

Prof.dr. J.H. Veelken

The new approach to lymphomas



Universiteit Leiden

The new approach to lymphomas

The new approach to lymphomas

Oratie uitgesproken door

Inaugural lecture delivered by

Prof.dr. J.H. Veelken

Prof.dr. J.H. Veelken

bij de aanvaarding van het ambt van
hoogleraar in de
Hematologie
aan de Universiteit Leiden
op maandag 29 augustus 2011

on the acceptance of his position of
professor of
Hematology
at the Universiteit Leiden
on Monday 29 augustus 2011



Universiteit Leiden

Mijnheer de Rector Magnificus, zeer gewaardeerde toehoorders,

Om te beginnen wil ik het met u hebben over een van de wonderen der schepping, de specifieke oftewel adaptieve immuniteit. Nog voordat het met externe bedreigingen geconfronteerd is, is het adaptieve immuunsysteem in staat om miljarden verschillende structuren specifiek te herkennen door voortdurend een corresponderend repertoire van overeenkomstige receptoren te produceren. Dit repertoire weerspiegelt de bijna onbeperkte substanties en organismen in ons universum. Het zijn immers al die verschillende substanties waarop wij een passende reactie moeten vinden, wanneer zij onze lichamelijke integriteit en gezondheid bedreigen.

Wanneer zo'n bedreiging optreedt, is ons immuunsysteem in staat om binnen een paar dagen uit dit enorme repertoire het best mogelijke antwoord op de indringer te selecteren. Deze snelle selectie is zo efficiënt dat op het hoogtepunt van de afweerreactie het grootste deel van de afweercellen in ons bloed exclusief gericht kan zijn tegen dit doelwit. Dergelijke situaties komen we niet zelden tegen na een transplantatie met bloedvormende stamcellen van een donor, wat vroeger een beenmergtransplantatie heette. Het afweersysteem van de patiënt die de transplantatie heeft ondergaan is dan nog niet geheel gerijpt en daardoor extra kwetsbaar voor bepaalde virussen. Als er dan wel een besmetting met een virus optreedt moet het getransplanteerde, in principe gezonde afweersysteem de strijd aangaan met deze bedreiging terwijl het nog bezig is om zich te ontwikkelen in de nieuwe gastheer. Wanneer het echter al wel in staat is om op deze uitdaging te reageren, gebeurt dit op een bijna explosieve manier. Erik Marijt en zijn team van het Centraal Klinisch Hematologisch Laboratorium, het CKHL, kunnen deze virus-specifieke afweercellen nauwkeurig meten. Zij hebben herhaaldelijk aangetoond dat deze cellen tot 70% van alle afweercellen in de bloedsomloop kunnen uitmaken. Het derde opmerkelijke kenmerk van het verworven immuunsysteem is zijn vermogen om te leren en te onthouden. Het immunologische geheugen houdt in dat een afweerreactie tegen een doelwit dat het organisme eerder bestreden heeft, sneller,

Mijnheer de Rector Magnificus, zeer gewaardeerde toehoorders,

The adaptive immune system is one of the true marvels of creation. In its naïve state, it is able to recognize specifically billions of different structures by continuously providing a corresponding, extensive repertoire of complementary receptors. This repertoire mirrors the almost limitless substances and organisms of the universe that we must be able to cope with if any of them represents a threat to our physical integrity and health.

If such a threat occurs, the immune system is able to select from this vast repertoire the best possible match for such an invader within a few days only. This rapid selection is so efficient that at the height of this defense reaction the vast majority of immune cells that circulate in the peripheral blood may be exclusively directed against this antigen. We encounter such situations not infrequently after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, when the transplanted patient is still not fully immune competent and therefore highly susceptible to certain viruses. The transplanted, principally healthy immune system has therefore to cope with this threat when it is still in the rebuilding or recovery phase. However, but when it is already capable of reacting to this challenge; it does so in an almost explosive manner. Erik Marijt and his team from our Central Clinical Hematology Laboratory are able to accurately measure these virus-specific cells, and they show again and again that they may represent up to 70% of all circulating immune cells.

The third most remarkable hallmark of the adaptive immune system is its ability to learn and to keep a memory. Immunological memory refers to the principle that an immune reaction to the very same antigen that the organism had to fend

specifieker en daardoor duidelijk efficiënter verloopt. Door dit leerproces bouwt het immuunsysteem een geheugen op dat in zijn details uniek is voor elk individu en de omgeving waarin het individu geleefd heeft - een spiegelbeeld van de bedreigingen die we in de loop van ons leven zijn tegengekomen en die we daarom later opnieuw kunnen tegengekomen.

Wat deze kenmerken van het immuunsysteem betekenen voor zijn tumoren, de maligne lymfomen

Het verworven immuunsysteem heeft dus drie kenmerken: een vrijwel onbeperkt repertoire in het herkennen van vreemde structuren, een zo efficiënt mogelijke reactie op elk van deze structuren en het vermogen om deze afweerreactie ook weer te staken en op te slaan in het geheugen. Uit deze kenmerken volgt eigenlijk al dat dit systeem gebouwd en geleid wordt door unieke biologische principes en mechanismen. Het immuunsysteem dient te beschikken over eigen manieren om de benodigde structuren voor deze functies aan te maken en om hun activiteit te regelen door middel van krachtige, zeer complexe regelmechanismen.

Uit deze observaties kan bovendien worden afgeleid dat een dergelijk complex en zeer dynamisch systeem de mogelijkheid in zich draagt dat er wat mis kan gaan in de regulatie van afweerreacties. Kwaadaardige transformatie, het ontstaan van kanker, behoort tot de mogelijkheden. In de laatste twee decennia hebben we veel vooruitgang geboekt in ons begrip van het ontstaan van de kleurrijke verscheidenheid aan tumoren als gevolg van identificeerbare en terugkerende afwijkingen in afweermechanismen. Ik heb het dan over de intrigerende diversiteit in de groep tumoren die bekend staat als maligne lymfomen.

Hoe komt het dan dat ik tot op de dag van vandaag ook in ons LUMC een onverschillige houding aantref die geen onderscheid lijkt te willen maken binnen dit belangrijke veld van de hematologie? Nog altijd hanteert men immers een ontkenkende omschrijving, de term non-Hodgkin lymfoom. Die term zegt alleen dat de ziekte in kwestie niet die ene bepaalde ziekte is, dus niet een aandoening die niet meer dan 8% van deze groep ziekten uitmaakt.

of before happens more rapid, more specific, and hence much more efficient. Through this learning process, the immune system builds a memory that in its details is unique to every individual and to the environment this individual has been living in - a mirror image of the threats that we have encountered at least once and that we therefore may encounter again later in our lives.

Deductions from the hallmarks of the immune system for its tumors - the malignant lymphomas

It is relatively easy to conclude alone from these three hallmarks of the adaptive immune system - to provide an almost unlimited repertoire to recognize foreign structures, to respond to any single one of them in an efficient manner as needed, and to terminate this defense response when it is no longer needed and to convert it into memory - that this system must be built and governed by unique biological principles and mechanisms. The immune system must have its own ways to build the required structures for this function and to govern their activity through powerful and highly complex regulatory circuits.

It may also be deducted from these observations that such a complex and highly dynamic system carries the chance for malignant transformation through errors that occur in the regulation of immune responses. In the last two decades, we have made great advances in understanding how different identifiable and recurrent aberrations in immune mechanisms give rise to a colorful variety of tumors - an intriguingly diverse group that collectively are called malignant lymphomas.

Why is it then that I encounter to this day in the LUMC a nondiscriminatory attitude to this important field of hematology, where a negative definition - non-Hodgkin's lymphoma prevails to this day, a term that only says that the disease at hand is something else than one particular entity that amounts to only 8% of this group of diseases?

Om deze houding te begrijpen, moeten we eerst de geschiedenis kennen van het onderzoek naar maligne lymfomen. Een beslissende factor lijkt mij het simpele feit dat de anatomie en de histopathologie van het lymfesysteem aan de ene kant en aan de andere kant het inzicht in de fysiologie van de immuniteit, dus de functionaliteit zich historisch gezien los van elkaar ontwikkeld hebben.

Geschiedenis van de anatomie en histopathologie van het immuunsysteem

Lymfeklieren worden al genoemd door Hippocrates, maar hij verzuimt om er een functie aan toe te kennen. Lymfevaten werden ontdekt door Herophilus en Erasistratus in die bloei-periode van de anatomie in de derde eeuw voor Christus. Deze werd mogelijk gemaakt door systematische obducties bij mensen en grote dieren, maar ook door vivisectie op veroordeelde misdadigers, een barbaarse onderzoeksmethode die in de Hellenistische tijd algemeen aanvaard was. Zij zagen de lymfevaten als kanalen die een melkachtige vloeistof bevatten, die lopen tussen de darmen en de lymfeklieren in de ophangband van de darm, het zogeheten mesenterium. Acht eeuwen later beschrijft Galenus van Pergamon op grond van onderzoek bij dieren opnieuw de verbinding tussen deze lymfevaten en “sponsachtige vlezige lichaampjes”, de lymfeklieren in het mesenterium. Hij geloofde ten onrechte dat de inhoud van het lymfesysteem in de buik uiteindelijk via de poortader in de lever terecht kwam - een aanname die pas aangevochten wordt als de tweede grote bloei-periode van de anatomie tijdens de renaissance goed op gang is gekomen.

Het lymfesysteem krijgt nog geen aandacht in het beroemde eerste anatomische tekstboek, “De humani corporis fabrica”, dat Vesalius 1543 publiceert. In de bibliotheek van de Faculteit Geneeskunde van de Universidad de Buenos Aires in Argentinië mocht ik een exemplaar bewonderen. Enkele van zijn opvolgers, waaronder Fallopius en Eustachius, herontdekken de lymfevaten in de buik en noemen ze “lacteales” op basis van hun melkachtige inhoud. Het inzicht dat lymfevaten niet alleen in de buik voorkomen en in feite via de borstholte uit-

In attempt to answer this question, one has to understand the history of the research on malignant lymphomas. A decisive factor appears to me to be the simple fact that the anatomy and pathology of the lymphatic system on one hand and the understanding of immune function, thus the physiology on the other hand, have historically developed largely independent from each other.

History of the anatomy and pathology of the immune system

Lymph nodes are mentioned by Hippocrates, but he fails to ascribe any function to them. Lymph vessels are discovered by Herophilus and Erasistratus during the flourishing of anatomy in Alexandria in the third century before Christ, which was facilitated by systematic post-mortem examinations of humans and large animals but also by vivisection of condemned delinquents, then in the Hellenistic Age an accepted method for research. They visualized lymphatic vessels as ducts that contain milky fluid and are found between the intestines and mesenterial glands. Based on dissection of large animals alone, Galen of Pergamon again recognized 8 centuries later in Rome the connection between these lymph vessels and “spongy flesh bodies” in the mesenterium. However, his erroneous belief that the contents of the intraabdominal lymphatic system eventually ended up by way of the portal vein in the liver was adopted unchallenged well into the second great era of anatomy during the Renaissance.

5

The lymphatic system receives no attention in the famous first comprehensive textbook of anatomy, “De humani corporis fabrica” from Vesalius published in 1543, which I could admire in the library of the Faculty of Medicine of the University de Buenos Aires in Argentina. However, work of several of his pupils and followers, including Fallopius and Eustachius, rediscovered those intraabdominal lymph vessels, which received the names “lacteales” based on their milky contents. The knowledge that lymph vessels are not confined to the abdomen and drain in

komen op de bloedcirculatie is voor het eerst beschreven in het werk van Aselli in Milaan 1651 en Johannes van Horne. Deze hoogleraar in de anatomie te Leiden publiceert zijn ontdekking van de ductus thoracicus in 1652 onder de titel “Novus ductus chyliiferus. Nunc primum descriptus et eruditorum examini expositus”.

Het intensieve onderzoek op dit gebied culmineerde in 1653 in wat wel genoemd is “Immunology’s First Priority Dispute”. De controverse gaat over de vraag wie ontdekte dat lymfevaten overal in het lichaam aanwezig zijn en een systematisch netwerk vormen door het gehele organisme. De Leidse uitgever Hemsterhuis ruikt een commerciële kans en publiceert bijdragen van de twee kemphanen in deze bittere strijd. Dat waren Bartholin, hoogleraar in de anatomie in het Zweedse Uppsala en Rudbeck, een Deense student geneeskunde. Er wordt een commentaar toegevoegd van de Franse student Pecquet, die echter de eerste ontdekker was van het feit dat de lymfevloei-stof vanuit de buik via de borstkas in de bloedstroom uitmond. In werkelijkheid schijnt alleen Bartholin als hoogleraar toegang gehad te hebben tot menselijk materiaal, namelijk pas geëxecuteerde misdadigers. De studenten werkten met dieren. Deze fascinerende geschiedenis en de aandacht die er ook bij een groter publiek voor bestond, laat zien hoe het communiceren van die bevindingen minstens even belangrijk is voor wetenschappelijke roem als de daadwerkelijke primeur voor een bepaalde ontdekking. Dat geldt heden ten dage natuurlijk nog steeds.

Een tweede dispuut over wie de primeur had, ontstond een eeuw later in Groot-Brittannië, over de functie van het lymfesysteem. Zowel Hunter in London als Monro in Edinburgh maakten aanspraak op de ontdekking dat lymfevaten extracellulair vocht in het hele lichaam verzamelen en het transport bevorderen door uitwendige druk en kleppen die de stroom in één richting laten gaan. De anatomie van het gezonde lymfesysteem was daarmee vastgesteld en heeft sindsdien nauwelijks nog aandacht gekregen van onderzoekers. We beschouwen het als een systeem van vaten dat parallel loopt aan de afvoer van bloed via de aders, met lymfeklieren als anatomische filterstations.

fact through the thorax into the bloodstream is attributable to the works of Aselli in Milano 1651 and Johannes van Horne, Professor of Anatomy at Leiden University, who published his discovery of the Ductus thoracicus as “Novus ductus chyliiferus. Nunc primum descriptus et eruditorum examini expositus” in 1652.

This intense area of research culminated in 1653 in what has been described as “Immunology’s First Priority Dispute”. This controversy evolved about the discovery that the lymphatic vessels are ubiquitous and form a system network throughout the organism. It was the Leiden publisher Hemsterhuis who seized this opportunity and assembled contributions from the two main contrahents in this bitter feud, Bartholin, Professor of Anatomy in Uppsala, and Rudbeck, a Danish medical student, with a report from the French student Pecquet, who had actually been the first to recognize the drainage of mesenterial lymph via the thorax. Actually, only Bartholin as professor seemed to have had access to freshly executed criminals, specimens that we nowadays lack, whereas the students worked on animals. This fascinating tale and the high degree of public attention it received reminds to this day that the means how you communicate your findings are as least as important to claim scientific fame as the actual first moment of a particular discovery.

A second public priority dispute developed a century later in Great Britain about the function of the lymphatic system. Both Hunter in London and Monro in Edinburgh laid claim to the discovery that lymph vessels collect extracellular fluid throughout the body and facilitate its transportation through external pressure and prevention of backward flow by intravascular valves. Thereafter, the healthy lymphatic system appears to have ceased to attract the curiosity of researchers, and to this day it is considered to be a parallel system to the venous system, with lymph nodes acting as anatomical filtration stations.

De opkomst van de pathologische anatomie in de 19de eeuw brengt ons eindelijk de eerste beschrijvingen van maligne lymfomen. In 1832 publiceert Hodgkin een serie van zeven autopsieën met opvallende en uitgebreide zwellingen van lymfeklieren. Hij kan op grond van uitsluitend macroscopisch onderzoek deze ziekten van ontstekingen onderscheiden en karakteriseert hen als “idiopathic interstitial enlargement of the absorbent glandular structure throughout the body”. Hij erkent bovendien de secundaire betrokkenheid van de milt in deze aandoeningen en definieert daarmee wat wij tegenwoordig het “nodale groeipatroon” van lymfomen noemen. Dat wordt gekenmerkt door een primaire verspreiding door de lymfeklieren, waarna de milt mee gaat doen en uiteindelijk ook plaatsen buiten het lymfesysteem, zoals beenmerg en organen betrokken raken. Weefsels uit de oorspronkelijke autopsieën, die bewaard waren gebleven in het Londense Guy’s Hospital, werden een kleine eeuw later opnieuw onderzocht. In drie van de zeven gevallen bleek inderdaad het lymfoom aanwezig te zijn dat nog altijd Hodgkin’s naam draagt. De andere gevallen hadden geleden aan andere soorten lymfomen, tuberculose en syfilis.

Niet veel later had Virchow in Duitsland al de microscopie in de diagnostische routine van de pathologie ingevoerd. Vrij snel na zijn eerste beschrijving van “Weisses Blut” - hoogstwaarschijnlijk chronische myeloïde leukemie - publiceert hij 1847 een artikel, dat in de titel voor het eerst de term leukemie gebruikt. De betreffende patiënt, Carl August Schulz, had voor zijn overlijden twee jaar lang gezwollen lymfeklieren in de nek gehad. Tijdens de autopsie stelt Virchow vast dat alle lymfeklieren in zijn lichaam zijn aangedaan, een gegeneraliseerde lymfadenopathie. Ook waren in het bloed de witte bloedcellen enorm in aantal toegenomen. We hebben hier waarschijnlijk de eerste beschrijving van wat we nu een maligne lymfoom met leukemisch groeipatroon zouden noemen.

Op grond van hun onderscheidende klinische kenmerken werden daarna verscheidene andere typen maligne lymfomen beschreven. Het multiple myeloom werd al in 1845 beschreven

The rise of pathologic anatomy in the 19th century led finally to the first descriptions of malignant lymphomas. In 1832, Hodgkin published a series of 7 autopsies with prominent and widespread swellings of lymph nodes. Based on macroscopic examination alone, he was able to distinguish these conditions from inflammatory changes and characterized the condition instead as “idiopathic interstitial enlargement of the absorbent glandular structure throughout the body”. Furthermore, he realized that the spleen could be involved secondarily in these diseases, thereby defining what nowadays could be defined as a nodal pattern of lymphomatous growth - first spreading throughout the lymph nodes, followed by involvement of the spleen, and finally infiltration of extralymphatic sites such as bone marrow and parenchymatous organs. Almost a century later, histopathology examination of tissues from his original autopsies that had been preserved at Guy’s Hospital in London confirmed that 3 of the 7 cases had indeed suffered from the lymphoma that still bears his name, while the other cases represented other types of lymphomas, tuberculosis, and syphilis.

Not much later, Virchow in Germany had already introduced microscopy to the diagnostic routine of pathology. Very soon after his first description of a case of Weisses Blut - most likely chronic myeloid leukemia -, he published in 1847 a seminal publication that carries in its title the term “Leukaemie” for the first time. This patient, Carl August Schulz, had a two year-long history of swollen cervical lymph nodes. At autopsy, Virchow noticed an extensive generalized lymphadenopathy together with an enormous expansion of white blood cells, thereby apparently providing the first description of what we would now call a malignant lymphoma with a leukemic course.

Several other lymphoma types were described based on distinctive clinical features: multiple myeloma first by Macintyre, Watson, and Bence Jones and in 1889 by Kahler in the German-speaking

door Macintyre, Watson and Bence Jones en voor de Duitstalige wetenschappelijke wereld door Kahler in 1889. De ziekte van Waldenström werd in 1944 voor het eerst beschreven in Uppsala. Burkitt's lymfoom werd ontdekt in 1956 in centraal Afrika, waar het een endemische agressief groeiende tumor is. Het feit dat deze lymfomen tot op de dag van vandaag genoemd worden naar hun ontdekker laat zien dat indertijd nog geen enkele systematische classificatie bestond. Als de geneeskunde gewacht had op de revolutie die de immunologie in de afgelopen decennia teweeg heeft gebracht, hadden deze verschillende aandoeningen vanuit immunologisch perspectief onderzocht kunnen worden. Maar voordat deze kennis beschikbaar kwam, werd er al een poging ondernomen om alle kwaadaardige gezwellen van de witte bloedcellen in een rigide kunstmatige matrix te wringen - een poging die tot op de dag van vandaag het wetenschappelijk denken over deze aandoeningen afremt.

8 In 1956 verzamelde Rappaport een serie maligne lymfomen uit de grote pathologische collectie van het Amerikaanse leger. Zijn doel was om met duidelijkheid een ziekte-entiteit af te grenzen waarvan men toen dacht dat deze bestond, de zogeheten giant follicular hyperplasia of ziekte van Brill-Simmers. Zuiver op grond van vormkenmerken, op morfologie dus, stelt hij in zijn publicatie voor het eerst dat elk geval van maligne lymfoom moet worden geplaatst binnen een coördinatensysteem dat door celtype en groeipatroon gedefinieerd is - diffuus versus nodulair. We weten tegenwoordig dat wat hij daarna schrijft absoluut onjuist is: "On the basis of our observation we do not regard follicular lymphoma as a separate and distinct disease entity but as a variant of diffuse lymphoma of corresponding cellular composition".

Twee experts op het gebied van lymfomen die tegenwoordig zeer gezaghebbend zijn, Armitage uit Omaha and Dalla-Favera uit New York, wijzen erop dat dit systeem vooral zo populair werd bij klinici en nog altijd bijna niet uit te roeien is, simpelweg doordat het meest voorkomende diffuse lymfoom een belangrijk andere prognose heeft dan het meest voorkomende lymfoom dat gewoonlijk in een nodulair patroon groeit. Te-

world; Waldenström's disease 1944 in Uppsala, and Burkitt's lymphoma as an endemic aggressive tumor of Central Africa in 1956. The fact that we still use eponyms when we refer to these lymphomas testifies to the lack of a lymphoma classification. If medicine would have awaited the imminent revolutionary knowledge on the immune system, each of these diseases might have been studied from this viewpoint as a separate entity. However, before this could happen, we encounter the first attempt to force all malignant lymphoproliferations into a rigid and artificial matrix that seems to inhibit pathobiological thinking to this day.

In 1956, Rappaport collected a series of malignant lymphomas from the large pathology collection of the United States Armed Forces with the goal of clearly delineating what was believed to be a disease entity, the so-called giant follicular lymphoma or Brill-Simmers disease. On purely morphological grounds, he proposes in this paper for the first time that every lymphoma case should be positioned within a coordinate system defined by cell type and growth pattern - diffuse versus nodular. In direct opposition to our current knowledge, he states "On the basis of our observation we do not regard follicular lymphoma as a separate and distinct disease entity but as a variant of diffuse lymphoma of corresponding cellular composition".

As two of the currently most influential lymphoma experts - Armitage from Omaha and Dalla-Favera from New York point out, this system became popular and seemingly inexorable with clinicians simply because the most common diffuse lymphoma has a very distinct prognosis from the most common lymphoma typically growing in a nodular pattern. In retrospect, however, this system rather hampered progress in lymphoma research,

rugblikkend kunnen we vaststellen dat het systeem van Rappaport de vooruitgang in het onderzoek naar lymfomen echter geremd heeft. De verleiding is groot om nog een eeuw terug te gaan naar de publicatie van Virchow en hem te citeren: “*Es war geradezu ein Denkfehler, ganze Familien von Krankheits-Entitäten im naturhistorischen Sinne auf ein minus oder ein non - ens zurückzuführen.... Dieses Zusammenhäufen von schlecht untersuchten Tatsachen und unlogischen Velleitäten muss einmal aufhören*“.

De classificatie volgens Rappaport lijkt pathologen en medici verleid te hebben tot het geloof dat één ziekte zich kan manifesteren in zulke verschillende histopathologische patronen en daarmee samenhangende klinische patronen. Dit geloof komt uiteindelijk tot uiting in de opkomst van de ongelukkige term ‘non-Hodgkin lymfoom’ die voor het eerst in de medische literatuur verschijnt rond 1972 en ons tot op heden nog steeds in de weg zit.

Historische aspecten van de functie van het afweersysteem

Anders dan het onderzoek naar de anatomie en de pathologie van het lymfesysteem begon de research op het gebied van het verworven immuunsysteem met puur theoretische concepten. Door het werk van Jenner en Pasteur, de pioniers van de vaccinatie, werd duidelijk dat er iets bestond als beschermende immuniteit tegen bacteriële toxinen en ziektekiemen. Passieve immunisatie, bescherming tegen infectie door het injecteren van serum dat afkomstig is van een geïmmuniseerd dier, werd ontwikkeld door Behring en Ehrlich. Uit deze experimenten werd geconcludeerd dat immuniteit ontstaat dankzij zogenaamde antitoxines of antilichamen.

Ehrlich kwam in 1897 met een profetische visie op verworven immuniteit in zijn zogeheten Seitenkettentheorie, letterlijk ‘zijketen-theorie’. Zijn voorstel bevat diverse aspecten van antitoxines waarvan later bewezen zou worden dat zij waar zijn. Zo voorspelde hij dat antilichamen actieve producten zijn van het organisme, dat zij een grote mate van specificiteit vertonen voor hun doelwit, dat zij op de manier van een chemische reactie een op een met het doelwit in interactie zouden gaan en dat de

and one is tempted to go back one century to Virchow’s paper and to cite “Es war geradezu ein Denkfehler, ganze Familien von Krankheits-Entitäten im naturhistorischen Sinne auf ein minus oder ein non - ens zurückzuführen.... Dieses Zusammenhäufen von schlecht untersuchten Tatsachen und unlogischen Velleitäten muss einmal aufhören”.

The Rappaport classification seem to have lured pathologists and clinicians to believe that one disease could manifest itself in different histopathologic and associated clinical patterns, and this belief was finally reflected in the advent of the unlucky term “non-Hodgkin lymphoma” which appears in the medical literature around 1972 for no recognizable further reason and which haunts us to this day.

Historical aspects of the function of the immune system

In contrast to the anatomical and pathological study of the lymphatic system and its diseases, research on physiology and function of the adaptive immune system began as purely theoretical concepts. The phenomenon of protective immunity against bacterial toxins and certain infectious agents became known through the pioneering vaccinations performed by Jenner and Pasteur. Passive immunization through injection of immune sera from immunized animals as developed by Behring and Ehrlich had led to the perception that immunity was mediated by so-called “antitoxins” or “antibodies” in immune individuals.

With the development of the Seitenkettentheorie, Ehrlich proposed in 1897 an almost prophetic concept for the structural basis of adaptive immunity. This theory contained several aspects of antitoxins that would eventually proven to be true, including the facts that antibodies are active products of the organisms, that they display exquisite specificity for the toxin, that they directly interact with the toxin in a stoichiometric manner, and that immunity keeps being stimulated by presence of the antigen until

afweerreactie gestimuleerd blijft worden door de aanwezigheid van het doelwit totdat de noodzakelijke hoeveelheid antilichamen geproduceerd is. Tegelijkertijd kon Ehrlich nog niet weten welk type cellen in staat zijn om zulke ‘zijketens’ te produceren. Hij dacht bijvoorbeeld dat zenuwcellen dit vermogen zouden hebben, eenvoudigweg omdat het tetanustoxine het zenuwstelsel aantast. We mogen echter niet vergeten dat Ehrlich zelf de eerste was die kleuringstechnieken introduceerde in de microscopie en dat hij toen net de mestcel ontdekt had op grond van de opvallende kleuring van deze cel. Tot dat moment waren de witte bloedcellen uitsluitend bekend als de kleurloze cellen van het bloed.

Hoewel in de tussentijd stapsgewijs de eiwitstructuur van antilichamen opgehelderd werd, kwam de volgende grote doorbraak van fundamenteel belang voor ons begrip van maligne lymfomen pas een halve eeuw geleden. In 1961, kort nadat hij de Nobelprijs had gekregen, schreef Burnet een overzichtsartikel over zijn clonale selectietheorie in het *New England Journal of Medicine* onder de titel “The New Approach to Immunology”. Het is als eerbetoon voor de vijftigste verjaardag van zijn overtuigende en briljante essay dat ik als titel voor mijn oratie gekozen heb voor “The New Approach to Lymphomas”.

Burnet presenteerde overtuigend bewijs voor de stelling dat de eerdergenoemde kenmerken van verworven immuniteit - het brede natuurlijke repertoire, het vermogen tot zeer specifieke afweerreacties en de ontwikkeling van geheugen - verklaard kunnen worden door het eenvoudige feit dat een enkele afweercel talrijke kopieën draagt van slechts één individuele antigeenreceptor. Die receptor is het specifieke molecuul dat het doelwit, het antigeen, herkent. Zoals Burnet het zei: “I believe that one can legitimately define an immune competent cell as one that differs from other morphologically and physiologically similar cells by specific reactivity with a particular antigen or antigenic determinant”. Het is daarom de individuele afweercel die de basis vormt voor de immuunrespons. Als hij geselecteerd wordt uit miljarden overeenkomstige cellen door specifiek contact met zijn antigeen, reageert hij zonder uitzondering allereerst door te delen. Deze zogeheten clonale expansie ver-

the necessary amount of antitoxin has been achieved. However, Ehrlich had to remain ignorant about the nature of the cells that were able to develop such side chains, and he thought, for example, that nerve cells had this capacity simply because tetanus toxin affected the nervous system. However, we must not forget that Ehrlich himself was the first to introduce staining techniques into microscopy and had just discovered the mast cell based on its prominent staining properties. Until then, leukocytes had only been known as colorless cells of the blood.

*Notwithstanding the achievements over the stepwise elucidation of the protein structure of antibodies, the next breakthrough of fundamental importance to our modern understanding of malignant lymphomas came half a century ago. In 1961, shortly after he had received the Nobel Prize, Burnet wrote a review article in the *New England Journal of Medicine* on his clonal selection theory entitled “The New Approach to Immunology”. As a tribute to the 50th anniversary of this persuasive and brilliant essay, I have chosen as the title of this oration accordingly “The New Approach to Lymphomas”.*

Burnet provided convincing evidence that the mentioned hallmarks of adoptive immunity, the broad natural immune repertoire, the ability for a highly specific immune reaction, and the development of memory, could be explained by the simple fact that any one single immune cell carries multiple copies of only one individual antigen receptor. In his own words: “I believe that one can legitimately define an immune competent T-cell as one that differs from other morphologically and physiologically similar cells by specific reactivity with a particular antigen or antigenic determinant”. It is therefore the single immune cell that is the basis for the immune response: if it becomes selected among billions of similar cells through specific contact with its antigen, it reacts invariably first with a clonal expansion until it has gained dominance and efficacy, whereas the particular flavor or quality of its immune effects may display considerable variety and is dependent on modifying circumstances.

groot zijn dominantie en werkzaamheid. Terwijl kan de eigen “smaak” of kwaliteit van zijn immuneeffecten sterk variëren en hangt van modifierende omstandigheden af.

Dit unieke beginsel van de verworven immuniteit heeft duidelijke parallellen met ons algemene concept van kwaadaardige tumoren. Een enkele cel van een bepaald weefsel krijgt de capaciteit om zich ongecontroleerd en onbeperkt te vermenvuldigen. De kloon van dochtercellen die daaruit ontstaat, vormt uiteindelijk de tumor die we in de kliniek waarnemen. Wanneer we dit toepassen op de lymfomen als de autochtone tumoren van het verworven immuunsysteem, kan een simpele conclusie getrokken worden. Laten we de fysiologische signalen bestuderen die de zojuist genoemde clonale expansie van de afweerreactie stimuleren en reguleren. Daar verwachten we afwijkingen te vinden die het kwaadaardige gedrag van deze lymfomen verklaren en zelfs veelbelovende doelwitten kunnen vormen voor de behandeling van deze tumoren.

Voordat ik deze centrale gedachte van mijn oratie verder ontwikkel, zou ik graag nog mijn historische exposé afronden. Ik was immers op zoek naar een verklaring voor de ongelukkige aanduiding non-Hodgkin lymfomen die nu al zo lang bestaat. Vijf jaar na Rappaport’s poging om een systematische classificatie voor lymfomen te formuleren werd de clonale selectie theorie van Burnet geaccepteerd. Burnet beschikte echter nog niet over de technologieën om zijn theorie verder te ontwikkelen op het niveau van cellen of zelfs moleculen. Hij wist dat de immunocompetente cellen gevonden konden worden binnen de lymfocyten, maar was nog niet in staat om accuraat te onderscheiden tussen verschillende ontwikkelingsfasen of hun functionele differentiatie in verschillende cellijnen en celypen.

De tegenwoordige tijd: de WHO classificatie

Gelukkig is de situatie tegenwoordig sterk verbeterd. In het midden van de jaren ‘90 van de vorige eeuw kwam een opmerkelijke internationale samenwerking tussen pathologen en klinici eindelijk tot de conclusie dat kunstmatige coördinatie-systemen uit het verleden herzien moest worden. Zij bieden immers geen zinvol referentiekader voor een beter begrip van

This unique principle of adaptive immunity has obvious parallels to our general concept of malignant tumors: a single cell of a given tissue acquires the capacity of uncontrolled and unlimited proliferation, and the resulting clonal daughter cells actually form eventually the clinically manifest tumor. Applied to lymphomas as the autochthonous tumors of the adaptive immune system, the simple conclusion can be drawn: investigate the physiological signals that stimulate and regulate reactive clonal expansion in immune responses in lymphomas, and you will find aberrations of these signals that both explain the malignant behavior of these lymphomas and represent promising targets for lymphoma therapy.

Before I develop this key thought of my oratie further, I would like to complete my historical explanation for the persistent unlucky designation of non-Hodgkin’s lymphoma by reminding us that Burnet’s clonal selection theory was accepted only 5 years after Rappaport’s attempt to formulate a systematic lymphoma classification. Still, Burnet lacked the technologies to develop his theory at the cellular or even molecular level. He knew that the immune competent T-cells were found within the lymphocytes, but was unable to accurately distinguish their developmental stages or their functional differentiation into distinct lineages and cell types.

11

The presence: The WHO classification

Luckily, we are nowadays in a much improved situation. In the mid-1990s, a remarkable international collaboration of pathologists and clinicians finally recognized that artificial coordination systems must fail to provide a meaningful framework to understand the biology of malignant lymphomas. At this time, the development of key technologies such as

de biologie van maligne lymfomen. Rond die tijd stond een aantal sleuteltechnologieën ter beschikking die een schat aan informatie opleverde over de fysiologie van het immuunsysteem en de moleculaire afwijkingen van lymfomen. Monoklonale antilichamen, flowcytometrie, recombinant-DNA technologie, sequencing van genen, genetisch gemodificeerde muizen, genexpressieprofielen en andere technieken boden ongekende mogelijkheden voor classificatie en analyse. Door deze data te combineren met beschikbare klinische kennis uit behandelingsstudies en epidemiologie, kon een nieuw systeem ontworpen worden voor de indeling van de lymfomen. Het was gericht op het onderscheiden van individuele ziekte-entiteiten en gebaseerd op hun respectievelijke kenmerken wat betreft morfologie, immunologie, genetica en klinische verschijnselen. Deze benadering ontwikkelde zich uiteindelijk tot de huidige World Health Organization Classification of Hematological Tumors, waarbinnen de maligne lymfomen een zeer diverse en kleurrijke diertuin van duidelijk onderscheiden ziekten vormen.

Een sterk voorbeeld van de voordelen van deze classificatie vormt de verbetering van de behandeling van patiënten met een zogeheten mantelcellymfoom. Mantelcellymfomen kunnen er heel verschillend uitzien. Klinisch groeien sommige in een nodaal patroon, sommige met een ziektebeeld dat lijkt op leukemie, en sommige als tumoren buiten de lymfeklieren. Ook de morfologie verschilt sterk, van een diffuse groei tot de vorming van pseudofollikels, terwijl het uiterlijk van de cellen zelf varieert van onogelijk kleine celletjes tot een beeld dat doet denken aan de agressieve blasten bij een leukemische crisis. Het mag duidelijk zijn dat dit lymfoom niet goed was onder te brengen in de gebruikelijke morfologische classificaties. Pas door de nieuwe WHO classificatie werd duidelijk dat mantelcellymfomen behoorden tot de groep met de slechtste prognose van alle lymfomen. Maar het is mijn diepe overtuiging dat het nauwkeurig herkennen van een probleem de belangrijkste stap is op weg naar zijn oplossing. Het doet me dan een groot genoegen om op deze plek te vermelden dat een nieuwe standaard voor diagnostiek en behandeling is vastgesteld voor oudere patiënten met mantelcellymfoom. De uitkomsten van

monoclonal antibodies, flow cytometry, recombinant DNA technology, gene sequencing, genetically engineered mice, gene expression profiling, and others had already provided a wealth of data on the physiology of the immune system and molecular aberrations of lymphomas. By combining these data with available clinical knowledge from treatment trials and epidemiology, the new system focused on the distinction of individual lymphoma entities based on their respective morphological, immunological, genetic, and clinical characteristics. This approach eventually evolved into the current World Health Organization Classification of Hematological Tumors, in which the malignant lymphomas make a highly diverse and colorful zoo of very distinct diseases.

As one striking example of the merits of this classification, the patients suffering from mantle cell lymphoma now begin to experience its benefit. Mantle cell lymphoma comes in highly variable appearances. Clinically, it can grow in a nodal pattern, with a leukemic picture, or predominantly as extranodal masses. Morphologically, it can grow diffusely or in pseudofollicular manner, and the cells themselves can vary between inconspicuous small cells to a more aggressive-looking blastoid appearance. This lymphoma was therefore not reliably recognizable in the morphological classifications, and only through the WHO classification became apparent that mantle cell lymphoma had one of the poorest prognoses among all lymphomas. However, precise recognition of a problem is in my firm opinion the most important step to its solution, and I may mention at this place that a large international consortium, including the HOVON, has under the leadership from Hanneke Kluin-Nelemans, now Groningen, formally Department of Hematology in Leiden, just defined a new and treatment standard for elderly patients with this disease, with outcomes that clearly surpass the original expectations.

behandelingen van deze patiënten overtreffen de oorspronkelijke verwachtingen. De standaard is overigens vastgesteld door een groot internationaal consortium waarin ook de Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland (HOVON) vertegenwoordigd was. Het stond onder leiding van Hanneke Kluijn-Nelemans, die nu in Groningen zit maar jarenlang aan onze Leidse afdeling Hematologie verbonden was.

Nu wij ons bevrijd hebben van de onnodige systematologische ballast, zijn we met vernieuwde energie begonnen aan het indelen van lymfomen volgens onze kennis van de functionele ontwikkelings- en rijpingsstadia van normale lymfocyten. Deze onderneming levert steeds meer succes op. Op dit moment in het bespreken van *The New Approach to Lymphomas* zal ik u niet vermoeien met een lange lijst van te onderscheiden lymfomen volgens de WHO classificatie. In plaats daarvan wil ik graag mijn centrale stelling verder ontwikkelen dat een beter begrip van de immunologische mechanismen en hun afwijkingen een verklaring biedt voor essentiële kenmerken van de lymfomen. Ik wil me daarbij in het bijzonder concentreren op de rol van een eiwitmolecuul dat in feite de essentie vormt van de verworven immuniteit: de antigeenreceptor.

Immunopathologie van maligne lymfomen: het perspectief van de B-celreceptor

Sinds Burnet weten we dat elke immuuncel één antigeenreceptor maakt. Het essentiële verschil tussen individuele lymfocyten is dan ook te vinden in de specificiteit van hun respectievelijke antigeenreceptoren. De breedte van het immunologische repertoire berust dus op miljarden verschillende antigeenreceptoren met subtiele structurele verschillen die zorgen voor hun eigen specificiteit. Ons genoom, het geheel van onze genen, heeft echter helemaal niet zo'n grote capaciteit. Het bevat informatie voor niet meer dan dertigduizend verschillende eiwitten. Om het immense spectrum van verschillende receptoren te kunnen produceren, passen lymfocyten in de loop van hun ontwikkeling een truc toe. Zij reorganiseren, re-shufflen, bepaalde genen in hun celkern. Een briljant kunstje, dat echter ook risico's met zich meebrengt, zoals we zullen zien. De in-

*Having freed ourselves from the unnecessary systematological ballast, renewed efforts have begun to assign the individual lymphoma entities to functional developmental and maturational states of normal lymphocytes, and have been highly successful. At this point in the discussion of *The New Approach to Lymphomas*, I will not engage in a tedious discussion of the growing list of distinct lymphomas as defined in the WHO classification. Instead, I would like develop the central assumption further that the understanding of immunological mechanisms and their aberrations can explain key characteristics of lymphomas. In particular, I will focus only on the role of the protein molecule that is the essence of adaptive immunity, the antigen receptor.*

Immunopathology of malignant lymphoma: The perspective from the B-cell receptor

According to the one antigen-receptor - one cell model of Burnet's clonal selection theory, the essential difference between individual lymphocytes is attributable to the specificity of their respective antigen receptor. The broadness of the immunological repertoire therefore is based on billions of antigen receptors with subtle structural differences that account for their particular specificity. However, our genome only has the capacity to store information for less than 30.000 proteins. The ability to provide the variability to produce the immense spectrum of different receptors comes at the dangerous price of genetic reshuffling at certain stages in lymphocyte ontogeny. The information for antigen receptors of humans is encoded in only 7 genetic loci. Four loci have the genetic information for the antigen receptor proteins that T-cells of the T-cell lineage utilize. For the B-cell lineage, one locus

formatie voor de antigeenreceptoren van mensen bevindt zich eenvoudig gezegd op zeven genen, zeven genetische loci. Er bestaan twee typen lymfocyten, de B-cellen die antilichamen produceren en de T-cellen die hun taak in rechtstreeks contact met andere cellen uitvoeren. Van de zeven genen worden vier gebruikt door de T-cellen voor hun antigeenreceptoren. Bij de B-cellen wordt één gen gebruikt voor de zogeheten zware keten van het antilichaam, twee genen zorgen voor de lichte ketens. Van elk gen bestaan uiteraard twee kopieën, omdat we immers een dubbele set chromosomen hebben, van elk van onze ouders één.

Het verbazende geheim van het ontstaan van de enorme variëteit aan verschillende receptorketens ligt in unieke eigenschap van deze genetische loci. Ze bevatten namelijk niet zo maar een enkel gen, maar een aanzienlijk aantal partiële genetische bouwstenen verspreid over een groter gebied. En net zoals de fantasie van een kind een fascinerende variëteit aan bouwsels kan creëren met de blokken in haar blokkendoos, zo kan elke voorloper van de lymfocyt zijn eigen receptor bouwen uit deze genetische bouwstenen. Deze eenvoudige truc schept de combinatorische diversiteit. Hoe groot die is, kan berekend worden uit de aantallen van alle deelnemende genetische segmenten. Dit proces vraagt echter ook om een tijdelijke onderbreking van de integriteit van ons genoom. De dubbele streng van ons DNA moet breken om elders weer te combineren met de andere segmenten. Door dit proces worden korte toevallige stukken DNA tussen de deelnemende segmenten gevoegd. Dit verschijnsel maakt de combinatorische diversiteit nog weer aanzienlijk groter, met een vrijwel onbeperkt aantal varianten van de antigeenreceptor als resultaat. De inherente donkere keerzijde van dit proces van recombinatie is de kans dat er iets misgaat bij de hereniging van DNA fragmenten en dat gevaarlijke genen van andere locaties in het locus van het receptorgen worden geïntroduceerd. Zoals zal blijken, ligt hier één sleutel tot het ontstaan van lymfomen.

Wanneer we ons beperken tot de B-celreceptor, is het de zware keten die als eerste geproduceerd wordt. Zijn functionaliteit wordt getest in een combinatie met andere eiwitten die geza-

encodes the B-cell receptor, or immunoglobulin, heavy chain, and two loci exist for light chains. As is the case for every entire chromosome, each locus is represented in two copies in our genome.

The amazing secret how an enormous variety of any receptor chain can be created lies in the unique property that these genetic loci do not contain at first a single functional gene but a considerable number of partial genetic building blocks that are scattered over a considerable length of these loci. As a child's fantasy creates a fascinating variety of objects from the limited number of blocks contained in her construction kit, each lymphocyte precursor creates its own receptor from these genetic building blocks. This simple trick creates the so-called combinatorial diversity, which can be calculated by the product of the numbers of members of each sort of participating genetic segments. However, this process requires a temporal interruption of the genomic integrity, with occurrence of double-stranded DNA breaks and subsequent rejoining the chosen elements that recombine. Within this process, short random stretches of DNA sequences are inserted between participating segments. This phenomenon adds to combinatorial diversity, resulting in virtually unlimited varieties of antigen receptor sequences. However, the inherited dark side of this recombination process is the chance that the joining goes wrong and dangerous genes from other locations are placed into the gene receptor locus.

Restricting ourselves to the B-cell receptor, it is its heavy chain that gets produced first. Its functionality is tested in an assembly with other proteins that form together the pre-B-cell receptor

menlijk het pre-B-celreceptorcomplex vormen. Het pure feit dat er een functionele pre-B-celreceptor aanwezig is, vormt een krachtig signaal voor de B-cel om te gaan delen. Vervolgens wordt het genetische locus voor de lichte ketens gereorganiseerd. De cel draagt dan een rijpe B-celreceptor op het oppervlakte, bestaande uit twee kopieën van de zware keten en twee kopieën van de lichte keten. Het overleven van een rijpe B-cel hangt af van de aanwezigheid van zo'n intacte receptor op zijn oppervlakte. We veronderstellen dat deze receptor een constant zogeheten tonisch signaal geeft dat de cel in leven houdt, zelfs zonder dat er contact gemaakt wordt met het antigeen.

Autonoom BCR signalering en chronische lymfocytische leukemie

Bij Chronische Lymfocytische Leukemie (CLL), een lymfoom dat bestaat uit grotendeels normaal uitzijende lymfocyten, is in diverse studies aangetoond dat de B-celreceptoren niet zo divers zijn als in normale populaties B-cellen, maar juist sterk op elkaar lijken, een fenomeen dat bekend staat als receptorstereotypie. Veel deskundigen op het gebied van lymfomen geloven dat deze stereotypie het gevolg is van de stimulering en selectie van CLL-cellen door een beperkte verzameling antigenen. De zoektocht naar deze antigenen, de heilige graal van het ontstaan van CLL, is tot dusver grotendeels onsuccesvol geweest. Onze samenwerkingspartner Hassan Jumaa van het Max-Planck-Instituut voor Immunobiologie in Freiburg heeft een alternatieve hypothese geformuleerd. Hij veronderstelt dat de B-celreceptoren van CLL geselecteerd zijn op hun eigenschap om een veel sterker constitutief signaal af te geven dan normale receptoren. Dit signaal, dat de cel in stand houdt, zou zo sterk zijn doordat zij het antigeenonafhankelijke signaal na-apen van het eerdergenoemde pre-B-celreceptorcomplex. Met Jumaa's intelligente experimentele systeem dat 'pre-B-celreceptorcomplex-achtige activiteit' meet, hebben we een groot aantal gevallen van CLL onderzocht. Vrijwel alle CLL-receptoren gaven het door hem voorspelde signaal, terwijl receptoren van andere lymfomen en van normale B-cellen dit signaal niet geven.

complex. There mere existence of a functional pre-B-cell receptor gives a first strong proliferation signal to the B-cell. Subsequently, the cell rearranges a light chain locus and is then able to carry a mature B-cell receptor on its surface that is composed of two copies of the heavy and two copies of the light chain. Survival of a mature B-cell is dependent on the presence of such an intact receptor on its surface. It is commonly assumed that even without making contact to an antigen, the receptor gives a constant, so-called tonic signal that keeps the cell alive.

Autonomous BCR signaling and chronic lymphocytic leukemia

In chronic lymphocytic leukemia, a lymphoma composed of mostly normally-looking lymphocytes, large studies have revealed that the B-cell receptors are not as diverse as in normal populations of B-cells, but display instead striking similarities, a phenomenon known as receptor stereotypy. Many lymphoma experts believe that stereotypy is the consequence of stimulation and selection of CLL-cells by a limited set of antigens. However, the search for this holy grail of CLL lymphomagenesis has until now been largely unsuccessful.

Our collaboration partner Hassan Jumaa at the Max-Planck-Institute of Immunobiology in Freiburg has formulated an alternative hypothesis. He assumes that the B-cell receptors of CLL are selected for their property to give a much stronger constitutive signal than normal receptors by mimicking the antigen-independent signaling strength of the pre-B-cell receptor.

We have now tested a large number of CLL cases in his sophisticated experimental system that allows to measure pre-B-cell receptor-like activity, and almost all CLL receptors gave the predicted signal, but receptors from other lymphomas and from normal B-cells do not.

Op grond van deze nog niet gepubliceerde bevindingen kunnen we nu een nieuw model van CLL voorstellen. Dit lymfoom kan ontstaan in de situatie dat sommige B-cellen het krachtige signaal tot delen blijven krijgen dat gebruikelijk is in het pre-B-cel stadium. Deze situatie is eigenlijk een voorstadium van kanker. De premaligne, geëxpandeerde groep cellen is vervolgens blijkbaar extra kwetsbaar voor genetische mutaties waarvan we weten dat die vaak voorkomen bij CLL. Sommige daarvan zullen leiden tot kwaadaardig biologisch gedrag. De agressiviteit van een individuele CLL-tumor wordt bepaald door die mutatie, dus door de secundaire genetische gebeurtenis. Voor de hier geschetste gang van zaken pleiten ook de eerste bevindingen van onderzoek bij broers en zusters van CLL-patiënten. Van deze personen is bekend dat zij een verhoogd risico hebben op de aanwezigheid van kleine aantallen CLL-achtige cellen, een beeld dat bekend staat als monoclonale B-cel lymfocytose. Bij deze patiënten zien wij soms dat slechts enkele cellen CLL-achtige genetische afwijkingen hebben, alsof zij deze pas verworven hebben - in elk geval nadat zij hun premaligne clonale expansie hadden doorgemaakt.

Zo' n centrale rol voor de B-celreceptor in CLL maakt het uiteraard een aantrekkelijk doelwit voor therapeutische interventies. Idealiter zouden wij patiënten willen behandelen met geneesmiddelen die specifiek gericht zijn op hun pre-B-celreceptorfunctie. Het is echter waarschijnlijk dat er nog aan veel werk te verzetten is voordat we de precieze structurele eigenschappen ontcijferd hebben die zorgen voor de kracht van dit signaal. Vervolgens moeten we dan nog middelen ontwikkelen die dit signaal specifiek kunnen verstoren. In de tussentijd zou het een acceptabel alternatief kunnen zijn om het signaal van de B-celreceptor te blokkeren. We zouden ons daarbij niet zozeer op de receptor zelf richten als wel op de signaalroutes tussen deze receptor en de celkern. Het is bekend dat het signaal vooral wordt doorgegeven door een soort estafette van enzymen, de tyrosine kinases, die elkaar activeren door fosfaatgroepen te bevestigen aan het aminozuur tyrosine dat onderdeel uitmaakt van hun eiwitstructuur. Wij hebben ons geconcentreerd op het kinase SYK, omdat het in verhoogde mate voorkomt in CLL-

Based on these as yet unreported findings, we are now able to propose a novel model of CLL as a condition where some B-cells continue to receive the strong expansion signal as they did in the pre-B-cell stage. These premalignant, expanded cells then appear to be prone to acquire one of known CLL-associated genetic mutations that eventually results in malignant behavior. The aggressiveness of an individual CLL case is governed by the secondary genetic event. This sequence of events is supported by preliminary results from siblings of CLL patients. These persons are known to be at a higher risk of possessing CLL-like cells in low numbers, a condition called monoclonal B-cell lymphocytosis. We here sometimes observe that only some cells have CLL-like genetic aberrations, as if they had just acquired them - in any case after they had undergone their premalignant clonal expansion.

Such a central role for the B-cell receptor in CLL identifies it as the obvious therapeutic target. Ideally, our vision is to treat patients with drugs that would only affect the pre-B-cell receptor function. However, it may still require considerable work before we have deciphered the precise structural features that endow this signaling quality, and to design disrupting agents accordingly. In the meantime, blockade of B-cell receptor signaling may represent an acceptable alternative. This approach does not interfere with the receptor itself but with the downstream molecules that transmit the signal to the nucleus. This signaling cascade is mainly composed of tyrosine kinases that activate each other by attaching phosphate groups to tyrosine residues. We have concentrated on the kinase SYK, because it is overexpressed and indeed overphosphorylated in CLL-cells compared to normal B-cells. Pharmacological blockade of SYK indeed kills CLLs in culture. In addition, we found out that SYK blockade also inhibits additional survival signals that CLL-cells receive from their microenvironment through so-called integrins and chemokines.

cellen in vergelijking met normale B-cellen en er bovendien inderdaad extra vaak fosfaatgroepen aan bevestigd zijn. Een middel dat SYK blokkeert, blijkt daadwerkelijk in staat te zijn om in weefselkweek CLL-cellen te doden. Bovendien hebben we gevonden dat blokkade van SYK ook remmend werkt op andere signalen die het overleven van de CLL-cel bevorderen, signalen uit hun micro-omgeving die worden doorgegeven door zogeheten integrines en chemokines.

Andere groepen richten zich momenteel op geneesmiddelen die een remmend effect hebben op Bruton's tyrosine kinase (BTK), dat eveneens essentieel is in de overdracht van het signaal van de B-celreceptor naar de kern van de CLL-cel. Toekomstige studies zullen moeten aantonen welke benadering de meeste voordelen biedt voor patiënten met CLL: de beperktere werking van de BTK remmers of het beginsel van diverse vliegen met één klap slaan via remming van SYK.

Kiemcentrumsmechanismen en het diffuus grootcellig lymfoom

Laten we nog even terug gaan naar de normale B-cellen. Wanneer deze eenmaal zijn uitgerust met een passende antigeenreceptor, nemen zij hun plaats in in de follikels van lymfeklieren. Dat zijn microscopische structuren waarin de B-cellen in nauwe wisselwerking staan met antigeenpresenterende cellen en T-cellen. Wanneer er een actieve afweerreactie nodig is tegen een antigeen, veranderen deze follikels in kiemcentra, hoogwaardige reactoren die B-cellen in staat stellen om wanneer zij hun antigeen tegengekomen, de antigeenreceptor nog iets te modifieren waardoor de affiniteit tussen receptor en doelwit verder toeneemt.

Dit wordt bereikt dankzij een enzym dat vrijwel uitsluitend op deze bijzondere anatomische locatie wordt aangemaakt: AID, ofte wel activation-induced deaminase. AID modificeert de DNA-volgorde in het gen voor de antigeengereceptor op een gerichte manier, maar wel door een toevalsproces. Andere enzymen veranderen vervolgens de DNA-volgorde die de code voor de receptor bevat, ten dele opnieuw door breuken in de dubbele streng van het DNA. Opnieuw vind hier dus een klein

Other groups currently focus on pharmacological inhibition of Bruton's tyrosine kinase - BTK -, which is also essential in transmission of the B-cell receptor signal. Future studies will have to show whether the more restricted action of BTK inhibitors or the principle of killing several birds with one stone by SYK inhibition will yield the best benefits for CLL patients.

Germinal center mechanisms and diffuse large B-cell lymphoma

From CLL back to the normal B-cell. When equipped with a proper antigen receptor, they populate lymph node follicles, microscopic structures where they are in close interaction with cells that present antigen and T-cells. In the event of an active immune response to an antigen, these follicles become germinal centers, highly sophisticated reactors that enable B-cells that encounter their antigen to modify their antigen receptors with the purpose of increasing their affinity.

This is accomplished through the action of activation-induced deaminase, or AID, an enzyme almost exclusively expressed in this particular anatomic location. AID modifies the DNA sequence of the antigen receptor gene in a targeted but random fashion. Further enzymes then alter the coding DNA sequence, in part again through intermediate double-stranded DNA breaks. Since this evolution of the antigen receptor is random, only the few cells that develop by chance a receptor with higher affinity to

evolutieproces plaats rond de antigeenreceptor: er worden toevallige veranderingen aangebracht, gevolgd door een selectieslag. Want alleen de cellen die als gevolg van deze toevallige veranderingen en receptor hebben ontwikkeld met een grotere affiniteit voor het antigeen, worden positief geselecteerd. De grote meerderheid van de B-cellen die aan deze kiemcentrum-reactie begonnen, verliest zijn antigeenstimulatie en wordt dus geacht dood te gaan. Daarom is het kiemcentrum een plaats waar B-cellen voortdurend klaarstaan om actieve celdood, apoptose, te ondergaan.

Die bereidheid tot apoptose staat echter haaks op de aanwezigheid van breuken in de dubbele DNA-streng. Dit is voor elke cel een alarmsignaal dat krachtige veiligheidsmechanismen in werking zet om de cel in zijn huidige toestand te houden. Dit mechanisme is bedoeld om verandering in een kankercel te voorkomen. Maar in de kiemcentra kunnen de B-cellen deze mechanismen tijdelijk onderdrukken door *bcl6*, het product van het BCL6-gen. Zo ontstaat een potentieel onstabiele situatie. De cel is geactiveerd door contact met antigeen, er zijn DNA-modificerende activiteiten aan de gang en de veiligheidsmechanismen worden onderdrukt. Dit kan misgaan wanneer er een getransformeerde cel ontstaat waarin AID per ongeluk ook toevallige wijzigingen gaat aanbrengen in BCL6. *bcl6* blijkt met namen het tweede meestvoorkomende doelwit van dit enzym te zijn, na de antigeenreceptor die zijn eigenlijke doelwit is. De modificatie kan er toe leiden dat BCL6, het gen dat de veiligheidsmechanismen als het goed is slechts tijdelijk uitschakelt, voortdurend aan komt te staan. De beschadiging van deze cellulaire schakelaar kan veroorzaakt worden door kleine veranderingen, puntmutaties, in het gen zelf of door het hele BCL6-gen te verplaatsen naar het antigeenreceptor locus. Daar blijft het zeker actief - u herinnert zich nog wel dat voortdurende activiteit van de antigeenreceptor in B-cellen nodig is voor hun overleving.

De laatste stap van een B-cel in een kiemcentrum naar een behoorlijk agressieve lymfoomcel wordt gezet wanneer AID nog meer schade aanricht. Vaak is er sprake van activerende puntmutaties in genen die een rol spelen in het antigeenre-

the antigen are being positively selected, the vast majority of the B-cells that enter the germinal center reaction, in contrast, lose their antigen stimulation and are supposed to die. Therefore, the germinal center is a location where B-cells are poised to undergo active cell death, or apoptosis, and are very much dependent on proper antigen contact.

The readiness to undergo apoptosis is, however, in conflict with the presence of double stranded DNA breaks, which would usually activate powerful safety mechanisms designed to arrest the affected cell in order to prevent malignant transformation. In the germinal center, B-cells are able to temporarily suppress these mechanisms by expressing a gene called BCL6. This creates a potentially instable situation, a cell that has been activated through antigen contact, with DNA-modifying activity switched on and the safety mechanisms suppressed. The situation can lead to a transformed cell when AID exerts aberrant activity on BCL6, actually its second most frequent target after the antigen receptor itself, and turns it permanently on by either conferring activating point mutations or translocating the BCL6-gene into the antigen receptor locus, which we have to remember needs to be constitutively active in B-cells.

The final act of converting a germinal center B-cell into a quite aggressive lymphoma cell comes when AID effects further damage. Activating point mutations in proteins that form part of the antigen receptor complex seem to be a common theme, and

ceptorcomplex. Zij maken de kwaadaardige transformatie compleet doordat contact met het antigeen niet langer nodig is voor ongecontroleerde proliferatie van de B-cellen. De tumor die zo ontstaat is onafhankelijk van de oorspronkelijke micro-omgeving van de lymfeklieren en groeit diffuus verder. Wat ik hier beschrijf is het begin van het diffuus grootcellig B-cel lymfoom, de meestvoorkomende kwaadaardige aandoening in de hematologie. Jaarlijks krijgen drie maal zo veel mensen deze aandoening dan bijvoorbeeld acute leukemie of de ziekte van Hodgkin.

Resistentie tegen apoptose en het folliculair lymfoom

In het kiemcentrum in de lymfeklier ontstaat via heel andere mechanismen ook nog een andere veel voorkomende kwaadaardige tumor. De grondslag voor deze kwaadaardige verandering wordt al gelegd in de vroege ontwikkeling van de B-cel, lang voordat deze zijn plaats inneemt in de follikel van de lymfeklier. U herinnert zich nog wel hoe de genen gereorganiseerd worden om de benodigde diversiteit te bereiken? Welnu, bij die herrangschikking in de genen voor de zware keten van de antigeenreceptor kan het gebeuren dat een bijzonder gen wordt meegesleept in die hele recombinatie. Het gaat om het gen dat bekend staat als BCL2. Zijn DNA-sequentie vertoont subtiele overeenkomsten met herkenningspunten rond de bouwstenen voor de antigeenreceptor, waardoor BCL2 ingebouwd wordt in die receptor, met ingrijpende gevolgen zoals we zullen zien. Deze gebeurtenis, een zogeheten translocatie, is niet zeldzaam en heeft zelfs geleid tot ontdekking van het BCL2-gen en daarmee tot een revolutie in de celbiologie. De ontdekking vond plaats in Boston, in het laboratorium van Jeffrey Sklar, kort voordat ik daar als postdoc kwam werken. Het werd duidelijk dat het Bcl2 eiwit een bijzonder belangrijk element was van een hele familie van structureel verwante factoren die fysiek met elkaar in wisselwerking staan. De subtiele balans van deze complexe interacties bepaalt of een cel in staat is om geprogrammeerde celdood, apoptose te ondergaan. Dat hele concept was toen nog nieuw. De zorgvuldige bestudering van een type lymfoom ligt dus ten grondslag aan het complete veld van

conclude the transformation process by making antigen contact unnecessary for uncontrolled cell proliferation. The resulting tumor is also independent from the original microanatomical structure of the lymph follicle and grows in a diffuse pattern. I am describing here the origin of diffuse large B-cell lymphoma, the most common of all hematological malignancies, with an incidence three times as high as acute leukemias or Hodgkin's lymphoma, for example.

Apoptosis resistance and follicular lymphoma

The germinal center is also the breeding ground for another common type of lymphoma, although by quite different mechanisms. The basis for this malignancy is prepared early in B-cell development, much prior to the entrance into the lymph follicle. During the primary rearrangement of the immunoglobulin heavy chain locus, there is a certain likelihood that a gene called BCL2 becomes targeted by the recombination machinery, simply due to the fact that there are subtle sequence similarities to the guiding elements flanking the building blocks of the antigen receptor.

The BCL2-gene had been identified based on this recurrent translocation in the laboratory of Jeffrey Sklar, shortly before I joined his laboratory in Boston to perform postdoctoral research. The BCL2-protein eventually turned out to be a particularly important member of a whole family of structurally related factors that physically interact with each other. The delicate balance of these complex interactions determines whether a cell is able to undergo programmed self death, apoptosis. The careful study of one type of lymphoma has therefore founded the entire field of apoptosis research, which has gained tremendous importance not only for oncology as a whole, but also, for example developmental biology because organogenesis and limb

apoptose-onderzoek, dat sindsdien enorm belangrijk geworden is niet alleen voor het geheel van de oncologie maar ook voor bijvoorbeeld de ontwikkelingsbiologie. Voor het ontstaan van organen en ledematen is het gecontroleerd laten verdwijnen van ongewenste cellen immers minstens even belangrijk als de groei van gewenste cellen.

De verplaatsing van het BCL2-gen naar het gen voor de anti-geenreceptor leidt ertoe dat BCL2 voortdurend actief is. Continue activiteit in het gen van de antigeenreceptor is immers de norm in elke B-cel. Door de aanwezigheid van het bcl2-eiwit zijn de betreffende B-cellen beschermd tegen apoptose - het zijn daarmee voorlopers van kanker, premaligne cellen. Vaak gaat het goed. Kleine aantallen van deze cellen kunnen in veel gezonde mensen gevonden worden. Een collega van ons bleek zelfs maar liefst elf onafhankelijke klonen bij zich te dragen.

De mutatie wordt gevaarlijk wanneer zo'n afwijkende B-cel een lymfefollikel in gaat, waar normale cellen hun BCL2 zouden uitschakelen om klaar te zijn voor het selectieproces in het kiemcentrum. De premaligne bcl2 producerende cel gaat dan ook nog het AID-gen tot expressie brengen en hypermutaties aanbrengen in de antigeenreceptor - maar dit proces lijkt losgekoppeld te zijn van de gewone immuunrespons. De cellen worden als het ware in deze toestand bevroren. Er vindt geen selectie plaats. De cellen blijven in leven dankzij hun weerstand tegen apoptose, ook als hun antigeenreceptor geen hogere affiniteit voor het antigeen verwerft. Intussen gaat het proces van hypermutaties in de B-celreceptor door, waardoor bepaalde eiwitmotieven ontstaan die door de cel voorzien worden van een suikerketen. Zij worden met andere woorden geglycosyleerd. Onderzoek door Freda Stevenson in Southampton heeft aangetoond dat deze suikerketens vervolgens een binding aangaan met lectines, dat zijn eiwitten die een voorkeur hebben om zich met suiker te verbinden, in de micro-omgeving van het kiemcentrum. Deze binding werkt als een soort surrogaat voor het contact met het echte antigeen. Het geeft zelfs een sterker signaal dan het gewone tonische B-celreceptor signaal en stimuleert uiteindelijk kwaadaardige celgroei. De tumor die het resultaat is van deze ontaarding blijft afhankelijk van de prik-

formation are as dependent on the loss of unwanted cells as on the growth of desired cells.

B-cells that carry this constitutively active BCL2-gene and are therefore protected from apoptosis exist at a low frequency in many healthy people - one colleague of ours is known to harbor eleven independent clones.

The mutation becomes relevant when the cell with the BCL2 rearrangement enters a lymph follicle, where normal cells would turn off BCL2 in order to be ready for the selection process in the germinal center reaction. The premalignant, BCL2-expressing cell starts to express AID and begins to hypermutate the antigen receptor, but this appears to be independent from an active immune response. The cells become frozen in this state and persist due to their resistance to apoptosis, even when their receptor acquires no higher affinity for an antigen. Due this persisting hypermutation process, however, the resulting very high mutation rate of the B-cell receptor generates certain peptide motifs that undergo glycosylation, the addition of carbohydrate molecules. Work from Freda Stevenson in Southampton demonstrates that the sugar residues are being engaged by lectins, sugar binding proteins in the surface of cells in the germinal center microenvironment. The binding then replaces actual antigen binding or gives a stronger signal than tonic B-cell receptor signaling and stimulates finally malignant growth. The resulting tumor remains therefore dependent on the follicular environment, has a rather slow progression because the growth signal is dependent on a ligand, but is incurable because of the expression of BCL2. We call this tumor follicular lymphoma.

keling door lectines en dus van de folliculaire omgeving. Hij groeit langzaam, omdat het groeisignaal afhankelijk is van deze binding, maar is helaas ook ongeneeslijk vanwege de continue productie van het bcl2-eiwit dat apoptose tegengaat en de cellen dus effectief onsterfelijk maakt. Wij noemen deze tumor het folliculair lymfoom.

Chronische stimulatie door antigeen en het extranodaal marginalzonenlymfoom

Het laatste voorbeeld dat ik met u wil bespreken is een lymfoom dat zich ontwikkelt buiten de lymfatische organen, in perifere weefsels op plaatsen waar sprake is van een chronisch actieve afweerreactie. Het meestvoorkomende voorbeeld is de chronische ontsteking van de maagwand die veroorzaakt wordt door de bacterie *Helicobacter pylori*, maar dezelfde principes zijn van toepassing op de chronische ontsteking van de speekselklieren bij de ziekte van Sjögren, bij een bindweefselontsteking in het oog die veroorzaakt wordt door Chlamydia en zo zijn er nog meer voorbeelden. Bij deze chronische ontstekingen, die gedreven worden door de aanwezigheid van een antigeen, verzamelen zich antigeenspecifieke T-cellen die geleidelijk nieuw lymfatisch weefsel laten ontstaan. De ontstekingsignalen van deze T-cellen stimuleren aanwezige B-cellen die plaatselijke weefselantigenen met een vrij lage affiniteit lijken te herkennen. Deze omgeving leidt uiteindelijk tot een kwaadaardige uitgroei van een enkele kloon van dominante B-cellen, die zonder behandeling kan leiden tot de dood van de patiënt. Wanneer de afweerreactie echter gestopt kan worden, bijvoorbeeld door *H. pylori* met antibiotica uit te schakelen, verdwijnt de kwaadaardige tumor vaak compleet. Een dergelijk lymfoom kan echter resistent worden tegen het weghalen van de ontstekingsprikkel wanneer er bepaalde mutaties optreden - net als in het eerdergenoemde voorbeeld betreft het translocaties, verplaatsingen van genen. Deze leiden tot een continu signaal van de antigeenreceptor, dus onafhankelijk van de aanwezigheid van een antigeen, waardoor voortdurende proliferatie van de cel plaatsvindt. Bij de betreffende translocaties zijn meestal de genen betrokken voor de signaalmoleculen MALT1 en BCL10.

Chronic antigenic stimulation and extranodal marginal zone lymphoma

My final example that I would like to discuss is the lymphoma that develops outside of the lymphatic organs, in peripheral tissues at the sites of chronic active immune reactions. The most common of these is chronic gastritis caused by Helicobacter pylori, but the same principles apply to chronic sialadenitis in Sjogren's disease, Chlamydia-associated conjunctivitis, and there are other examples. In these chronic, antigen-driven inflammations, antigen-specific T-cells gather and gradually build up novel lymphatic tissue. The inflammatory signals from these T-cells stimulate bystander B-cells that appear to recognize resident tissue antigens with rather low affinity. This environment leads eventually to clonal and malignant outgrowth of a dominant B-cell clone that, when left untreated, may lead to the death of the affected patient. However, when the immune reaction can be abolished, for example, through antibiotic eradication of H. pylori, the malignant tumor frequently regresses completely. The lymphoma may become resistant to the withdrawal of the inflammatory stimulus when certain recurrent translocation lead to constitutive and therefore antigen-independent antigen receptor signaling. These translocations involve the intermediate signaling molecules MALT1 and BCL10.

Nieuwe therapeutische perspectieven

Met deze vier voorbeelden wil ik mijn opmerkingen besluiten over de manier waarop het ontstaan van lymfomen geworteld kan zijn in die immuunreactie zelf en de mechanismen die te maken hebben met ontstaan en de rol van de antigeenreceptor. Ik ben ervan overtuigd dat deze manier van kijken naar de pathobiologie zal bijdragen aan het ontwikkelen van behandelingen die specifiek op maat gemaakt zijn voor de oorzaak van individuele lymfomen. Voorbeelden van deze benadering zijn de eerste klinische studies die nu worden ondernomen met remmers van SYK, BTK, BCL6 en BCL2. Wanneer we ophouden met over deze lymfomen te denken alsof zij tot één niet van elkaar te onderscheiden soort behoren, zoals gesuggereerd wordt door de term non-Hodgkin lymfoom, kunnen we ook ophouden met behandelingen die geen onderscheid maken. In het slechtste geval doden zij alle sneldelende cellen in het lichaam, in wat we nu nog als het beste geval beschouwen, elimineren zij alle B-cellen, zowel de gezonde als de kwaadaardige. In de laatste minuten van deze oratie wil ik graag een alternatieve aanpak bespreken hoe we selectief de kwaadaardige kloon kunnen aanpakken. Juist vanwege de enorme variatie in antigeenreceptoren, vormt deze receptor een uniek kenmerk voor de kwaadaardige cel. Dat was immers de kern van Burnet's theorie van clonale selectie. Dit schept de mogelijkheid om antigeenspecifieke afweerreacties te induceren tegen deze unieke structuur. Met andere woorden, we kunnen de antigeenreceptor zelf tot doelwit van de afweerreactie maken. We moeten ons dan richten op het unieke patroon van die receptor, het idiootype.

Zo'n 15 jaar geleden begon ik mijn eigen onderzoeksgroep met als korte termijn doel om uit te vinden of patiënten met een lymfoom inderdaad T-cellen bij zich dragen die specifiek in staat zijn om cellen aan te vallen die met het idiootype van de lymfoom-antigeenreceptor. We konden deze hypothese bevestigen in experimenten met afweercellen die afkomstig waren uit het bloed van deze patiënten. Veel recenter hebben wij onze groeiende database geanalyseerd waarin we idiootype sequenties en het corresponderende HLA type van patiënten hebben

New therapeutic perspectives

With these four examples, I will conclude my remarks on the immunopathogenesis of lymphomas as mediated by mechanisms involving the structural origin formation and signaling of the antigen receptor molecule. I am convinced that this type of pathobiological view will facilitate the development of therapies that are specifically tailored to the cause of individual lymphomas. Examples of this approach are early clinical trials of inhibitors of SYK, BTK, BCL6, and BCL2. If we stop thinking that these lymphomas are of the same, nondiscriminatory kind, as suggested by the term non-Hodgkin lymphoma, we are ready to abandon equally nondiscriminatory therapies that at worst kill all proliferating cells in the body and at their current best eliminate all B-cells, healthy and neoplastic alike.

In the last minutes, I would like to mention an alternative way how we can achieve selectively attack the malignant clone alone. Given their immense variation, every antigen receptor represents a unique marker for the malignant T-cell, again strictly according to Burnet's clonal selection theory. This creates the opportunity to induce antigen-specific immune responses against precisely this unique structure. In other words, we turn the antigen receptor that we designate in this context an "idiotype" itself into an immune target.

About fifteen years ago, I started my own research group with the short-term goal to find out whether lymphoma patients actually have T-cells that can specifically attack cells carrying the lymphoma antigen receptor, the idiootype. We were able to confirm this hypothesis in experiments with autologous immune cells from these patients. Much more recently, we analyzed our growing database of idiootype sequences and the corresponding HLA types of lymphoma patients. These computational bioinformatics results demonstrate that such T-cells indeed

opgeslagen. Uit dit *in silico* onderzoek blijkt dat T-cellen wel degelijk een selectiedruk uitoefenen op de uitgroei van de kwaadaardige kloon bij het folliculaire lymfoom. Lymfoomcellen met een idiotype waarvan verwacht wordt dat zij gemakkelijk herkend worden door zo'n killer cel, worden onderdrukt. Alleen een kloon met een idiotype dat weinig immuunrespons opwekt, mag blijven groeien.

Onafhankelijk bewijs voor de stelling dat T-cellen een krachtige rem kunnen vormen op de groei van lymfomen komt van allogene stamceltransplantaties. T-cellen van de donor blijken daar in staat te zijn om lymfomen die niet op behandeling reageren te genezen, in wat de *graft-versus-tumor reaction*, de transplantaat-tegen-tumor reactie genoemd wordt. Het onderzoek van Fred Falkenburg van onze afdeling is vooral gericht op het begrijpen en toepassen van dit verschijnsel bij leukemie. Het lijkt mij heel interessant om te zien of en in hoeverre anti-idiotype immuniteit bijdraagt aan dit verschijnsel bij *graft-versus-lymphoma reactions*.

Vervolgens werd ik geïnspireerd door de ideeën van Ronald Levy van Stanford University, bij wie ik mijn tweede onderzoeksperiode in het buitenland mocht doorbrengen. In het verlengde daarvan zijn we bezig geweest met het stimuleren van de killer cellen van lymfoompatiënten, om hen te bewegen ook de minder immunogene idiotypes te herkennen, de varianten dus die ontsnappen aan de afweer en leiden tot een manifeste tumor. Ik zal onze ervaringen uit twee opeenvolgende series onderzoekingen samenvatten met de volgende bevindingen: actieve vaccinatie met het idiotype kan bij een substantieel deel van de patiënten leiden tot een teruggang (klinische regressie) van het lymfoom; deze regressie kan meer dan vijf jaar in stand blijven zodat voor deze subgroep van patiënten met een gunstige reactie in die tijd geen chemotherapie noodzakelijk was. Ook blijkt dat deze klinische vooruitgang samengaat met meetbare reacties van T-cellen die zoals voorspeld specifiek gericht zijn tegen zeer individuele gedeelten van het lymfoom-idiotype. Tegelijkertijd hebben we echter waargenomen dat de algehele toestand van het afweersysteem bij patiënten met B-cel-lymfoom gekenmerkt wordt door een verminderde activiteit, een

appear to apply selection pressure on the outgrowth of the malignant clone in follicular lymphoma: Lymphoma cells with an idiotype that is predicted to be well-recognized by such killer cells are suppressed, and only a clone with a comparatively low idiotype immunogenicity is permitted to grow.

Independent evidence that T-cells can exert powerful anti-lymphoma activity comes from allogeneic stem cell transplantation, where donor T-cells can clearly cure refractory lymphomas in what is called graft-versus-tumor reaction. While the major part of the research activities of our Department, led by Fred Falkenburg, is aiming at understanding and exploiting this phenomenon for leukemias, it will be very interesting to see whether and how much anti-idiotype immunity contributes to this phenomenon in graft-versus-lymphoma reactions.

Inspired by the ideas of Ronald Levy, in whose laboratory at Stanford University I spent my second research period abroad, we have also been trying to stimulate the lymphoma-patient's own killer cells to enable them to recognize the relatively low immunogenic idiotypes of clinically manifest lymphomas. I will summarize our experiences from two consecutive trial generations by stating that the evidence consistently shows that active idiotype vaccination can lead to clinical lymphoma regression in a substantial fraction of patients, that these lymphoma regression last for more than five years, that these responding patients therefore have not yet had the necessity to undergo cytotoxic therapy, and that these clinical improvements go along with measurable T-cell reactions that are - as predicted - specifically directed at the highly individual portions of the lymphoma idiotype.

However, we have also observed that the overall state of the immune system in B-cell lymphoma patients is characterized by a subclinical immunodeficiency with feature that seem to

subklinische immuundeficiëntie. Deze toestand lijkt de groei van het lymfoom te bevorderen. We zullen dus ook een stapje achteruit moeten doen om te ontcijferen hoe een lymfoom een algeheel immuunklimaat schept dat gunstig is voor zijn eigen overleving. Het omkeren van deze toestand zou niet alleen een betere uitgangssituatie vormen voor actieve immunotherapie tegen het lymfoom, maar zou bovendien ook uit zichzelf al de uitgroei van het lymfoom kunnen remmen.

Toekomst

Met dit historisch perspectief en met de presentatie van de huidige concepten in de wetenschap heb ik een schets gegeven van mijn taken en mijn persoonlijke interesses met betrekking tot mijn leeropdracht aan het Leids Universitair Medisch Centrum. Ik heb deze leerstoel met grote tevredenheid aanvaard, niet alleen omdat het een grote eer is om aan deze gerenommeerde universiteit tot hoogleraar in de hematologie benoemd te worden, maar ook vanwege de indrukwekkende geschiedenis en infrastructuur die hier bestaat op het gebied van immunologische interventie in kwaadaardige aandoeningen.

Leidse ontdekkingen die direct raken aan mijn eigen wetenschappelijke vragen zijn het onderzoek naar het menselijk HLA-systeem door Jon van Rood, de ontdekking van het eerste menselijke minor histocompatibility antigen door zijn leerling Els Goulmy, de succesvolle ontwikkeling van vaccins tegen kanker door Cees Melief en het voortgaande werk op het gebied van de ontdekking van nieuwe antigenen, de analyse van anti-leukemische T-cel-activiteit na allogene stamceltransplantatie en de ontwikkeling van wat wij 'het levende geneesmiddel' plegen te noemen, namelijk de afweercellen tegen leukemie door de onderzoeksgroepen van Mirjam Heemskerk, Inge Jedema en Marieke Griffioen. Deze expertise wordt versterkt en aangevuld door de diagnostische, laboratorium- en klinische expertise op het gebied van stamceltransplantatie en immunotherapie in de hematologie van Peter von dem Borne en Constantijn Halkes. De afdeling als geheel heeft natuurlijk een reeds lang bestaande internationale reputatie die gegroeid is onder mijn voorganger Roel Willemze.

support lymphoma growth. We will therefore also have to go back a step to decipher how a lymphoma creates an overall immune environment that is favorable for itself. To reverse this state would improve the situation for active anti-lymphoma immunotherapy but might also inhibit lymphoma growth by itself.

Outlook

With the historical perspective and the presentation of current scientific concepts have I sketched my tasks and my personal interests with respect to my appointment to Leiden University Medical Center. I have accepted this position with great satisfaction, not only because it means a great honor to be chosen for this position as professor of Hematology at this renown university, but also for her impressive history and infrastructure with respect to immune intervention in malignant diseases.

Leiden discoveries with direct importance for my own scientific questions are the research on the human HLA system by Jon van Rood, the discovery of the first human minor histocompatibility antigen by his pupil Els Goulmy, the successful development of anti-cancer immunization by Cornelis Melief, and the continuing work of antigen discovery, analysis of anti-leukemic T-cell reactivity after allogeneic stem cell transplantation, and the development of what we like to designate "the living drug", i.e. anti-leukemia immune cells by our group leaders Mirjam Heemskerk, Inge Jedema, and Marieke Griffioen. The diagnostic laboratory and the clinical expertise in stem cell transplantation and immunotherapy in our specialty of hematology of Peter von dem Borne and Constantijn Halkes complement this expertise advantageously, and the Department enjoys a long-standing international reputation, which has grown under my predecessor Roel Willemze.

Aan de andere kant ben ik nog niet eens echt begonnen te profiteren van de uitstekende infrastructuur van het LUMC. Ik verheug me dan ook erg op het ontwikkelen van onderzoeksprojecten in de immunomonitoring, bijvoorbeeld samen met Sjoerd van der Burg, op onderzoek naar krachtiger vaccins met Ferry Ossendorp en op de samenwerking met de Leidse faciliteit voor Good Manufacturing Practice. Ik kan u zeggen dat deze *shortlist* van plannen en mogelijkheden nog allesbehalve volledig is. Wanneer ik nog voorbij de grenzen van Leiden kijk, zie ik dat Nederland een bijzonder goede omgeving is voor translationeel onderzoek op het gebied van hematologische tumoren. De HOVON, opgericht door Bob Löwenberg en zijn collega's, is een excellente klinische onderzoeksorganisatie die in de internationale competitie een belangrijke partij meespeelt. Onder het voorzitterschap van Peter Huijgens heeft HOVON zich ook gepositioneerd als een invloedrijke stem op het gebied van regelgeving in de patiëntenzorg, terwijl de Nederlandse Vereniging voor Hematologie, geleid door Rien van Oers goede onderlinge contacten tussen hematologen garandeert en zorgt voor een excellente kwaliteit van de specialistenopleiding. Het landelijke zeer efficiënte systeem van gezondheidszorg in Nederland zorgt daarnaast voor een geïntegreerde samenwerking tussen artsen in de eerste lijn, specialisten en topzorg in de Universitair Medische Centra. De nadelen van het Nederlandse systeem, zoals het soms wat bedaalde tempo waarmee nieuwe en dure geneesmiddelen geregistreerd worden, neem ik daarbij graag op de koop toe.

Dankbetuiging

Mijn eerste dank gaat uit naar mijn academische opleiders, ten eerste Professor Erwin Rüde, emeritus hoogleraar in de immunologie te Mainz, vervolgens de zojuist vermelde Jeffrey Sklar, toen Harvard, nu Yale, en Ronald Levy te Stanford.

Mijn hele carrière heb ik echter in hoge mate te danken aan mijn klinische opleider, Roland Mertelsmann, die mijn wetenschappelijke interesses steeds met enthousiasme, inspiratie, en behoorlijke inzet van middelen gesteund heeft.

On the other hand, I have not yet seriously started to take advantage of the excellent infrastructure of the LUMC, and I am looking forward to develop research projects in immune monitoring, for example with Sjoerd van der Burg, in the development of more potent vaccines with Ferry Ossendorp, and to collaborate with the Leiden GMP facility. This shortlist is certainly not comprehensive.

Looking beyond Leiden, the Netherlands offer a particularly good environment for translational research around hematological tumors. The HOVON, founded by Bob Löwenberg en colleagues, is an excellent and internationally very competitive clinical research organization. Under the leadership of Peter Huijgens, HOVON has positioned itself as an influential voice on regulatory affairs in patient care, while the Dutch Society of Hematology, led by Rien van Oers, guarantees favorable interactions between the hematologists and an excellent quality of specialist training. The national, highly efficient health care system of the Netherlands secures in addition an integrated cooperation between primary care physicians, specialists, and top-level patient care in the academic medical centers, even when the registration of new and expensive drugs sometimes takes a somewhat sedate course.

Mijn dank komt ook al mijn voormalige collega's toe, die vandaag door Jürgen Finke van de Universiteit Freiburg vertegenwoordigd zijn. Jürgen, ich verdanke Dir Einsicht in die Kunst des Stammzelltransplantation; ich habe von Dir aber auch viel über den Umgang mit Patienten und Mitarbeitern gelernt.

Zonder eigen medewerkers kun je niets bereiken. Daarom gaat mijn dank aan alle promovendi, analisten, en postdoctorale onderzoekers van mijn onderzoeksgroep. Marcelo Navarrete, gracias especiales por que tu con tu familia me a Leiden seguistes.

Hooggeleerde Ferry Breedveld, hooggeleerde Wim Fibbe, en hooggeleerde Eduard Klasen - ik dank u, en de hele benoemingscommissie van de Universiteit Leiden voor het vertrouwen dat ik in staat ben de Afdeling Hematologie met succes naar de toekomst te leiden.

26

Mijn hartelijke dank gaat ook aan de stafleden van de afdeling, van wie ik de namen in het voorafgaande bijna allemaal al genoemd heb, behalve onze jongste stafid, Sabina Kersting, voor jullie bereidheid naar nieuwe ideeën te luisteren en een groot aantal onderwerpen aan te pakken.

Voor hun dagelijkse ondersteuning dank ik de medewerkers van het stafcentrum, Gerrie, Jacobine, en Marion, geleid door Karien: Jullie maken het LUMC voor mij een prettige werkplek, zodat ik iedere dag met plezier naar mijn werk ga.

Ten slotte betuig ik mij dank aan mijn gezinsleden. Liebe Vater und Mutter, euer Einfluss hat mich auf diesen Weg gebracht, auch wenn Ihr Euch vielleicht nicht vorstellen konntet wo er mich einmal hinführt.

Charlotte, Luise und Cecilia, ich danke Euch für Euer grenzenloses Vertrauen und Eure Bereitschaft, mir offensichtlich überallhin zu folgen.

Lynda, my beloved wife, you have now gone with me to a foreign country for the second time: Wherever you are, life is good for me.

Ik heb gezegd!

PROF. DR. J.H. (HENDRIK) VEELKEN (STUTT GART 1962)



- 1988 Artsexamen, Universiteit Mainz
- 1988 Promotie tot *doctor medicinae (magna cum laude)* Universiteit Mainz op het proefschrift: “Monoklonale Antikörper gegen Mastzellinien der Maus: Entwicklung und funktionelle Untersuchungen”
- 1988 - 1989 Arts-assistent, Universitätsklinik Mainz
- 1989 - 1992 Postdoctoral Research Fellow, Harvard Medical School and Brigham & Women’s Hospital, Boston
- 1992 - 1999 Arts-assistent, Universitätsklinikum Freiburg
- 1998 Specialisatie Interne Geneeskunde
- 1998 *Habilitation* (MD/PhD equivalent) en benoeming tot *Privatdozent* met *venia legendi* voor Interne Geneeskunde, Universiteit Freiburg
- 1999 Aandachtsgebied Hematologie en Oncologie
- 2000 - 2002 Research scholar, Department of Oncology, Stanford University Medical Center
- 2002 - 2010 Hoogleraar Medische Moleculaire Biologie, Universitätsklinikum Freiburg
- 2010 - heden Hoogleraar Hematologie en Afdelingshoofd, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Maligne lymfomen zijn de kwaadaardige aandoeningen van het specifieke afweersysteem. Een historische terugblik maakt duidelijk hoe deze ziekten in het verleden pathologisch-anatomisch als gezwellen van lymfklieren, de milt, of het beenmerg geïnterpreteerd werden. De immunologie ontwikkelde zich echter onafhankelijk als wetenschap van de functie van het afweersysteem. Als resultaat van gebrek aan inzicht in de functie van het immuunsysteem kon het onfortuinlijke begrip “Non-Hodgkin-Lymfoom” ontstaan. Deze negatiefdefinitie, voornamelijk bedoeld ter onderscheiding van de ziekte van Hodgkin, heeft sinds bijna 30 jaar een gedifferentieerde beschouwing van lymfomen verhinderd.

Sinds ongeveer een decade worden de maligne lymfomen onder geïntegreerde beschouwing van pathologisch-anatomische, immunologische, genetische, en klinische kenmerken binnen de WHO classificatie gedefinieerd en van elkaar afgegrensd. Door deze baanbrekende vernieuwing kunnen de individuele lymfoomentiteiten als maligne transformaties van bepaalde subtypes en rijpingsstadia van immuuncellen begrepen worden. Toenemende kennis van moleculaire stuur- en controlemechanismen van het immuunsysteem leidt tot de identificatie van exacte oorzaken voor de ontsparing van immuuncellen en hun stapsgewijze ontwikkeling tot een bepaald lymfoomtype. Het decoderen van deze oncogene mechanismen maakt de ontwikkeling van biologisch gebaseerde, nieuwe behandelingen mogelijk. Voorbeelden voor degelijke, specifieke lymfoombehandelingen zijn doelgerichte remstoffen voor bepaalde immunologische signaalwegen, het eradiceren van chronische immuunstimulaties, en het controleren van ontspoorde klonen door gezonde afweercellen door het herkennen van specifieke clonale kenmerken.

