EK, Uren A, Vaux D, Horvitz HR. The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts in the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol. Cell* 2000;6:211-223
229. Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol.* 2000;10:1319-1328
230. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-584
231. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:21457-1462
232. Lens SM, Wolthuis RM, Klompmaker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, Kops G, Medema RH. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* 2003;22:2934-2947
233. Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley S. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* 2003;116:2987-2998
234. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:67-71
235. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:63-67
236. Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2:647-656
237. Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, Simms HH. The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 2000;68:158-166
238. Chuang PI, Yee E, Karsan A, Winn RK, Harlan JM. A1 is constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;249:361-365
239. Hatakeyama S, Hamasaki A, Negishi I, Loh DY, Sendo F, Nakayama K, Nakayama K. Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2 related genes, A1. *Int. Immunol.* 1998;10:631-637
240. Lin EY, Orlofsky A, Berger MS, Prystowsky MB. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarly to bcl-2. *J. Immunol.* 1993;151:1979-1988
241. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336

242. Wyllie AH. Apoptosis. Cell death in tissue regulation. *J. Pathol.* 1987;153:313-316
243. Zhu WJ, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW. Bcl-2 mutants with restricted subcellular localization reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* 1996;15:4130-4141
244. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619
245. Diaz JL, Oltersdorf T, Horne W, McConnel M, Wilson G, Weeks S, Garcia T, Fritz LC. A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.* 1997;272:11350-11355
246. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* 2000;20:929-935
247. Yasuda M, Chinnadurai G. Functional identification of the apoptosis effector BH3 domain in cellular protein bnip1. *Oncogene* 2000;19:2363-2367
248. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature* 1994;369:321-323
249. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 1995;14:5589-5596
250. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bid: A novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 1996;10:2859-2869
251. Hsu YT, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* 1998;273:10777-10783
252. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997;139:1281-1292
253. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:3878-3885
254. Gao S, Fu W, Durrenberger M, De Geyter C, Zhang H. Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell Mol. Life Sci.* 2005;62:1015-1024
255. Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* 2003;17:2922-2932
256. Willis SN, L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displayed by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005;19:1294-1305
257. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ, et al. Bik, a novel death inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 1995;11:1921-1928
258. Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004;101:15313-15317
259. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EH, Tjandra N, Walensky LD. Bax activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 2008;455:1076-1081
260. Ayllon V, Fleischer SJ, Cayla X, Garcia A, Rebollo A. Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J. Immunol.* 2002;168:3387-3393
261. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 1998;14:111-136
262. Cottin V, Doan JES, Riches DWH. Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain. *J. Immunol.* 2002;168:4095-4102

263. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727-730
264. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 2007;70:73-91
265. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183-192
266. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by Bcl-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 2006;8:1348-1358
267. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Mefflah K, Vallette FM, Juin P. The first  $\alpha$ -helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 2004;16(5):807-818
268. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005;17:617-625
269. Leber B, Lin J, Andrews DW. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 2007;12:897-911
270. Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, Leber B, Andrews DW. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.* 2006;25:2287-2296
271. Peng J, Tan C, Roberts GJ, Nikolaeva O, Zhang Z, Lapolla SM, Primorac S, Andrews DW, Lin J. tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J. Biol. Chem.* 2006;281:35802-35811
272. Danial N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin. Cancer Res.* 2007;13(24):7254-7263
273. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med.* 2003;7:249-257
274. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in-vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 1999;144:903-914
275. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993;53:4701-4714
276. Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 1993;268:25265-25268
277. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life or death switch. *FEBS Lett.* 2000;466:6-10
278. Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC, Zhang XK. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 2004;116:527-540
279. Cao X, Liu W, Lin F, Li H, Kolluri SK, Lin B, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol. Cell Biol.* 2004;24:9705-9725
280. Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM. P53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res.* 2008;18:733-744
281. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608
282. Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P, Whyte MKB. Exon skipping in Mcl-1 results in Bcl-2 homology Domain 3 only gene product that promotes cell death. *J. Biol. Chem.* 2000;275:22136-22146

283. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspases 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501
284. Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ. BH3 domain of Bad is required for heterodimerization with Bcl-xL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 1997;272:24101-24104
285. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ.* 2005;12:1008-1014
286. Hubner A, Barrett T, Flavell R, Davis R. Multi-site phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol. Cell* 2008;30(4):415-425
287. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/JUN N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell Biol.* 1999;19:8469-8478
288. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997;278:1966-1968
289. Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veluona MA, Hardwick JM. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=> Modulation of cell death by Bcl-xL through caspases interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:554-559
290. Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B, Martinou JC. Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspases 8. *Mol. Cell* 2001;8:601-611
291. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:8447-8454
292. Tepper CG, Seldin MF. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 1999;94:1727-1737
293. Caelles C, Helmborg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994;370:220-223
294. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000;60:3689-3695
295. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2001;1:222-231
296. Prives C, Hall P. The p53 pathway. *J. Pathol.* 1999;187:112-126
297. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer* 1999;35:1886-1894
298. Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways: Molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 1998;94:555-558
299. Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol* 1997;183:134-140
300. Gillett CE, Barnes DM. Demystified. . . cell cycle. *Mol. Pathol.* 1998;51(6):310-316
301. McDonald RE, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol.* 2000;16:871-886
302. Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N. pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc. Natl. Acad. USA* 1998;95:11945-11950
303. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:1220-1235
304. Brady HJM, Gil-Gomez G, Kirberg J, Berns A. Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J.* 1998;15:6991-7001
305. Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:7209-7218
306. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-1322

307. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed CJ. Immunohistochemical Analysis of in Vivo Patterns of Bcl-X Expression. *Cancer Res.* 1994;1:5501-5507
308. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. *Am. J. Pathol.* 1994;145(6):1323-1336
309. Hockenbery MD, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer JS. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:6961-6965
310. Chen FF, Yan JJ, Chang KC, Lai WW, Chen RMY, Jin YT. Immunohistochemical localization of Mcl-1 and bcl-2 proteins in thymic epithelial tumors. *Histopathology* 1996;29:541-547
311. Spaulding B, Pan D, Ghadersohi A, Nielsen G, Jensen S, Gellert F, Ling X, Zhang M, Black A, Li F. Characterization of the 12C4 survivin monoclonal antibody and insight into the expression of survivin in human adult tissues. *Histopathol.* 2006;49(6): 622-633
312. Resendes AR, Majo N, Segales J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M, Domingo M. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004;99:203-213
313. Mikami O, Yamaguchi H, Murata H, Nakajima Y, Miyazaki S. Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets. *J. Vet. Sci.* 2010;11(2):107-113
314. Kobayashi Y, Yukiue H, Sasaki H, Fukai I, Yokoyama T, Kitiyama M, Yamakawa Y, Maeda M, Fujii Y. Development regulated expression of survivin in the human thymus. *Hum. Immunol.* 2002;63(2):101-107
315. Zhou H, Perkins LS, Tripp S, Hussong WJ, Coffin MC. Expression of Apoptosis-related Antigens, Fas, bcl-2, p53, and Mib-1 proliferation index in the hypoplastic thymus of DiGeorge syndrome. *Ped. Dev. Pathol.* 2002;5:465-471
316. Strater J, Mariani SM, Walczac H, Rucker FG, Leithausser F, Krammer PH, Moller P. CD95 ligand (CD95L) in normal human lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 1999;154(1):193-201
317. Sentman LC, Shutter RJ, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer JS. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67: 879-888
318. Khoury T, Arshad A, Bogner P, Ramnath N, Zhang S, Chandrasekhar R, Wilding G, Alrawi S, Tan D. Apoptosis-related (Survivin, Bcl-2), tumor suppressor gene (p53), proliferation (Ki-67), and non-receptor tyrosine kinase (Src) markers expression and correlation with clinicopathologic variables in 60 thymic neoplasms. *Chest* 2009;136:220-228
319. Rodriguez-Puebla ML, LaCava M, Miliani de Marval PL, Jorcano JL, Richie ER, Conti CJ. Cyclin D2 overexpression in transgenic mice induces thymic and epidermal hyperplasia whereas cyclin D3 expression results only in epidermal hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 2000;157(3):1039-1050
320. Doglioni C, Chiarelli C, Macri E, Dei Tos AP, Meggiolaro E, Palma PD, Barbareschi M. Cyclin D3 expression in normal, reactive and neoplastic tissues. *J. Pathol.* 1998;185:159-166
321. Kang MJ, Kim MK, Terhune A, Park JK, Kim YH, Koh GY. Cytoplasmic localization of cyclin D3 in seminiferous tubules during testicular development. *Exp. Cell Res.* 1997;234:27-36
322. Roig MB, Roset R, Ortet L, Balsiger NA, Anfosso A, Cabellos L, Garrido M, Alameda F, Brady HJM, Gil-Gomez G. Identification of a novel cyclin required for the intrinsic apoptosis pathway in lymphoid cells. *Cell Death Differ.* 2009;16:230-243
323. Park SH, Kim HK, Kim H, Ro JY. Apoptosis in thymic epithelial tumors. *Pathol. Res. Pract.* 2002;198:461-467
324. Stefanaki K., Rontogianni D, Kouvidou CH, Bolioti S, Delides G, Pantelidaki A, Sotsiou F, Kanavaros P. Expression of p53, mdm2, p21/waf1 and bcl-2 proteins in thymomas. *Histopathology* 1997;30:549-555

325. Kanavaros P, Stefanaki K, Rontogianni D, Papalazarou D, Spantzos M, Arvanitis D, Vamvouka C, Gorgoulis V, Siatitsas I, Agnantis NJ, Bai M. Immunohistochemical expression of p53, p21/waf1, Rb, p16, cyclin A, cyclin B1, bcl-2, bax and bak proteins and apoptotic index in normal thymus. *Histol. Histopathol.* 2001;16(4):1005-1012
326. Hiroshima K, Iyoda A, Toyozaki T, Supriatna Y, Shibuya K, Shimamura F, Haga Y, Yoshida S, Fujisawa T, Ohwada H. Proliferative activity and apoptosis in thymic epithelial neoplasms. *Mod. Pathol* 2002;15(12):1326-1332
327. Brocheriou I, Carnot F, Briere J. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in thymoma. *Histopathol.* 1995;27:251-255
328. Ramos P, Gangi, MD, Baren, A, Filippa, D, Elkon KB. Immunohistochemical analysis of murine CD95/Fas/Apo-1 receptor and its ultrastructural distribution in the thymus. *APMIS* 1997;105:597- 602
329. Engel P, Dorthe F, Niels G. Expression of bcl-2 in fetal thymus, thymomas and thymic carcinomas. Association with p53 expression and review of the literature. *APMIS* 1998;106:449-455
330. Salakou S, Tsamandas AC, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Dougenis D. The potential role of bcl-2, bax and Ki67 expression in thymus of patients with myasthenia gravis and their correlation with clinicopathologic parameters. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* 2001;20:712-721
331. Masunaga A, Arai T, Yoshitake T, Itoyama S, Sugawara I. Reduced expression of apoptosis-related antigens in thymuses from patients with myasthenia gravis. *Immunol. Lett.* 1994;39(2):169-172
332. Mineo TC, Ambrogi V, Mineo D, Baldi A. Long-term disease-free survival of patients with radically resected thymomas, relevance of cell-cycle protein expression. *Cancer* 2005;104:2063-2071
333. Robles IA, Larcher F, Whalin BR, Murillas R, Richie E, Gimenez-Conti BI, Jorcano LJ, Conti JC. Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;93:7634-7638
334. Pich A, Chiarle R, Chiusa L, Ponti R, Geuna M, Palestro G. p53 expression and proliferative activity predict survival in non-invasive thymomas. *Int. J. Cancer* 1996;69(3):180-183
335. Raica M, Encica S, Motoc A, Cimpean AM, Scridon T, Barsan M. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann. Anat.* 2006;188:345-352
336. Weerkamp F, De Haas EFE, Naber BAE, Comans-Bitter WM, Bogers AJ, Van Dongen JJM, Staal FJT. Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005;115(4):834-840
337. David CW, Norrman J, Hammon HM, Davis WC, Blum JW. Cell proliferation, apoptosis and B- and T-lymphocytes in Peyer's patches of the ileum, in thymus and in lymph nodes of preterm calves, and in full-term calves at birth and on day 5 of life. *J. Dairy Sci.* 2003;86:3321-3329
338. Petrie HT. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunological Reviews* 2002;189: 8-19
339. Biswas S, Shi Q, Matise L, Cleveland S, Dave U, Zinkel S. A role of pro-apoptotic Bax and Bak in T-cell differentiation and transformation. *Blood*, 2010;116(24):5237-46
340. Bouillet P, Cory S, Zhang LC, Strasser A, Adams JM. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev. Cell.* 2001;1:645-653
341. Dzhagalov I, Dunkle A, He YW. The anti-apoptotic bcl-2 family member mcl-1 promotes T lymphocyte survival at multiple stages. *J. Immunol.* 2008;181(1):521-528
342. Ohta K, Iwai K, Kasahara Y, Taniguchi N, Krajewski S, Reed JC, Miyawaki T. Immunoblot analysis of cellular expression of bcl-2, bax, bcl-x and mcl-1, in human peripheral blood and lymphoid tissues. *Int. Immunol.* 1995;7(11):1817-1825
343. Grillot DA, Merino R, Nunez G. Bcl-xL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J. Exp. Med.* 1995;182:1973-1983



344. Yang CY, Lin NH, Lee JM, Huang CY, Min HJ, Jong-Young Yen J, Liao NS, Yang-Yen HF. Promoter knock-in mutations reveal a role of *mcl-1* in thymocyte-positive selection and the tissue or cell lineage-specific regulation of *mcl-1* expression. *J. Immunol.* 2009;182(5):2959-2968
345. Dunkle A, Dzhagalov I, He YW. *Mcl-1* promotes survival of thymocytes by inhibition of *bak* in a pathway separate from *bcl-2*. *Cell Death Differ.* 2010;17:994-1002
346. Yokoyama T, Tanahashi M, Kobayashi Y, Yamakawa Y, Maeda M, Inaba T, Kiriya M, Fukai I, Fujii Y. The expression of *bcl-2* family proteins (*bcl-2*, *bcl-x*, *bax*, *bak* and *bim*) in human lymphocytes. *Immunol. Lett.* 2002;81:107-113
347. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB. Deficiency in *Bak* and *Bax* perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat. Immunol.* 2002;3(10):932-939
348. Kovalovsky D, Pezzano M, Ortiz BD, Sant-Angelo DB. A novel TCR transgenic model reveals that negative selection involves an immediate, *bim*-dependent pathway and a delayed, *bim*-independent pathway. *PLOS ONE* 2010;5(1):e8675(1-14)
349. Williams O, Norton T, Halligery M, Kioussis D, Brady HJM. The action of *bax* and *bcl-2* on T cell selection. *J. Exp. Med.* 1998;188:1125-1133
350. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. Proapoptotic *Bcl-2* relative *Bim* required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286:1735-1738
351. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic *mcl-1*. *Nature* 2003;426(11):671-676
352. Lindsten T, Ross A, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Celeste Simon M, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB. The combined functions of proapoptotic *Bcl-2* family members *Bak* and *Bax* are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* 2000;6:1389-1399
353. Onodera J, Nakamura S, Nagano I. Upregulation of *Bcl-2* protein in the myasthenic thymus. *Ann. Neurol.* 1996;39:521-528
354. Tateyama H, Eimoto T, Tada T. Apoptosis, *bcl-2* protein, and Fas antigen in thymic epithelial tumors. *Mod. Pathol.* 1997;10:983-991
355. French LE, Wilson A, Hahne M, Viard I, Tschopp J, MacDonald HR. Fas ligand expression is restricted to nonlymphoid thymic components in situ. *J. Immunol.* 1997;159:2196-2202
356. Chen X, Xia S, Li R, Liu H, Huang Y, Qian X, Xiao X, Xu X, Lin X, Tian Y, Zong Y, He D, Chen W, Zhang Y, Shao Q. Doxycycline enhances the Ras-MAPK signaling and proliferation of mouse thymic epithelial cells. *J Cell Biochem* 2009;107:494-503
357. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cell cycle-related variation and tissue-restricted expression of human cyclin D1 protein. *J Pathol.* 1994;172:237-245
358. Ayhan S, Isisag A, Saruc M, Nese N, Demir MA, Kucukmetin NT. The role of pRb, p16 and cyclin D1 in colonic carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2010;57(98):251-256
359. Krajewski S, Bodrug S, Gascoyne R, Berean K, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of *Mcl-1* and *Bcl-2* proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am. J. Pathol.* 1994;145:515-525
360. Quaglini D, Pasquali Ronchetti I. Cell death in the rat thymus: A minireview. *Apoptosis* 2001;6:389-401
361. Ryan JA, Brunelle JK, Letai A. Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4+ CD8+ thymocytes. *PNAS* 2010;107(29):12895-12900
362. Jorgensen TN, McKee A, Wang M, Kushnir E, White J, Refaeli Y, Kappler JW, Murrack P. *Bim* and *Bcl-2* mutually affect the expression of the other in T cells. *J. Immunol.* 2007;179:3417-3424
363. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate *Bax*-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* 2005;17:525-535

364. Merino D, Giam M, Hughes PD, Siggs OM, Heger K, O'Reilly LA, Adams JM, Strasser A, Lee E, Fairlie WD, Bouillet P. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol.* 2009;186:355-362
365. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:384-395
366. Hutcheson J, Perlman H. Loss of Bim results in abnormal accumulation of mature CD4-CD8-CD44-CD25- thymocytes. *Immunobiol.* 2007;212(8):629-636
367. Kitada S, Krajewska M, Zhang X, Scudiero D, Zapata JM, Wang HG, Shabaik A, Tudor G, Krajewski S, Myers TG, Johnson GS, Sausville EA, Reed JC. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am. J. Pathol.* 1998;152:51-61
368. Mok CL, Gil-Gomez G, Williams O, Coles M, Taga S, Tolaini M, Norton T, Kioussis D, Brady HJM. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J. Exp. Med.* 1999;189(3):575-586
369. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 2009;27:S93-S104
370. Mandal M, Crusio K, Meng F, Liu S, Kinsella M, Clark M, Takeuchi O, Aifantis I. Regulation of lymphocyte progenitor survival by the proapoptotic activities of Bim and Bid. *PNAS* 2008;105(52):20840-20845
371. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1994;54:2468-2471
372. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75:229-240
373. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336
374. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gutter KC, Mason RY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosome translocation. *Am. J. Pathol.* 1990;137:225-232
375. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanawaga O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;97:879-888
376. Cao Y, Li H, Liu H, Zheng C, Ji H, Liu X. The serine/threonine kinase LKB1 controls thymocyte survival through regulation of AMPK activation and Bcl-XL expression. *Cell Research* 2010;20:99-108
377. Ma A, Pena JC, Chang B, Mragosian E, Davidson L, Alt FW, Thompson CB. Bcl-x regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:4763-4767
378. Yuan J, Crittenden RB, Bender TP. C-Myb promotes the survival of CD4+CD8+double-positive thymocytes through upregulation of Bcl-xL. *J. Immunol.* 2010;184:2793-2804
379. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267:1506-1510
380. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol to membrane redistribution of Bax and Bcl X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:3668-3672
381. Yang T, Kozopas KM, Craig RW. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *Cell Biol.* 1995;128:1173-1184
382. Motz C, Martin H, Krimmer T, Rassow J. Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* 2002;323:729-738
383. Chou CH, Lee RS, Yang-Yen HF. An internal EELD domain facilitates mitochondrial targeting of mcl-1 via a Tom70-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* 2006;17:3952-3963
384. Zhang N, He YW, An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med.* 2005;202(3):395-404

385. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 1998;392:296-300
386. Chau H, Wong V, Chen NJ, Huang HL, Lin WJ, Mirtsos C, Elford AR, Bonnard M, Wakeham A, You-Ten AI, Lemmers B, Salmena L, Pellegrini M, Hakem R, Mak TW, Ohashi P, Yeh WC. Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. *J. Exp. Med.* 2005;202(3):405-413
387. Willems F, Amraoui Z, Vanderheyde N, Verhasselt V, Aksoy E, Scaffidi C, Peter ME, Krammer PH, Goldman M. Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolymaleimide. *Blood* 2000;95:3478-3482
388. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 2000;6:529-534
389. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* 2006;5(5):1087-1098
390. Castro JE, Listman JA, Jacobson BA, Wang Y, Lopez PA, Ju S, Finn PW, Pekins DL. Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 1996;5:615-627
391. Drappa J, Brot N, Elkon KB. The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:10340
392. Anjelic S, Drappa J, Lacy E, Elkon B, Nikolic-Zulc J. The onset of Fas expression parallels the acquisition of CD8 and CD4 in fetal and adult  $\alpha/\beta$  thymocytes. *Int. Immunol.* 1994;6:73
393. Ogasawara J, Suda T, Nagata S. Selective apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes by anti-Fas antibody. *J. Exp. Med.* 1995;181:485
394. Nishimura Y, Ishii A, Kobayashi Y, Yamasaki Y, Yonehara S. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J. Immunol.* 1995;154:4395
395. Declan L, Pingsheng L, Jun H. Fas ligand is enriched in the caveolae membrane domains of thymic epithelial cells. *Cell. Immunol.* 2004;230:10-16
396. Suda T, Takahashi T, Goldstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178
397. Alam A, Braun MY, Hartgers F, Lasage S, Cohen L, Hugo P, Denis F, Sekaly RP. Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in thymus. *J. Exp. Med.* 1997;186:1503-1512
398. Bar-Dayyan Y, Afek A, Bar-Dayyan Y, Goldberg I, Kopolovic J. Proliferation, apoptosis and thymic involution. *Tissue and Cell* 1993;31(4):391-396
399. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol.* 1999;200:1-18
400. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *Histochem. Cytochem.* 1998;46:327-334
401. Stahelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J. False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethylpyrocarbonate. *Mol. Pathol.* 1998;51:204-208
402. Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Sol-Mateo M, Sanchez-Verde L, Villuendas R, Troncone G, Piris MA. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 in lymphoid tissue. P27/Kip1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am. J. Pathol.* 1997;151:151-160
403. Loyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW. P27/Kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am. J. Pathol.* 1999;154:313-323
404. Fantl V, Edwards PA, Steel JH, Vonderhaar BK, Dickson C. Impaired mammary gland development in Cyl-1(-/-) mice during pregnancy and lactation is epithelial cell autonomous. *Dev. Biol.* 1999;212:1-11

405. Siciniski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards J, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996;384:470-474
406. Kong G, Chua SS, Yijun Y, Kittrell F, Moraes RC, Medina D, Said TK. Functional analysis of cyclin D2 and p27Kip1 in cyclin D2 transgenic mouse mammary gland during development. *Oncogene* 2002;21:7214-7225
407. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-555
408. Teramoto N, Pokrovskaja K, Szekely L, Polack A, Yoshino T, Akagi T, Klein G. Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions. *Int. J. Cancer* 1999;81:543-550
409. Bryja V, Pachernik J, Faldikova L, Krejci P, Pogue R, Nevriiva I, Dvorak P, Hampl A. The role of p27<sup>Kip1</sup> in maintaining the levels of D-type cyclins in vivo. *Biochem. Biophys. Acta* 2004;1961:105-116
410. Gong J, Bhatia U, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Expression of cyclins A, D2 and D3 in individual normal mitogen stimulated lymphocytes and in MOLT-4 leukemic cells analyzed by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 1995;9:893-899
411. Wagner E, Hleb M, Hanna N, Sharma S. A pivotal role of cyclin D3 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in the regulation of IL-2-, IL-4- or IL-10-mediated human B cell proliferation. *J. Immunol.* 1998;161:1123-1131
412. Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardel B, Traganos F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 1996;25:1-13
413. Kapllan D, Meyerson H, Husel W, Lewadowska K, MacLennan G. D cyclins in lymphocytes. *Cytometry* 2005;63A:1-9
414. Kiess M, Gill RM, Hamel PA. Expression of the positive regulator of cell cycle progression. Cyclin D3 is induced during differentiation of myoblast into quiescent myotubes. *Oncogene* 1995;10:159-166
415. Kiyokawa H, Richon VM, Fifkind RA. Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells. *Mol. Cell Biol.* 1994;14:7195-7203
416. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991;65:701-713
417. Ajchenbaum F, Ando K, DeCaprio JA, Griffin JD. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1993;268(6):4113-4119
418. Palmero I, Holder A, Sinclair AJ, Dickson C, Peters G. Cyclins D1 and D2 are differentially expressed in human B-lymphoid cell lines. *Oncogene* 1993;8(4):1049-1054
419. Tam S, Theodoras A, Shay J, Draetta G, Pagano M. Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene* 1994;9:2663-2674
420. Juan G, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Unscheduled expression of cyclins D1 and D3 in human tumor cell lines. *Cell Prolif.* 1996;29:259-266
421. Ragione F, Borriello A, Mastropietro S, Pietra V, Monno F, Gabutti V, Locatelli F, Bonsi L, Bagnara G, Iolascon A. Expression of G1-phase cell cycle genes during hematopoietic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;231:73-76
422. Tsukamoto H, Clise-Dwyer K, Huston GE, Duso DK, Buck AL, Johnson LL, Haynes L, Swain SL. Age-associated increase in lifespan of naïve CD4 T cells contributes to T-cells homeostasis but facilitates development of functional effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(43):18333-18338
423. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, Yamaguchi M, Tamaru J, Uike N, Hashimoto Y, Morishima Y, Suchi T, Seto M, Nakamura S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like-B-cell lymphoma. *Blood* 2000;95:2253-2261

424. Chung R, Peters AC, Armanious H, Anand M, Gelebart P, Lai R. Biological and clinical significance of GSK-3 $\beta$  in mantle cell lymphoma—an immunohistochemical study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2010;3(3):244-253
425. De Boer CJ, Kluin-Nelemans JC, Dreef E, Kester MG, Kluin PM, Schuurin E, van Krieken JH. Involvement of the CCND1 gene in hairy cell leukemia. *Ann. Oncol.* 1996;7:251-256
426. Athanasiou E, Kaloutsi V, Kotoula V, Hytioglou P, Kostopoulos I, Zervas C, Kalogiannidis P, Fassas A, Christakis JI, Papadimitriou CS. Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma a morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001;116:535-542
427. Sterlacci W, Fiegl M, Hilbe W, Jamnig H, Oberaigner W, Schmid T, Augustin F, Auberger J, Obermann EC, Tzankov A. Deregulation of p27 and Cyclin D1/D3 Control Over Mitosis Is Associated with Unfavorable Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer, as Determined in 405 Operated Patients. *J. Thorac. Oncol.* 2010;5: 1325–1336
428. Zhu J, Yu L, Zhan P, Song Y, Wang Q. The Relationships between cyclin D1 expression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Chin. J. Lung Cancer* 2010;13:8
429. Kanthan R, Fried I, Rueckl T, Senger JL, Kanthan SC. Expression of cell cycle proteins in male breast carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 2010;8:10
430. Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:649-679
431. Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AG, Ladyman HM, Ritter MA, Hugo P. The thymic microenvironment. *Immunol. Today* 1993;14:445-459
432. Rezzani R, Bonomini F, Rodella LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog. Histochem. Cytochem.* 2008;43:73-120
433. Lalor D, Liu P, Hayashi J. Fas ligand is enriched in the caveolae membrane domains of thymic epithelial cells. *Cell Immunol* 2004;230:10-16
434. Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Monting JS, Boehm T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 2006;441:992-996
435. Alves NL, Huntington ND, Rodewald HR, Di Santo JP. Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell “cradle”. *Cell* 2009;30(10):468-474
436. Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, Jenkinson EJ. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 2006;441:988-991
437. French LE, Hahne M, Viard I, Radlgruber G, Zanone R, Becker K, Muller C, Tschopp J. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J. Cell Biol.* 1996;133(2):335-343
438. Zhou T, Fleck M, Mueller-Ladner U, Yang P, Wang Z, Gay S, Matsumoto S, Mountz JD. Kinetics of Fas-induced apoptosis in thymic organ culture. *J. Clin. Immunol.* 1997;17(1):74-84
439. Tourigny MR, Mazel S, Burtrum DB, Petrie HT. T cell receptor (TCR)- $\beta$  gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J. Exp. Med.* 1997;185:1549-1556
440. Penit C, Lucas B, Vasseur F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J. Immunol.* 1995;154:5103-5113
441. Jiang D, Zheng L, Lenardo MJ. Caspases in T-cell receptor-induced thymocyte apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6:402-411
442. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EAG. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 2003;199:221-228
443. Wakeyama H, Akiyama T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Nakamura K, Tanaka S. Posttranslational regulation of Bim by caspase-3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1116:271-280

444. Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, Ferrando A, Levin S, Geng Y, von Boehmer H. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 2003;4:451-461
445. Weng AP, Aster JC. No T without D3: a critical role for D3 in normal and malignant precursor T cells. *Cancer Cell* 2003;4:417-418
446. Won KI, Xiong Y, Beach D, Gilman MZ. Growth related expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:9910-9914
447. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 1995;20:187-190
448. Rosenheimer-Goudsmith N, Haupt Y, Yefenof E, Zilberman Y, Guy R. P53 and thymic “death by neglect”: thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4+/CD8+ thymocytes is p53-independent. *Cell Death Differ.* 2000;7:241-249
449. Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J. Pathol.* 1997;183:134-140
450. He W, Zhang Y, Deng Y, Kabelitz D. Induction of TCR-gamma delta expression on triple-negative (CD3-4-8-) human thymocytes. Comparative analysis of the effects of IL-4 and IL-7. *J. Immunol.* 1995;154: 3726–3731
451. Blau JN. A phagocytic function of Hassall’s corpuscles. *Nature* 1965;208:564–567
452. Hoffmann MW, Heath WR, Ruschmeyer D, Miller JF. Deletion of high-avidity T cells by thymic epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:9851-9855
453. Von Boehmer H, The HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless, and destroys the harmful. *Immunol. Today* 1989;10:57-61
454. Van Ewijk W, Wang B, Hollander G, Kawamoto H, Spanopoulou E, Itoi M, amagai T, Jiang YF, Germeraad WT, Chen WF, Katsura Y. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin. Immunol.* 1999;11(1):57-64
455. Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ. Cross talk between cell death and progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93(18):9545-9552
456. Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J. Exp. Med.* 1996;183(5):2219-2226
457. O’Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.* 1996;15(24):6979-6990
458. Cheng N, Van de Watering, Knudson MC. P27 deficiency cooperates with Bcl-2 but not Bax to promote T-cell lymphoma. *PLOS ONE* 2008;3(4):1-8
459. Fannjiang Y, Kim CH, Haganir RL, Zou S, Lindsten T, Thompson CB, Mito T, Trayastman RJ, Larsen T, Griffin DE, Mandir AS, Dawson TM, Dike S, Sappington AL, Kerr DA, Jonas EA, Kaczmarek LK, Hardwick JM. BAK alters neuronal excitability and can switch from anti- to pro-death function during postnatal development. *Dev. Cell.* 2003;4:575-585
460. Tochtani T, Kanemitsu H, Yamauchi H, Uchida K, Nakayama H. 5-azacytidine, a chemotherapeutic drug, induces TRAIL-mediated apoptosis in mouse thymocytes in vivo. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2010;63(3):237-42
461. Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev. Cell* 2002;3(5):631-643
462. Lehtovita A, Rossi LH, Kekalainen E, Sairanen H, Arstila TP. The CD4(+)CD8(+) and CD4(+) subsets of FOXP3(+) thymocytes differ in their response to growth factor deprivation or stimulation. *Scand. J. Immunol.* 2009;70(4):377-383
463. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 2002;415(6874):922-926
464. Hutcheson J, Scatizzi JC, Bickel E, Brown NJ, Bouillet P, Strasses A, Perlman H. Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J. Exp. Med.* 2005;201(12):1949-1960



465. Linette GP, Grusby MJ, Hedrick SM, Hansen TH, Glimcher LH and Korsmeyer SJ. Bcl-2 is upregulated at the CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1994;1:197–205
466. Veis DJ, Sentman CL, Bach EA, Korsmeyer SJ. Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 1993;151:2546–2554
467. Gratiot-Deans J, Merino R, Nunez G, Turka LA. Bcl-2 expression during T-cell development: early loss and late return occur at specific stages of commitment to differentiation and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:10685–10689
468. Strasser A, Harris AW, von Boehmer H, Cory S. Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:1376–1380
469. Tao W, Teh SJ, Melhado I, Jirik F, Korsmeyer SJ, Teh HS. The T cell receptor repertoire of CD4-8<sup>+</sup> thymocytes is altered by overexpression of the BCL-2 protooncogene in the thymus. *J. Exp. Med.* 1994;179:145–153
470. Fang L, Zhang X, Miao J, Zhao F, Yang K, Zhuang R, Bujard H, Wei Y, Yang A, Chen L, Jin B. Expression of CD226 antagonizes apoptotic cell death in murine thymocytes. *J. Immunol.* 2009;182(9):5453-5460
471. Hersberger PA, He H, McCarthy SA. In vivo thymocyte maturation is associated with reduced cellular susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol.* 1998;185(2):134-145
472. Sheard MA, Liu C, Takahama Y. Development status of CD4-CD8<sup>+</sup> and CD4+CD8- thymocytes with medium expression of CD3. *Eur. J. Immunol.* 2004;34(1):25-35
473. Kurasawa K, Hashimoto Y, Kasai M, Iwamoto I. The fas antigen is involved in thymic T-cell development as a costimulatory molecule, but not in the detection of neglected thymocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;106:S19-S31
474. Kurasawa K, Hashimoto Y, Iwamoto I. Fas modulates both positive and negative selection of thymocytes. *Cell Immunol.* 1999;194(2):127-135
475. Xue L, Chiang L, He B, Zhao YY, Winoto A. FoxM1, a forkhead transcription factor is a master cell cycle regulator for mouse mature T cells but not double positive thymocytes. *PLOS ONE* 2010;5(2):e9229
476. Sasaki E, Yatabe Y, Hashimoto M, Yamashita Y, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, Mori N. Development-dependent expression of cyclin D3 in precursor T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Pathol. Int.* 2007;57(2):53-59
477. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998;396:690-695
478. Hale JS, Boursalian TE, Turk GL, Fink PJ. Thymic output in aged mice. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006;103:8447-8452
479. Haynes L, Swain SL. Why aging T-cells fail: implications for vaccination. *Immunity*, 2006;24:663-666
480. Hulstaert F, Hannet I, Dneys V, Munhyeshuli V, Reichert T, DeBruyere M, Strauss K. Age-repeated changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;70:152-158
481. Bertho JM, Demarquay C, Moulian N, Van der Meeren A, Berrih-Aknin S, Gourmelon P. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol.* 1997;179:30-40
482. Lemster BH, Michel JJ, Montag DT, Paat JJ, Studenski SA, Newman AB, Vallejo AN. Induction of CD56 and TCR-independent activation of T cells with aging. *J. Immunol.* 2008;180(3):1979-1990
483. Tsukamoto H, Hutson GE, Dibble J, Duso DK, Swain SL. Bim dictates naïve CD4 T cell lifespan and the development of age-associated functional defects. *J Immunol.* 2010;185(8):4535-4544
484. Kapasi AA, Singhal PC. Aging splenocyte and thymocyte apoptosis is associated with enhanced expression of p53, bax and caspase-3. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 1999;1(1):78-81

485. Phillips JA, Brondstetter TI, English CA, Lee HE, Virts EL, Thoman ML. IL-7 gene therapy in aging restores early thymopoiesis without reversing involution. *J. Immunol.* 2004;173:4867–4874
486. Li WQ, Jiang Q, Khaled AR, Keller JR, Durum SK. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J. Biol. Chem.* 2004;279:29160–29166
487. Karawajew L, Ruppert V, Wuchter C, Kosser A, Schrappe M, Dorken B, Ludwig WD. Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cyto-reduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:297–306
488. Madden SD, Donovan M, Cotter TG. Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development. *Int. J. Biol.* 2007;51(5):415-423
489. Takahama T. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:127-135
490. Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, Jenkinson EJ. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*, 2006;441:988-991
491. Manley NR. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Sem Immunol.* 2000;12:421-428
492. Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, Manley NR, Blackburn CC. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol.* 2004;5:546-553
493. Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. Age-related thymic involution is mediated by Fas on thymic epithelial cells. *Int. Immunol.* 2004;16(7):1027-1035
494. Murga C, Barber DF. Molecular mechanism of pre-T cell receptor-induced survival. *J. Biol. Chem.* 2002;277(42):39156-39162
495. Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol. Cell Biol.* 2004;24(15):6728-6741
496. Kim HJ, Alonzo ES, Dorothee G, Pollard JW, Sant'Angelo DB. Selective depletion of eosinophils or neutrophils in mice impacts the efficiency of apoptotic cell clearance in the thymus. *PLOS One.* 2010;5(7):e11439
497. Michalak Em, Vandenberg CJ, Delbridge AR, Wu L, Scott CL, Adams JM, Strasser A. Apoptosis-promoted tumorigenesis: gamma-irradiation-induced thymic lymphomagenesis requires Puma-driven leukocyte death. *Genes Dev.* 2010;24(15):1608-1613
498. Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ. Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res.* 2001;61(2):659-665
499. Hahn PJ, Lai ZW, Nevaldine B, Schiff N, Fiore NC, Silverstone AE. Bcl-2 independent chromatin cleavage is a very early event during induction of apoptosis in mouse thymocytes after treatment with either dexamethasone or ionizing radiation. *Radiat Res.* 2003;160(5):559-567
500. Reinke V, Lozano G. The p53 targets mdm2 and Fas are not required as mediators of apoptosis in vivo. *Oncogene* 1997;15(31):1527-1534
501. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 2005;106(31):4131-4138
502. Okamoto M, Koga S, Tatsuka M. Differential regulation of caspase-9 by ionizing radiation- and UV-induced apoptotic pathways in thymic cells. *Mutat. Res.* 2010;688(1):78-87
503. Kong Thoo Lin P, Dance AM, Bestwick C, Milne L. The biological activities of new polyamine derivatives as potential therapeutic agents. *Biochem. Soc. Trans.* 2003;31(2):407-410
504. Leach SD, Scatena CD, Keefer CJ, Goodman HA, Song SY, Pietenpol JA. Negative regulation of Wee1 expression and Cdc2 phosphorylation during p53-mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1998;58(15):3231-3236

505. Gal AA, Sheppard MN, Nolen JD, Cohen C. p53 cellular proliferation and apoptosis-related factors in thymic neuroendocrine tumors. *Mod. Pathol.* 2004;17(1):33-39
506. Dorfman DM, Shahsafaei A, Miyauchi A. Immunohistochemical staining for bcl-2 and mcl-1 in intrathyroidal epithelial thymoma (ITET)/carcinoma showing thymus-like differentiation (CASTLE) and cervical thymic carcinoma. *Mod. Pathol.* 1998;11(10):989-994
507. Pan CC, Chen PC, Wang LS, Lee JY, Chiang H. Expression of apoptosis-related markers and HER-2/neu in thymic epithelial tumours. *Histopathol.* 2003;43(2):165-172
508. Kaira K, Endo M, Abe M, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Takahashi T, Murakami H, Tsuya A, Nakamura Y, Naito T, Hayashi I, Serizawa M, Koh Y, Hanaoka H, Tominaga H, Oriuchi N, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Biologic correlation of 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake on positron emission tomography in thymic epithelial tumors. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(23):3746-3753
509. Tomita M, Matsuzakii Y, Edagawa M, Maeda M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T. Clinical and immunohistochemical study of eight cases with thymic carcinoma. *BMC Surg.* 2002;2:3
510. Kawanami S, Mori S, Kikuchi M, Shirakusa T. Fas and nicotinic acetylcholine receptor in human myasthenic thymus-immunohistochemical study. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1999;90(6):286-294

