

Milt en mucosa-geassocieerd lymfoïd weefsel (MALT)

Docent Dr. P.J.M. Leenen

1 Toelichting

1.1 Achtergrondinformatie

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

Aangeraden wordt om voor aanvang van dit VO de zelfstudieopdracht 'Interactie van APC en micro-organismen' (week 2) nog eens te bekijken.

In voorgaande weken is, onder andere tijdens het VO 'Cellulaire interacties in de immuunrespons' (Ba.2.B.4), aandacht besteed aan de primaire immuunrespons die in de lymfeklier op gang komt, nadat een antigeen in het lichaam is binnengekomen en via de lymfe de lymfeklier heeft bereikt. Deze route wordt bijvoorbeeld gevolgd wanneer bacteriën via een wond in het lichaam terechtkomen, of wanneer een vaccin subcutaan wordt toegediend. Er zijn echter ook andere wegen waarlangs antigenen in het lichaam kunnen komen, of kunnen worden toegediend, zoals intraveneus en oraal. Als het immuunsysteem voor het eerst langs deze routes met antigenen in contact komt, wordt in principe geen immuniteit maar tolerantie opgewekt. Immunologische tolerantie komt in de komende weken nog uitgebreid aan de orde, onder andere in het kader van auto-immuniteit, waar dit mechanisme verstoord is. Voor dit VO is het toereikend om te weten dat tolerantie wordt gedefinieerd als de afwezigheid van een immunologische reactie tegen moleculen die - op basis van hun moleculaire structuur - wel antigeen zijn, zoals eiwitten op het oppervlak van lichaamseigen cellen. Tolerantie komt op verschillende manieren tot stand: (1) door deletie van lymfocyten tijdens hun ontwikkeling in de primaire lymfoïde organen of door deletie van rijpe cellen in de periferie, of (2) door functionele inactivatie van rijpe lymfocyten. Dit gebeurt als lymfocyten antigeen herkennen op antigeenpresenterende cellen die onvoldoende stimuleren, of als hun werking wordt geremd door suppressor / regulator T lymfocyten. Tijdens dit VO bestuderen we de locaties van het immuunsysteem die bij de meer tolerogene routes betrokken zijn, te weten de milt en het mucosa-geassocieerde lymfoïde weefsel (MALT). De milt filtert ongerechtigheden uit het bloed en maakt deze onschadelijk, een proces dat eerder in thema Ba.2.A (week Ba.2.A.7 - ZO.1 - Bouw van het hematopoietisch systeem) is aangestipt. Ook is het de plaats waar intraveneus toegediende antigenen in contact komen met het immuunsysteem. Na orale toediening is dit de MALT. De MALT is ook betrokken bij de reactie op antigenen die via inhalatie het lichaam binnendringen, maar daarop gaan we in dit VO niet verder in.

Een ziektebeeld waarbij de tolerogene mucosale immuniteit in de darm verstoord is, is de ziekte van Crohn. Met de pathologische en klinische aspecten van deze ziekte heb je eerder kennisgemaakt in thema Ba.1.C, in respectievelijk week 2 (Ba.1.C.2, VO.3: "Microscopische anatomie en pathologie van het maag- en darmstelsel") en week 4 (Ba.1.C.4, VO.2: "Een patiënte met buikpijn en gewichtsverlies"). In het huidige VO verdiep je je in de mogelijke onderliggende pathogenetische mechanismen van dit complexe ziektebeeld.

1.2 Leerdoelen

Dit vaardigheidsonderwijs sluit aan bij de weekleerdoelen.

1.3 Literatuur

- Benner, R., Kraal, G., van Dissel, J.T., van Lier, R.A.W. (2013). *Medische Immunologie*. (4th ed.). Amsterdam: Reed Business. ► 109 - 110 (6.4), 141 - 146 (7.3.2, 7.3.3)
- Mescher, A.L. (2013). Junqueira's *Basic Histology*. (13th ed.). New York: McGraw-Hill. ► 238 - 243 (mucosa-associated lymphoid tissue), 245 - 248 (spleen) 276 (mucosa associated lymphoid tissue), 281-287 (spleen)

1.4 Overige informatie

Studiebelasting

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

Voorbereiding

Neem de bovenstaande leerstof door als voorbereiding op het vaardigheidsonderwijs. Oriënteer je ook in deze handleiding. Daarnaast is het essentieel dat je voor aanvang van het VO de zelfstudieopdracht 'Interactie van APC en micro-organismen' hebt gemaakt. Mocht je na het maken van deze ZO nog vragen hebben, dan kun je deze tijdens het VO stellen.

Bekijk als achtergrond voor de klinische en pathologische aspecten van de ziekte van Crohn ook de betreffende stof uit thema Ba.1.C (Ba.1.C.2-VO.3 en Ba.1.C.4-VO.2).

Afkortingen

BALT	bronchus-associated lymphoid tissue
GALT	gut-associated lymphoid tissue
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MDP	muramyl dipeptide
NALT	nasal-associated lymphoid tissue
PGN	peptidoglycaan
TLR	Toll-Like receptor
	TLR2 ligand: peptidoglycaan van Gram-positieve (en – negatieve) bacteriën

2 Handleiding

Dit vaardigheidsonderwijs bestaat uit de volgende onderdelen:

- Het bestuderen van microscopische preparaten van milt en plaques van Peyer, als voorbeeld van MALT (ongeveer 75 minuten; individueel of per 2 studenten).
- Het verwerken van opdrachten over de pathogenese van de ziekte van Crohn (ongeveer 25 minuten).
- Discussie van bevindingen in een centrale nabespreking (ongeveer 20 minuten).

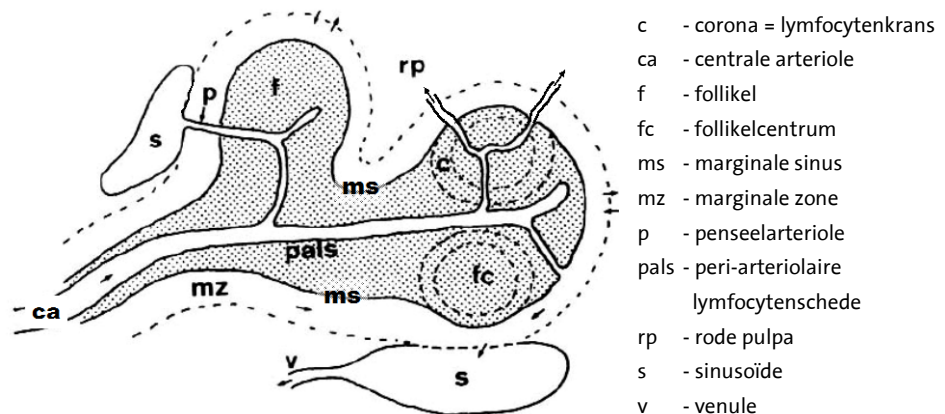
2.1 Microscopische preparaten van de milt

De milt is te beschouwen als een filter in de bloedcirculatie en heeft als zodanig verschillende functies. Deze zijn gelokaliseerd in verschillende compartimenten van de milt, namelijk de rode pulpa, de witte pulpa en de marginale zone.

Afbeelding 1

Schematische bouw van de milt

Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie.



- Oriënteer je in het bovenstaande schema van de miltstructuur. Onderscheid de verschillende compartimenten: rode pulpa, witte pulpa (PALS + follikels) en marginale zone.

1 Via welke routes stroomt het bloed door de milt?

2.1.1 Milt overzicht

(prep. HLA2.6, milt, aap, perfusiefixatie, HE)

Vóór inbedden en snijden is deze milt geperfuseerd, zodat de bloedvaten en sinussen nauwelijks cellen bevatten. Hierdoor is de structuur van het parenchym goed te beoordelen.

- Lokaliseer bij lage vergroting de cursief gedrukte structuren:
 De milt wordt omgeven door een *bindweefselkapsel* dat bekleed is met *mesotheel*. Op enkele plaatsen dringen *trabekels*, bindweefsel tussenschotten, het parenchym van de milt binnen. De trabekels begeleiden de *grote vaten* die doordringen in de *rode pulpa*, gekenmerkt door de afwisseling van *sinusoiden en strengen*.
 In de *witte pulpa* liggen lymfocyten dicht opeengepakt. Hierin kun je *follikels met follikelcentra* duidelijk onderscheiden. Net als in de lymfeklier worden follikelcentra omgeven door een krans van kleinere lymfocyten, de *corona*. De meer amorfe gebieden tussen de follikels zijn *peri-arteriolaire lymfocytenschedes* (PALS); deze omgeven de *centrale arteriolen*.

Tussen de corona en de rode pulpa vind je de *marginale zone* die als een band om de witte pulpa heenloopt.

- Bekijk bij hogere vergroting de structuur van de rode pulpa en onderscheid de *sinusoiden*, bekleed met *endotheel*, en de *strengen* met daarin veel macrofagen.
- 2 Waarin verschilt de morfologie van het sinusendotheel in de rode pulpa van die van 'normaal' endotheel in de wand van venulen? Waarop duidt dit?

2.1.2 Fagocytose van erythrocyten in de milt

(prep. 2HA4, milt, mens, Fe-kleuring volgens Perls, kernechtrood tegenkleuring)

Eén van de filterfuncties van de milt is het opruimen van verouderde erythrocyten en daarmee het recyclen van ijzer. Dit gebeurt door macrofagen in de rode pulpa-strengen. Erytrofagocytose is in deze coupe zichtbaar gemaakt door het aantonen van intracellulair ijzer dat is opgeslagen in de vorm van ferritine en hemosiderine. Deze componenten reageren met ferrocyanide, waarbij zogenoemd "Pruisisch blauw" gevormd wordt.

- Onderscheid witte en rode pulpa in de coupe en lokaliseer de erytrofagocyterende macrofagen. Omdat dit orgaan niet is geperfuseerd vóór de fixatie is het onderscheid tussen rode pulpa-strengen en -sinusoiden moeilijker te maken dan in de vorige coupe.

2.1.3 Rode pulpa macrofagen in de milt

(prep. IMIh10, milt, muis, immunohistologisch BM8, kernechtrood tegenkleuring)

Door gebruik te maken van antistoffen die binden aan een specifieke marker op het oppervlak van cellen - in dit geval rode pulpa-macrofagen - kunnen deze cellen selectief zichtbaar gemaakt worden.

- Oriënteer je in de coupe en bestudeer bij hoge vergroting de morfologie en lokalisatie van de macrofagen in de rode pulpa.
- 3 Soms zie je in de witte pulpa ook cellen met een veel lagere expressie van de hier gedetecteerde marker. Hoe interpreteer je dit?

2.1.4 Marginale zone macrofagen in de milt

(prep. IMIh11, milt, muis, immunohistologisch 3 receptoren voor microbiële componenten: mSIGN-R1 + Siglec-1 + ScavR type A)

In de marginale zone bevinden zich verschillende populaties macrofagen die fenotypisch en functioneel verschillen van de macrofagen in de rode pulpa. Door een combinatie van antistoffen te gebruiken zijn de populaties macrofagen in de marginale zone en aan de witte pulpa-zijde van de marginale sinus aangekleurd. Deze spelen onder andere een belangrijke rol bij het 'detoxificeren' van het circulerende bloed door het elimineren van micro-organismen.

Met name de marginale zone macrofagen zijn gespecialiseerd in het endocyteren van micro-organismen met een uitgebreid polysaccharidenkapsel, zoals *Streptococcus pneumoniae*.

- Lokaliseer de macrofagen van de marginale zone en de grens van de witte pulpa. Op veel plaatsen is de marginale sinus te zien als een dun lijntje tussen de beide populaties.
- 4 Waarin zullen de populaties macrofagen in de marginale zone van de milt fenotypisch verschillen van die in de rode pulpa, gelet op hun specifieke functie?

2.1.5 T-cellen in de milt

(prep. IMlh12, milt, muis, immunohistologisch CD3)

Net als in de lymfeklier bevinden de T- en B-cellen van de milt zich in verschillende compartimenten in de witte pulpa.

Lokaliseer de T cellen in de witte pulpa. Merk op dat midden in het T-celgebied vaak een centrale arteriole ligt.

- 5 Hoe verklaar je de ruime aanwezigheid van T-cellen in de rode pulpa?

2.1.6 Dendritische cellen in de milt

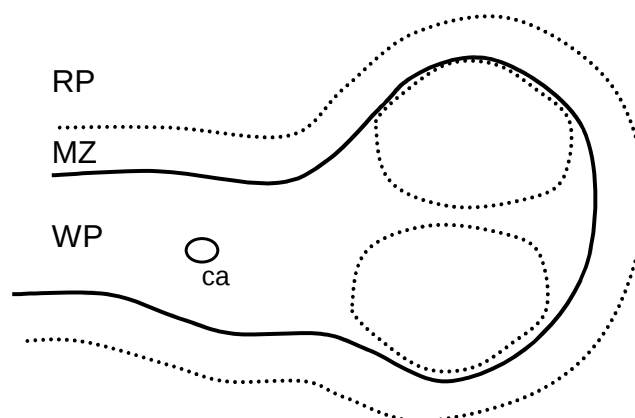
(prep. IMlh13, milt, muis, immunohistologisch CD13)

Dendritische cellen (DC) bevinden zich ook op verschillende locaties in de milt. Daarom is het wat lastiger om je te oriënteren in deze kleuring.

- Zoek een gebied waar je een centrale arteriole herkent. Dat identificeert dus een T-celgebied.
- Geef in afbeelding 2 aan op welke locaties zich DC bevinden.

Afbeelding 2

Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie.



- 6 Komt de lokalisatie van DC in de milt overeen met die in de lymfeklieren? Waarin wel, waarin niet?

2.1.7 B-cellen in de milt

(prep. IMh14, milt, muis, immunohistologisch CD45R)

- Lokaliseer de B-cellen in de milt. Merk op dat deze niet alleen in de follikels, maar ook in de marginale zone en in de rode pulpa te vinden zijn. De enkele positieve cellen in het T-celgebied (PALS) zijn overigens geen B-cellen, maar een subtype dendritische cellen.

B-cellen in de marginale zone blijken functioneel te verschillen van die in de follikels: ze hebben andere specificiteiten dan conventionele B-cellen, en een gewijzigd fenotype. De marginale zone B-cellen zijn essentieel in de reactie tegen T cel-onafhankelijke (TI-) antigenen, zoals de polysacchariden van gekapselde bacteriën. Ze blijken al binnen enkele uren na contact met antigeen te kunnen differentiëren tot plasmablasten. Op deze manier dragen ze bij aan een snelle reactie tegen gekapselde bacteriën.

- 7 Waarom is de marginale zone bij uitstek een locatie voor de migratie en homing van de hier gelegen B-celpopulatie met specificiteit voor TI-antigenen?

2.2 Microscopische preparaten van de platen van Peyer

Mucosa-geassocieerd lymfoïd weefsel (MALT), waartoe de platen van Peyer behoren, is onder te verdelen in NALT (neus- en mond-geassocieerd, inclusief de tonsillen), BALT (bronchus- / long-geassocieerd) en GALT (darmkanaal-geassocieerd).

De diverse vormen van MALT komen voor in verschillende maten van organisatie, variërend van diffuse infiltraten van lymfoïde cellen tot geordende lymfoïde structuren, inclusief follikels, vaak met een follikelcentrum. Voorbeelden van het laatst genoemde weefsel zijn te vinden in de tonsillen, follikels langs oesophagus en duodenum, het ileum met de platen van Peyer en follikels in colon en appendix.

De platen van Peyer zijn opeenhopingen van follikels, die op verschillende plaatsen in de dunne darm voorkomen. Deze follikels worden aan de luminale kant zijde van de darm begrensd door eenlagig epitheel. Tussen de absorptieve epitheelcellen (enterocyten) bevinden zich gespecialiseerde cellen (zogenoemde M-cellen), die actief antigeen uit het darmlumen opnemen en dit transporteren naar antigeenpresenterende cellen in het onderliggende lymfoïde weefsel.

De volgende preparaten geven een overzicht van de verschillende celtypen in de platen van Peyer.

2.2.1 B-cellen in de platen van Peyer

(prep.IMh20, darm, muis, immunohistologisch CD20)

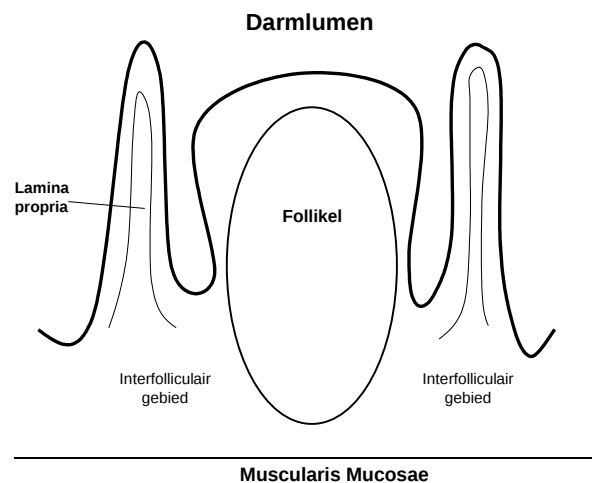
Afbeelding 3

Schematische bouw van een plaat van Peyer

Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie.

Dit preparaat van de dunne darm, waarin zich de plaat van Peyer bevindt, is gemaakt door de darm leeg te spoelen en vervolgens op te rollen, zodat er zoveel mogelijk darmdoorsnedes in één coupe te vinden zijn. Hierdoor is het lumen meestal niet zichtbaar omdat het is opgevuld met doorsneden van villi.

In deze coupe zijn B-cellen gekleurd met behulp van een CD 20 antistof.



Oriënteer je in de coupe en vergelijk de opbouw met het schema.

- Geef in de afbeelding aan waar de B-cellen zich bevinden.
- Identificeer de epitheelcellen die de grens vormen tussen de lymfoïde structuur en het lumen.

- Als je in coupes van humane platen van Peyer de B-cellen specifiek wilt aantonen, welke antistof (anders dan CD20) zou je dan ook kunnen gebruiken?
- Via welke structuur verwacht je dat B-cellen de plaat van Peyer binnenkomen?
- Welk isotype zal door het grootste deel van de plasmablasten en -cellen in de platen van Peyer geproduceerd worden?
- Waarin verschillen de M-cellen van de overige cellen in het eenlagig epitheel? Noem twee punten die betrekking hebben op de morfologie en de functie.

2.2.2 T-cellen in de platen van Peyer

(prep.IMh19, darm, muis, immunohistologisch CD3)

Net als in andere georganiseerde lymfoïde structuren zijn in de platen van Peyer de T- en B-cellen in verschillende gebieden gelokaliseerd.

- Zoek in deze seriecoupe hetzelfde gebied op als waar je eerder de B-cellen hebt bestudeerd. Bepaal de lokalisatie van de T-cellen, geef dit aan in afbeelding 3 en vergelijk dit met de B-cellen.
- Welke cellen verwacht je, op grond van je ervaring met lymfeklier- en miltstructuur, op dezelfde locaties aan te treffen als de T-cellen?

2.2.3 Macrofagen en dendritische cellen in de platen van Peyer (prep.IMlh21, darm, muis, immunohistologisch CD68)

CD68 antistoffen herkennen een lysosomaal eiwit en kleuren daarom macrofagen sterk aan. Ook dendritische cellen worden herkend door deze antistoffen.

- Ga in deze coupe op zoek naar de specifiek aangekleurde macrofagen en dendritische cellen in de plaat van Peyer en relateer hun locatie aan de eerder geïdentificeerde T- en B-celgebieden.

13 Welke functies hebben de macrofagen en DC in de verschillende gebieden van de plaat van Peyer?

14 Welke twee andere celtypen, naast DC, kunnen antigeen presenteren aan T-cellen?

2.3 Pathogenese van de ziekte van Crohn

2.3.1 Achtergrond

Het maag-darmkanaal is het grootste contactoppervlak van het lichaam met het milieu exterieur; het heeft ook een grote microbiële belasting. Daarom moet het immuunsysteem ter plekke adequaat reageren, dat wil zeggen het binnendringen van pathogenen voorkomen, maar geen excessieve reactie geven tegen commensalen. Het doorbreken van de tolerogene mucosale immuniteit in het GALT kan leiden tot chronische inflammatoire darmziekten (Inflammatory Bowel Disease, IBD), zoals de ziekte van Crohn. Met de pathologische en klinische aspecten van deze ziekte heb je eerder kennisgemaakt in thema 1.C.

De ziekte van Crohn heeft een stijgende incidentie van 6 per 100.000 personen (♀ : ♂ = 40:60; 25% tussen 10 - 19 jaar), zonder aanwijsbaar pathogeen micro-organisme als oorzaak. Het is een chronische ziekte met aspecifieke symptomen en een onvoorspelbaar verloop. Zoals je eerder hebt gezien kan deze inflammatoire aandoening zich manifesteren langs het gehele maag-darmkanaal, van de mond tot de anus. In actieve ziekte-episoden treden vaak ook inflammatoire complicaties buiten het maag-darmkanaal op, zoals oog- en gewrichtsontstekingen. Dit suggereert al dat de onderliggende pathogenetische mechanismen niet beperkt zijn tot de tractus digestivus, maar dat er een systemisch probleem is in de regulatie van ontstekingsreacties.

Het histologisch beeld laat een discontinue verdeling zien van inflammatoire lesies naast gezonde delen. Op ontstoken plaatsen kan het ontstekingsinfiltraat door de tunica muscularis heen breken (transmurale lesies). In het infiltraat vinden we lymfocyten, macrofagen, en neutrofiële- en eosinofiele granulocyten, vaak ook in de vorm van granulomen. Ook aften en fistels komen voor en in het eindstadium kan darmwandfibrose optreden.

Over de pathogenese van de ziekte van Crohn bestaan verschillende theorieën, die gebaseerd zijn op diverse bevindingen bij Crohn-patiënten. De betrokken factoren zijn onder andere een verminderd anti-inflammatoir mechanisme, maar ook een stoornis in de barrière- en anti-microbiële functie van het darmepitheel, auto-immuniteit, (virale) infecties en stoornissen in de darmflora worden genoemd als bijdragen tot het ontwikkelen van de ziekte.

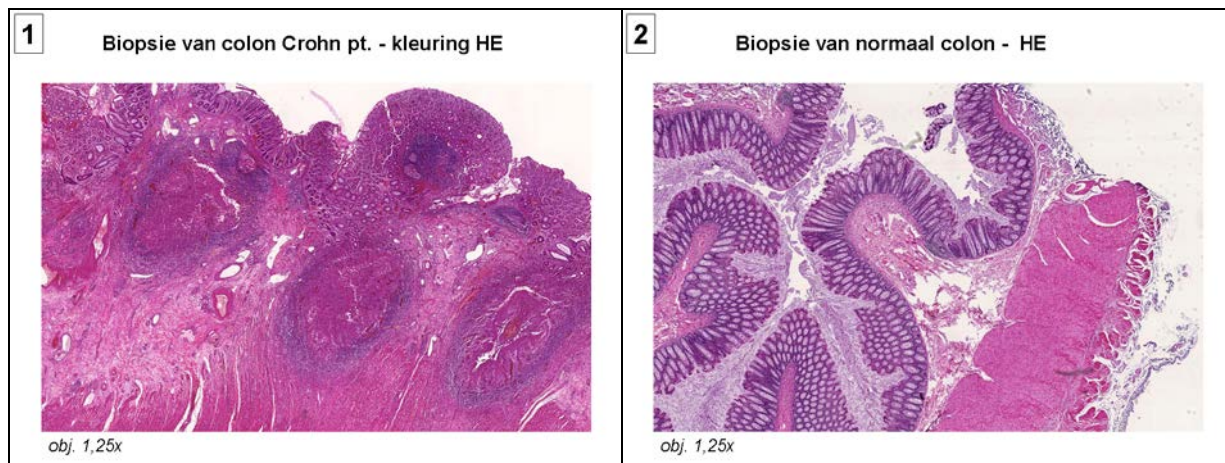
Recent onderzoek naar de associaties tussen genetische variaties en de ziekte van Crohn heeft aangetoond dat met name de 'innate' immuunrespons, autofagie ('cellulaire recycling' van celcomponenten), en mucus-samenstelling en epitheliale integriteit betrokken zijn bij de gevoeligheid om de ziekte te ontwikkelen. Een duidelijke genetische afwijking wordt aangetoond bij 10-15% van de patiënten die een mutatie heeft in het NOD2 gen. Dit codeert voor een eiwit dat behoort tot de zgn. 'pattern recognition receptors' (zie ZO *'Interactie van APC en micro-organismen'*). NOD2 is gelokaliseerd in het cytoplasma van monocyten, macrofagen en DC, maar ook in de epitheliale Panethcellen van de dunne darm. NOD2 herkent ondermeer MDP (muramyl dipeptide), een belangrijke immuunstimulerende component van bacterieel peptidoglycaan.

2.3.2 Opdracht

Probeer met 2 of 3 medestudenten aan de hand van de kaarten op de volgende bladzijde en de inleidende informatie een samenvatting te geven van de mogelijke immunopathogenese van de ziekte van Crohn bij de hieronder beschreven patiënt. Beschrijf kort in een stappenplan, hoe de pathogenese zou kunnen verlopen.

Casus

- jonge man, kaukasisch, 19 jaar
- klachten: koorts, buikpijn (rechts), diarree en gewichtsverlies
- andere problemen: terugkerende infecties, gewrichtsklachten
- faecesweek: geen bijzonderheden
- diagnose op basis van coloscopie en caecumbiopt: ziekte van Crohn
- behandeling: ontstekingsremmers (5-ASA)
- moleculaire analyse: insertie in NOD2 gen (3020insC), wat leidt tot een getrunceerd eiwit



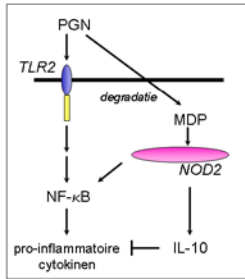
3 Etiologie van de ziekte van Crohn

- Multifactorieel, multigenetisch
- Genetische predispositie in verschillende processen:
 - 'innate immunity':
NOD2-gen: cytoplasmatische receptor voor MDP
10-15% van de Crohn patiënten heeft NOD2 mutatie → 40 x ↑ risico
 - autofagie:
ATG16L1-gen: vorming van autofagosomen, secretie van cytokinen en anti-microbiële factoren (Paneth cellen)
 - mucus-samenstelling en integriteit van epitheel
- Omgeving:
 - infecties: virus - mycobacterium
 - stress, dieet, toxines, nicotine
- Onbalans tussen pro-inflammatoire en ontstekings-remmende cellen

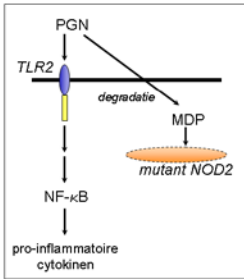
4 Model voor peptidoglycaansignalering Theorie 1

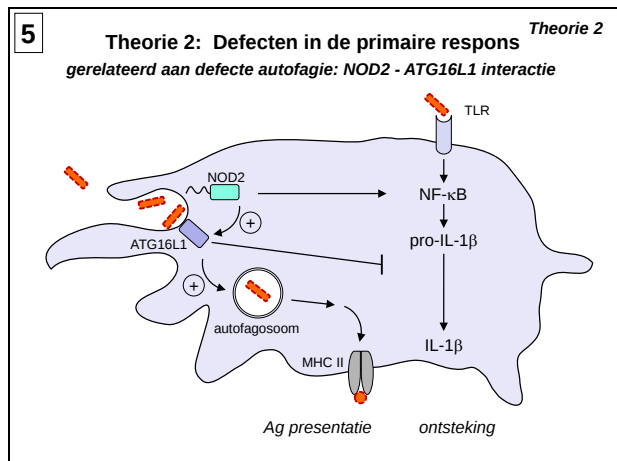
Theorie 1: overmatige immuunstimulering

normaal



patiënt





Hulpvragen

- 15** Welke cellen bevinden zich in het ontstekingsinfiltraat?
- 16** Wat is de consequentie van de mutatie voor de functie van het NOD2 eiwit in de activatie van immuuncellen door bacterieel peptidoglycaan?
- 17** Wat houdt het proces van 'autofagie' in?
- 18** Welke consequenties kunnen mutaties in het ATG16L1 gen hebben voor enerzijds de sterkte van de ontstekingsreactie en anderzijds de vorming van autofagosomen?

- 19 Wat betekent een verminderde vorming van autofagosomen voor de verwerking en presentatie van bacteriële antigenen aan T-lymfocyten?
- 20 Wat is de relatie tussen de presentatie van bacteriële antigenen en het opruimen van bacteriën?