

Cellulaire interacties in de immuunrespons

.....
Docent Dr. P.J.M. Leenen en dr. S.C.A. van Blokland

1 Toelichting

1.1 Achtergrondinformatie

Dit VO wordt gegeven in de computerzaal, gebruik makend van virtuele microscopie.

Zoals je in de afgelopen weken hebt gezien in diverse colleges, vaardigheidsonderwijs en zelfstudieopdrachten, is het tot stand komen van een immuunrespons een uitermate nauwkeurig gereguleerd proces, waarbij verschillende factoren een rol spelen. Cruciaal in dit proces is de activering van T-helpercellen door antigeenpresenterende cellen (APC), die eerder antigeen hebben opgenomen en verwerkt, én zelf geactiveerd zijn tot effectieve APC. Geactiveerde T-helpercellen gaan prolifereren en stimuleren op hun beurt de activatie van B-cellen. Dit proces vindt plaats in de lymfeklier, die door zijn unieke microanatomische structuur alle elementen, die nodig zijn voor de immuunrespons, optimaal bij elkaar brengt.

In de zelfstudieopdracht 'Introductie immuunsysteem' in week Ba.2.B.1 en eerder in thema Ba.2.A heb je kennis gemaakt met de globale structuur van de lymfeklier en de daarin aanwezige celtypen. In dit vaardigheidsonderwijs ga je in meer detail in op de lokalisatie van de verschillende celtypen en de verschillende microanatomische structuren en vooral de dynamische veranderingen hierin tijdens een immuunrespons. Je neemt de verschillende fasen van de immuunrespons door aan de hand van microscopische preparaten van de lymfeklier. Hierbij maak je gebruik van preparaten die gekleurd zijn volgens een 'klassieke' histologische kleuring, of een specifieke immunohistologische kleuring. Het eerste type preparaten laat bij uitstek de complexiteit van de lymfeklier zien. Met de immunohistologische techniek worden individuele celtypen in de lymfeklier zichtbaar gemaakt, zodat de organisatie van dit orgaan duidelijker wordt.

Door de structuur van rustende lymfeklieren te vergelijken met lymfeklieren op verschillende tijdstippen na infectie (in dit geval met een facultatief intracellulaire bacterie, *Listeria monocytogenes*), kun je de histologische veranderingen observeren die gepaard gaan met het optreden van een immuunrespons tegen deze bacterie.

1.2 Leerdoelen

Dit vaardigheidsonderwijs sluit aan bij de weekleerdoelen.

1.3 Literatuur

Rijkers G.T., Kroese F.G.M., Kallenberg C.G.M., Derksen R.H.W.M. (2016). Leerboek Immunologie (2e druk). Houten: Bohn Stafleu van Loghum. ► 129-135 (6.1 t/m 6.4), 141 (6.8)

1.4 Overige informatie

Studiebelasting

Het volgen van dit vaardigheidsonderwijs neemt twee uur in beslag (exclusief voorbereidingstijd).

Voorbereiding

Dit vaardigheidsonderwijs heeft een integrerend karakter: veel aspecten van de immuunreactie die in eerdere colleges en zelfstudieopdrachten aan de orde zijn geweest komen nu aan de orde tegen de achtergrond van de histologische opbouw van de lymfeklier. Neem daarom tenminste de bovenvermelde leerstof door.

In de onderstaande checklist staan de begrippen, waarvan we verwachten dat je die beheerst. Mocht dat niet zo zijn, zoek deze dan op in Benner *'Medische Immunologie'* en/of in Mescher *'Junqueira's Basic Histology'*. Daarnaast is het raadzaam om de zelfstudieopdracht uit week Ba.2.B.1 over *'Introductie immuunsysteem'* nog een keer door te nemen.

checklist practicum lymfeklier

- | | |
|--|--|
| ☐ lymfeklier structuur: cortex, paracortex, medulla | ☐ plasmacel |
| ☐ follikel, follikelcentrum | ☐ antigeen, -presentatie |
| ☐ sinus | ☐ humorale immuunrespons |
| ☐ hoog-endotheliale venule | ☐ antistof, IgM, IgG |
| ☐ Langerhans cel, dendritische cel | ☐ cellulaire immuunrespons |
| ☐ folliculaire dendritische cel | ☐ naieve lymfocyt |
| ☐ macrofaag | ☐ memory cel |
| ☐ T-lymfocyt | ☐ recirculatie |
| ☐ B-lymfocyt | ☐ lymfe, afferent, efferent |

2 Handleiding

Dit vaardigheidsonderwijs bestaat uit drie onderdelen:

- het bestuderen van microscopische preparaten van de lymfeklier (ongeveer 60 minuten; individueel of met 2 studenten) m.b.v. "virtuele microscopie"
- het werkcollege: verwerken van opdrachten (ongeveer 35 minuten met 3 of 4 studenten)
- samenvatting van de bevindingen en 'reconstructie' van de immuunrespons (± 15 minuten, plenair)

2.1 Microscopische preparaten van de lymfeklier

2.1.1 Lymfeklier overzicht

([prep. IM8, lymfeklier, rat, perfusie fixatie, HE](#))

- Oriënteer je in het preparaat aan de hand van figuur 6.4 in Rijkers et al., en identificeer de volgende gebieden en structuren:

buitenste schors / outer cortex	kapsel
	kapselsinus / randsinus
	trabekelsinus
	follikels
binnenste schors / paracortex	hoogendotheliale venulen
merg / medulla	mergstrengen
	mergsinussen

- 1 Hoe herken je de verschillende compartimenten – outer cortex, paracortex en medulla – in een histologisch gekleurd preparaat van de lymfeklier?

In de volgende preparaten is een specifieke immunohistologische kleuring uitgevoerd om de lokalisatie van verschillende celtypen in de lymfeklier zichtbaar te maken.

Een globaal overzicht van de preparaten 2 tot en met 5 heb je al gezien in de zelfstudieopdracht over de lymfeklier (week 2.B.1). Daarin waren deze beelden vooral bedoeld om de verschillende compartimenten van de lymfeklier van elkaar te onderscheiden. Nu ga je in meer detail in op de lokalisatie en functie van de aangekleurde celtypen.

2.1.2 B-lymfocyten in de lymfeklier

([prep. IM1h2, mesenteriale lymfeklier, rat, immunohistologie IgM](#))

Met een anti-IgM kleuring zijn B-lymfocyten in een mesenteriale lymfeklier specifiek (bruin) aangekleurd. In dit preparaat is geen tegenkleuring gebruikt.

- Bestudeer het voorkomen van IgM-positieve cellen in de verschillende gebieden van de lymfeklier. Let hierbij ook op de intensiteit en de lokalisatie van de cellulaire kleuring (membraan vs. cytoplasma).
- 2 In welk compartiment komen de sterkst IgM-positieve cellen voor? Welke cellen zijn dit?
 - 3 Zijn er concentraties B-lymfocyten in de paracortex? Zo ja, hoe verklaar je de aanwezigheid van deze cellen hier?

2.1.3 T-lymfocyten in de lymfeklier

([prep. IM1h1, MLK, rat, immunohistol. CD4 + CD8](#))

In een seriecoupe van de vorige lymfeklier zijn alle T-cellen aangetoond door in één coupe zowel CD4 als CD8-positieve cellen te kleuren.

- Bestudeer het voorkomen van T-cellen in de verschillende gebieden van de lymfeklier.

- 4 Hoe verklaar je de aanwezigheid van T-cellen in de mergstrengen en -sinussen?

2.1.4 Macrofagen in de lymfeklier

[\(prep. IMIh7, MLK, muis, immunohistol. MOMA-1 + ER-TR9\)](#)

Gebruikmakend van andere antistoffen gericht tegen moleculen die alleen voorkomen op het oppervlak van macrofagen, zijn deze cellen aangekleurd in de lymfeklier. Bij deze kleuring is voor een betere oriëntatie een rode tegenkleuring gebruikt.

- Bestudeer het voorkomen van macrofagen in de verschillende gebieden van de lymfeklier.
- 5 Hoe hangt de lokalisatie van macrofagen in de lymfeklier samen met hun specifieke functie?

2.1.5 Dendritische cellen in de lymfeklier

[\(prep. IMIh5, MLK, muis, immunohistologie CD11c\)](#)

- Bestudeer het voorkomen van dendritische cellen in de verschillende gebieden van de lymfeklier.
- 6 Hoe hangt de lokalisatie van de dendritische cellen in de verschillende gebieden van de lymfeklier samen met de verschillende fasen van de primaire immuunrespons?

Dendritische cellen in de paracortex van de lymfeklier worden ook wel "interdigerende cellen" genoemd (*L. inter* = tussen, *digitus* = vinger).

- 7 Relateer deze naam van de DC in de paracortex aan hun functie.

2.1.6 Reticulair bindweefsel in de lymfeklier

[\(prep. IMIh4, mesenteriale lymfeklier, rat, immunohistol. ED14\)](#)

De interne structuur van de lymfeklier wordt gevormd door reticulair bindweefsel. Behalve ondersteunend, is dit weefsel ook belangrijk bij het transport van lymfe (met antigenen) en van cellen in de lymfeklier. Reticulair bindweefsel vormt zgn. 'conduits' (leidingen), waardoor lymfe vanuit de randsinus direct kan doorstromen naar de paracortex.

In dit preparaat zijn met behulp van een immunohistologische kleuring zowel de fibroblasten als de extracellulaire reticulaire vezels aangekleurd.

- Bestudeer het voorkomen van reticulair bindweefsel in de verschillende gebieden van de lymfeklier.
- 8 Wat zijn de ronde structuren in de paracortex?
- 9 Welke cellen in de paracortex zijn de belangrijkste verwerkers van antigenen die via de conduits worden aangevoerd?

- 10 Hoe kan reticulair bindweefsel een rol spelen bij de migratie van cellen door de lymfeklier? Welke moleculen zijn daarbij belangrijk?

2.1.7 Folliculaire dendritische cellen in de lymfeklier

(prep. IMih6, MLK, muis, immunohistol. FDC-M2)

Een andere populatie stromale cellen wordt gevormd door de zogenaamde 'folliculaire dendritische cellen'. Anders dan hun naam doet vermoeden zijn ze géén nauwe verwanten van de dendritische cellen / interdigiterende cellen die je in het vorige preparaat hebt bestudeerd. Deze laatste zijn leukocyten, terwijl folliculaire dendritische cellen gerelateerd zijn aan fibroblasten.

- Bestudeer het voorkomen van folliculaire dendritische cellen in de verschillende gebieden van de lymfeklier.

- 11 Wat is de functie van folliculaire DC?

- 12 Welke rol speelt de relatief hoge dichtheid aan receptoren voor immunoglobulinen en complement op het oppervlak van folliculaire DC hierbij?

2.2 Humane lymfeklier

Stimulatie van lymfocyten in een lymfeklier treedt niet alleen op in reactie op een microbiële infectie, maar gebeurt ook als de lymfeklier een locatie draineert waar een immunogene tumor groeit. Een maligne melanoom is zo'n tumor die een sterke immuunactivatie teweeg kan brengen.

Casus

Bij een vrouw van 35 jaar is eerder een maligne melanoom verwijderd van de knieholte van haar rechter been. Om de kans te minimaliseren dat de tumor na enige tijd op dezelfde locatie terugkeert, besluit de arts tot re-excisie van het gebied om de tumor en van de drainerende inguinale en iliacale lymfeklieren. Deze lymfeklieren worden ingestuurd voor beoordeling door de patholoog. De vraagstelling is (1) of er metastasen gevonden worden in de lymfeklier en (2) of de lymfeklier geactiveerd is.

2.2.1 Humane iliacale lymfeklier van maligne melanoma patiënt

(prep. DDHK 24060, paraffine coupe, Giemsa)

Oriënteer je in het preparaat en onderscheid de verschillende gebieden: outer cortex, paracortex en medulla.

- Bestudeer bij hoge vergroting een *follikelcentrum*. Dit is herkenbaar als een lichter gekleurd gebied met daaromheen een krans van donkerder gekleurde lymfocyten, de *corona*.
- Identificeer in enkele follikelcentra *mitosen* en zogenaamde '*tingible body*' *macrofagen*. Deze zijn herkenbaar als grote cellen met zeer licht gekleurde kern en veel cytoplasma. Hierin zijn vaak nog restanten van apoptotische cellen waarneembaar.

- 13 Hoe onderscheid je een primaire van een secundaire follikel? Welke processen vinden er plaats in een secundaire follikel?
- 14 Waarom gaan relatief veel B-cellen dood tijdens een follikelcentrumreactie?
 - Bestudeer ook in detail het medullaire gebied van de lymfeklier met in de strengen en sinussen sterk gekleurde *plasmacellen*. Deze hebben relatief veel cytoplasma met hierin een lichter gebied vlak bij de kern ('negatief Golgibeeld' of 'halo') en een perifeer gelegen kern.
- 15 Hoe verklaar je de sterke kleuring van plasmacellen?
- 16 Wat is je conclusie wat betreft de vraagstelling aan de patholoog (metastasen, activatiestadium lymfeklier)?
- 17

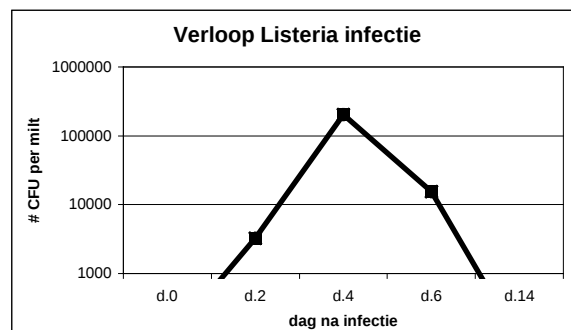
2.3 Werkcollege opdrachten: experimentele casus

Veel experimenteel onderzoek naar de weerstand tegen infecties vindt plaats in de muis als proefdier. Onder gecontroleerde omstandigheden kan worden onderzocht hoe de afweer- en immuunreactie tegen micro-organismen verloopt. Een model pathogeen in dit verband is de facultatief intracellulaire bacterie *Listeria monocytogenes*.

In een experiment zijn muizen geïnfecteerd door intraperitoneale injectie van een aantal bacteriën. Dit leidt tot sepsis en infectie van doelwitorganen als de lever en de milt. De kinetiek van de infectie is in grafiek 1 af te lezen aan het aantal colony-forming units (CFU) bacteriën dat gekweekt wordt uit de milt van geïnfecteerde proefdieren (n.b. let op de logaritmische schaal!).

Grafiek 1

Eigendom Erasmus MC,
afdeling Immunologie



Door de peritoneale infectie is ook een duidelijke reactie waarneembaar in de mesenteriale lymfeklieren.

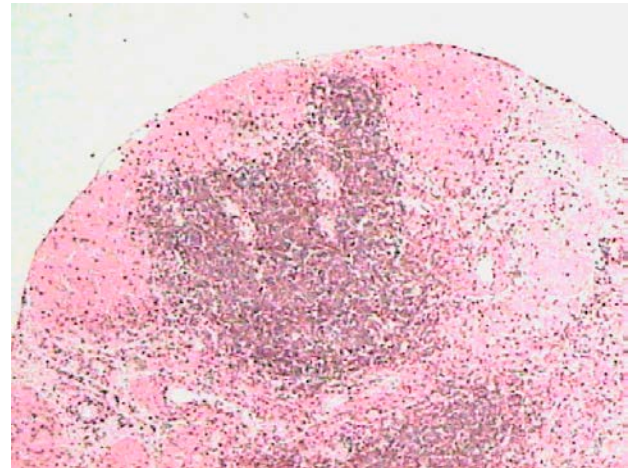
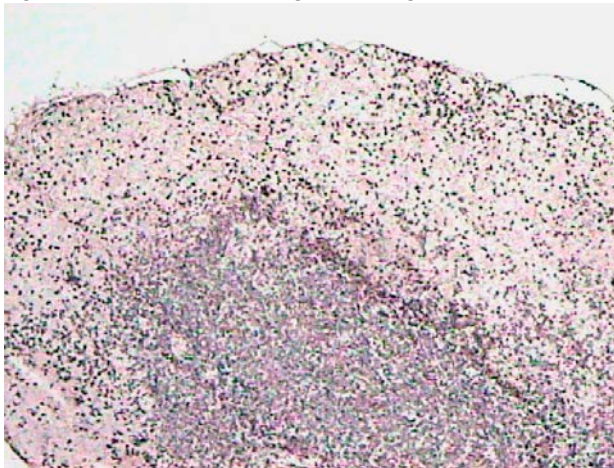
T-cellen in de primaire immuunrespons

Figuren 1 en 2 zijn opnamen van de mesenteriale lymfeklier tijdens *Listeria* infectie, geïsoleerd op dag 2 en dag 14 na begin van de infectie. Een specifieke immunohistologische kleuring is toegepast om T-cellen aan te tonen.

- 18 Welke van deze opnamen is van dag 2, welke van dag 14? Motiveer je antwoord

Figuur 1 (links)**Figuur 2** (rechts)

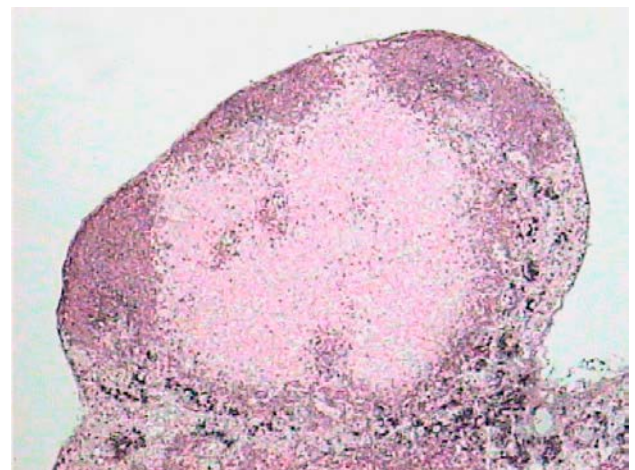
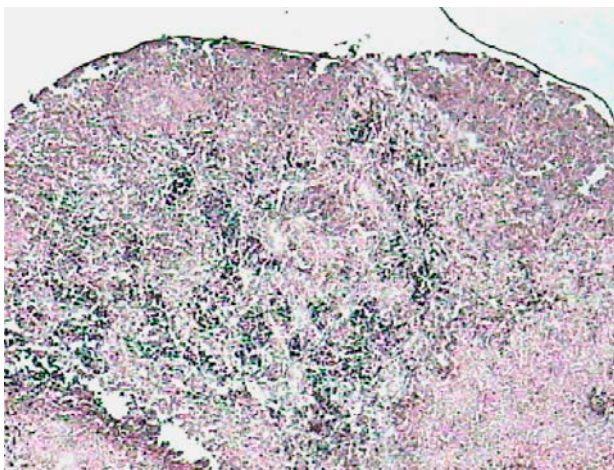
Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie

**B-cellen in de primaire immuunrespons**

De figuren 3 en 4 zijn opnamen van de mesenteriale lymfeklier tijdens *Listeria* infectie, geïsoleerd op dag 0 en dag 6 na begin van de infectie. Een specifieke immunohistologische kleuring is toegepast om immunoglobuline aan te tonen.

Figuur 3 (links),**Figuur 4** (rechts)

Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie



19 Welke opname is van d.0? Welke van d.6?

20 Welke specifieke verandering(en) neem je waar?

21 Welke immunologische effectormechanismen zijn het belangrijkste bij het elimineren van de bacteriën?

Bedenk hierbij dat *Listeria* zich vooral intracellulair vermenigvuldigt in epitheliale cellen en sommige macrofagen en DC.

2.4 Kinetiek van de immuunrespons: een puzzel

In figuur 5 (op de volgende pagina) zijn schematisch, in willekeurige volgorde, de verschillende fasen van de primaire immuunrespons weergegeven, op dag 1, dag 2, dag 3 - 4 en dag 4 - 6 na infectie. Op het vaardigheidsonderwijs worden beschrijvingen gegeven voor morfologisch waarneembare veranderingen, kenmerkend voor elk van deze stadia.

- Combineer de verschillende beschrijvingen met de schematische weergaven van de immuunrespons.
- Verklaar de morfologische veranderingen en verwoord wat er gebeurt tijdens de verschillende fasen van dit proces. Betrek in je beschrijving hoe antigeen de T- en B-cellen bereikt.

Figuur 5

Eigendom Erasmus MC,
afdeling Immunologie

