UNIVERSITY OF AMSTERDAM

UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Beta-catenin

A molecular multiplayer

van der Wal, T.

Publication date
2024

Link to publication

Citation for published version (APA):
van der Wal, T. (2024). *Beta-catenin: A molecular multiplayer*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights
It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations
If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: https://uba.uva.nl/en/contact, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (https://dare.uva.nl)

Download date:16 Jan 2026

"Oy with the poodles already"

- Lorelai Gilmore – Gilmore Girls

Appendices

English summary

Beta-catenin: a molecular multiplayer

The adult human body consists out of over 30 trillion cells. These separate entities (with a size in the order of micrometres) need to form one cohesive structure, separated into different organs, each dedicated to their own function in the body. As you can imagine, these cells need to be attached to form one body. An important part in maintaining structural integrity of the body is cell adhesion, a process in which cells form physical bonds for attachment. At the same time, cells need to take on a certain identity to provide organ function and communicate with each other to do so in a coherent manner. Here, signalling cascades come into play. Cells make use of proteins to communicate to themselves and other cells surrounding them. The proteins, named ligands, can bind to receptor complexes on the outside of cells. When binding of these ligands to their receptors occurs, signalling cascades inside the cell are set into motion. Often, several proteins are part of these signalling cascades and an accumulation of interactions between these proteins will lead to a response. This response usually occurs in the cell nucleus, in the form of activation or repression of genes (pieces of DNA). A complex network of many of these signalling cascades is needed to form a body during embryonic development and to maintain functional organs in adults. One of those cascades is called WNT signalling ("wind" signalling), which, for example, is important in regulating the formation of a head and tail during embryonic development.

In this thesis, we focussed on an interesting characteristic of the protein beta-catenin (hereafter: CTNNB1), which plays a role in cell adhesion *and* WNT signalling. We therefore named CTNNB1 a molecular multiplayer. In cell adhesion, CTNNB1 binds so-called cadherin proteins in the plasma membrane that form bonds with cadherins on other cells. Inside the cells, CTNNB1 is a crucial link in the chain by anchoring the cell-cell bonds (or adherens junctions as they are called) to the skeleton of the cell. This ensures that the adherens junctions are strengthened and can resist physical forces, such as pinching your skin. In WNT signalling, CTNNB1 increases in the cell cytoplasm and nucleus via the signalling cascade. In the nucleus, it plays a crucial role in activating WNT target gene transcription. On many occasions, cells need to both be attached and respond to signalling, leading to the question: how does a cell balance CTNNB1 between its to functions? And, maybe even more intriguing, does CTNNB1 provide an important link between the two processes, leading to functional interaction or are they separated by tight regulation?

In **chapter 1**, we provide an overview of the existing literature on the balance of CTNNB1. The protein CTNNB1 was discovered 35 years ago and initially found in cell adhesion. Later, it was also linked to WNT signalling. Since then, both fields have studied CTNNB1 and its respective functions separately. Only few studies looked at the interaction or regulation of CTNNB1 between its two functions. Moreover, we discuss difficulties in this research, focussing on the relation between the function of CTNNB1 and its location in the cell, which cannot be directly linked.

To visualize cells and proteins, microscopy can be used. Since the discovery of fluorescent proteins in the 1990's, individual proteins in cells can be made visible by attachment of these fluorescent "light bulbs". In **chapter 2**, we describe the usage of advanced microscopy techniques to visualize signalling cascades, WNT signalling in specific. In **chapter 3**, we provide a detailed protocol for imaging CTNNB1 in living cells. We describe how to set up the imaging study and how to quantify CTNNB1 levels to determine where and when CTNNB1 is present in the cell in response to activation of the WNT signalling pathway.

Chapter 4 makes use of this protocol and describes the results of live imaging of CTNNB1 in HAP1 cells under a range of WNT3A (a WNT signalling ligand) concentrations. In this chapter, we experimentally activate WNT signalling and look at the effects on CTNNB1 localization. We confirm increases in CTNNB1 levels in the nucleus and cytoplasm upon WNT stimulation found by previous studies. In addition, we find that CTNNB1 increases at the membrane. Unfortunately, we could not confirm that the increased levels of CTNNB1 at the membrane were due to its function in cell adhesion. At the end of chapter 4, we propose a model in which the membrane compartment functions as a buffer for CTNNB1 to prevent CTNNB1 increases in the nucleus, when activation of the WNT pathway is not high enough to lead to activation of WNT target genes.

In **chapter 5**, we experimentally adjust cell adhesion by adjusting the surroundings of the cells. Adherent cells continuously resist physical forces and adjust the composition of their adherens junction accordingly to retain their strong bonds. In many experiments, cells are plated on plastic or glass dishes, which are very stiff. Here, we used soft gels as a way to adjust this stiffness and manipulate adherens junctions. We show that CTNNB1 distribution over the nuclear, cytoplasmic and membrane compartment is adjusted based on stiffness. Using a technique called "RNA-sequencing", which measures gene activation, we show that stiffness has a diverse effect on WNT target gene activation. We conclude that the stiffness-induced changes in CTNNB1 localization do not necessarily lead to a functional response at the WNT signalling level. Finally, we identify a set of novel WNT target genes that seem to be

dependent on stiffness.

In **chapter 6**, we propose an experimental approach based on creating mutations in CTNNB1 itself to adjust its functions in cell adhesion and WNT signalling. We provide a proof of concept of a CRISPR/Cas9 technique (which can be used to edit the DNA) to simultaneously create point mutations and attach fluorescent proteins to CTNNB1.

To finish, we discuss the results of this thesis in **chapter 7**, where we focus on bridging the experimental gap between CTNNB1 localization and function. Moreover, we discuss the dual function of CTNNB1 in the light of evolutionary biology: was Darwin right or did CTNNB1 escape its theory of survival of the fittest? In the end, the dual function of CTNNB1 might be used for interplay between cell adhesion and WNT signalling in some contexts, but CTNNB1 seems to be tightly regulated to ensure its separation as well.

Nederlandse samenvatting

Beta-catenin: een moleculaire multiplayer

Het volwassen menselijke lichaam bestaat uit meer dan 30 biljoen cellen. Deze afzonderlijke entiteiten (met een grootte van enkele micrometers) vormen een samenhangende structuur en zijn verdeeld over verschillende organen die elk een eigen functie in het lichaam hebben. Je kunt je voorstellen dat deze cellen met elkaar verbonden moeten zijn om samen één lichaam te kunnen vormen. Celadhesie speelt een belangrijke rol in het behouden van de structurele integriteit van het lichaam; dit is een proces waarin cellen fysiek bindingen aangaan om aan elkaar te hechten. Tegelijkertijd moeten cellen een bepaalde identiteit hebben om op een coherente manier organen te laten functioneren en met elkaar te communiceren. Dit is waar signaleringscascades een rol gaan spelen. Cellen maken gebruik van eiwitten om met zichzelf en omliggende cellen te communiceren. Die eiwitten, liganden genaamd, kunnen zich hechten aan receptoren aan de buitenkant van de cel. Wanneer deze liganden aan hun receptoren hechten treden signaleringscascades in de cel in werking. In veel gevallen zijn verschillende eiwitten onderdeel van deze signaleringscascades en leidt een opeenstapeling van interacties tussen de eiwitten tot een reactie. Deze reactie vindt meestal plaats in de celkern in de vorm van activatie of repressie van genen (stukken DNA). Er is een ingewikkeld netwerk van meerdere van deze signaleringscascades nodig om een lichaam te kunnen vormen gedurende embryonale ontwikkeling en om organen te laten functioneren in volwassenen. Eén van deze cascades heet WNT-signalering (spreek uit: wint-signalering) en speelt een belangrijke rol in bijvoorbeeld het reguleren van de vorming van kop en staart tijdens de embryonale ontwikkeling.

In dit proefschrift hebben we ons gericht op een interessante eigenschap van het eiwit beta-catenin (hierna te noemen CTNNB1) dat een rol speelt in celadhesie én WNT-signalering. Daarom noemen we CTNNB1 een moleculaire multiplayer. In celadhesie bindt CTNNB1 zogenaamde cadherin eiwitten in het plasmamembraan die verbindingen vormen met cadherin eiwitten op andere cellen. Binnenin de cellen is CTNNB1 een cruciale schakel in de keten doordat het de cel-cel verbindingen (of adherens-verbindingen zoals ze worden genoemd) verankert aan het skelet van de cel. Dit zorgt ervoor dat de adherens-verbindingen worden verstevigd en fysieke krachten kunnen weerstaan, zoals bij het knijpen in je huid. In WNT-signalering neemt CTNNB1 via de signaleringscascade toe in het cytoplasma en in de celkern. In de celkern speelt het een cruciale rol in het activeren van WNT genen. In veel gevallen moeten cellen zowel verbonden zijn met elkaar, als reageren op signalering. Dit roept

de vraag op: hoe brengt de cel de twee functies van CTNNB1 in balans? En wat misschien nog wel intrigerender is: vormt CTNNB1 een belangrijke link tussen de twee processen hetgeen leidt tot functionele interactie, of zijn de twee functies gescheiden door strenge regulering?

In **hoofdstuk 1** geven we een overzicht van de bestaande literatuur met betrekking tot CTNNB1 en de balans tussen de twee functies. Het eiwit CTNNB1 werd 35 jaar geleden ontdekt en werd aanvankelijk gevonden in celadhesie. Later werd het ook gekoppeld aan WNT-signalering. Sindsdien hebben beide velden CTNNB1 en zijn respectievelijke functies apart onderzocht. Slechts enkele onderzoeken hebben gekeken naar de interactie of regulering van CTNNB1 tussen beide functies. Daarnaast behandelen we knelpunten in dergelijk onderzoek waarbij we ons richten op de relatie tussen de functie van CTNNB1 en de lokalisatie in de cel, hetgeen niet direct aan elkaar kan worden gekoppeld.

Met behulp van microscopie kunnen cellen en eiwitten worden gevisualiseerd. Sinds de ontdekking van fluorescerende eiwitten in de jaren ’90, kunnen afzonderlijke eiwitten in cellen zichtbaar worden gemaakt door er fluorescerende “lampjes” aan te hangen. In **hoofdstuk 2** beschrijven we het gebruik van geavanceerde microscopie technieken om signaleringscascades te visualiseren waarbij we de focus leggen op WNT-signalering. In **hoofdstuk 3** beschrijven we een gedetailleerd protocol om CTNNB1 in levende cellen met microscopie zichtbaar te maken. We beschrijven de opzet van een dergelijk onderzoek en hoe CTNNB1-niveaus gekwantificeerd kunnen worden om vast te kunnen stellen waar en wanneer CTNNB1 aanwezig is in de cel na activering van de WNT-signaleringsroute.

In **hoofdstuk 4** gebruiken we dit protocol en beschrijven we de resultaten van “live imaging” van CTNNB1 in HAP1 cellen behandeld met een reeks van WNT3A (een WNT ligand) concentraties. In dit hoofdstuk activeren we WNT-signalering experimenteel en bekijken we de effecten op de lokalisatie van CTNNB1. We beschrijven een stijging van CTNNB1-niveaus in de celkern en het cytoplasma na WNT stimulering, zoals in eerdere onderzoeken al werd aangetoond. Daarnaast vinden we dat CTNNB1 niveaus toenemen in het membraan. Helaas konden we niet bevestigen dat de gestegen CTNNB1-niveaus in het membraan gekoppeld waren aan de functie van CTNNB1 in celadhesie. Aan het eind van hoofdstuk 4 stellen we een model voor waarin het membraan compartiment als een buffer voor CTNNB1 fungeert om te voorkomen dat CTNNB1 toeneemt in de celkern, als activatie van de WNT-route niet hoog genoeg is om WNT genen te activeren.

In **hoofdstuk 5** veranderen we experimenteel de celadhesie door de omgeving van de cel aan te passen. Gekoppelde cellen moeten fysieke krachten weerstaan en passen de samenstelling van hun adherens-verbindingen aan om verbonden te blijven.

In veel experimenten worden cellen uitgeplaat op plastic of glazen schaaltjes, die erg stijf zijn. Hier hebben we soft gels gebruikt om zo de stijfheid aan te passen en adherens-verbindingen te manipuleren. We laten zien dat de verdeling van CTNNB1 over de celkern, het cytoplasma en membraan compartiment is veranderd op basis van stijfheid. Door een techniek genaamd "RNA-sequencing" te gebruiken, die gen-activatie meet, laten we zien dat stijfheid verschillende effecten heeft op de expressie van WNT genen. We concluderen dat de veranderingen in CTNNB1 lokalisatie die teweeggebracht zijn door de stijfheid, niet persé leiden tot een functionele verandering op het niveau van WNT-signalering. Tenslotte identificeren we een aantal nieuwe WNT genen die afhankelijk zijn van stijfheid.

In **hoofdstuk 6** stellen we een experimentele aanpak voor waarbij mutaties worden gecreëerd in CTNNB1 zelf, om zo de functies van CTNNB1 in celadhesie en WNT-signalering te beïnvloeden. We tonen het gebruik van een CRISPR/Cas9 techniek (die gebruikt kan worden om DNA te manipuleren) aan om tegelijkertijd puntmutaties te creëren en fluorescerende eiwitten aan CTNNB1 te bevestigen.

Ter afsluiting bespreken we de resultaten van dit proefschrift in **hoofdstuk 7**. Hierbij richten we ons op het overbruggen van de experimentele kloof tussen de lokalisatie en functie van CTNNB1. Daarnaast bespreken we de duale functie van CTNNB1 in het licht van de evolutionaire biologie: had Darwin gelijk, of ontsnapte CTNNB1 aan zijn theorie van de survival of the fittest? Uiteindelijk blijft het mogelijk dat de duale functie van CTNNB1 in sommige contexten wordt gebruikt voor een samenspel tussen celadhesie en WNT-signalering, maar CTNNB1 lijkt ook sterk gereguleerd te zijn om zijn separatie veilig te waarborgen.

PhD portfolio

Conferences	
SILS research day 2021 (online) *Organization*	Online (COVID-19)
SILS research day 2022 *Organization and hosting*	Amsterdam, The Netherlands
ENBDC workshop 2022 *Poster presentation*	Weggis, Switzerland
DSCB "Dutch Society of Cell Biology" Trippenhuis meeting 2022	Amsterdam, The Netherlands
WNT 2022 EMBO workshop *Poster presentation*	Awaji, Japan
ENBDC workshop 2023 *Organization Early Career Researchers day* *PhD/Postdoc session chair main meeting* *Poster presentation*	Weggis, Switzerland
DSCB "Dutch Society of Cell Biology" Trippenhuis meeting 2023	Amsterdam, The Netherlands
SILS research day 2023 *Organization and hosting* *Workshop on Arts & Science given*	Amsterdam, The Netherlands
Grants and prizes	
Travel grant AUF for joining the WNT2022 EMBO workshop in Awaji, Japan	
Travel grant from the Stichting tot Bevordering van het Wetenschappelijk Onderzoek in de Biochemie for joining the WNT2022 EMBO workshop in Awaji, Japan	
Travel grant from EMBO for joining the WNT2022 EMBO workshop in Awaji, Japan	
Teaching	
Supervision of BSc internship *Femke Mol (BSc project Biomedical Sciences)*	University of Amsterdam
Supervision of 5 MSc internships *Melanie Rietveld* *Florence Wavreil* *Britt Balvers (shared supervision with Dr. Renée van Amerongen)* *Aoming Sun (shared supervision with Dr. Marten Postma)* *Gwendolyn Schildgen (shared supervision with Dr. Marten Postma)*	University of Amsterdam
Supervision of MSc Literature review *Nur al Amery*	University of Amsterdam

MSc course Advanced Microscopy (2020, 2021, 2022) *practical project week (2021, 2022)* *FRAT tutorial (2020)*	University of Amsterdam
BSc course Frontiers in Medical Biology (2020, 2021, 2022, 2023) *Wetlab practical (2020, 2021, 2022, 2023)* *Lecture (2023)* *COVID online transition (2020)*	University of Amsterdam
BSc course Fundamentals of Neuroscience (2021, 2022, 2023) *Lecture (2021, 2022, 2023)*	University of Amsterdam
MSc course Image Processing and Quantitative Data Analysis (2022, 2023) *Lecture and tutorial design (2022, 2023)*	University of Amsterdam
Courses	
Mastering your PhD (FNWI, UvA)	
Teaching skills (FNWI, UvA)	
Organisational	
SILS PhD/PD council 2019-2023 as active member	
ENBDC workshop Weggis 2023 PhD/PD session and day organisation	
PhD panel SILS intermittent evaluation report 2021	
PhD panel SILS evaluation 2023	
Panel implementatiemonitor NPO funding COVID extensions	
Outreach	
Radio Swammerdam editorial board & head editor *Als dieren konden praten (May 2023)* *De anticonceptiepil en depressie: de complexiteit van onderzoek (May 2023)* *Menstruatie en anticonceptie (December 2022)* *Geldkeuzes (October 2022)* *Lessen van de jonge wetenschapper (June 2022)* *Verbetering van de voedselindustrie op maatschappelijk en wetenschappelijk niveau (April 2022)* *De historie van ons koningshuis (April 2022)* *Ontwikkelingsbiologie in museum Vrolik (March 2022)* *Zwaartekracht en donkere materie (December 2021)* *Academische cultuur en open science (June 2021)* *Oncologie (May 2021)* *Stress (March 2021)* *Science en Science fiction (December 2020)* *Borsten: een biologisch en maatschappelijk ontwikkelend weefsel (October 2020)*	Radio Salto & Spotify

About the author

Tanne van der Wal was born on the 25th of October, 1994, in Dieren, the Netherlands. She went to high school at het Stedelijk Dalton College in Zutphen. In 2013, she moved to Amsterdam to study Biomedical Sciences at the University of Amsterdam. She extended her bachelor degree for an extracurricular year abroad in Canada at the University of Toronto, where she studied creative writing, photography and bio-informatics. She graduated *cum laude* with research honours. She obtained here master's degree Biomedical Sciences at the University of Amsterdam *cum laude*, with a specialization in Cell Biology and Advanced Microscopy. For her master's internships she went to the lab of Dr. Matilde Galli at the Hubrecht Institute in Utrecht and finally to the lab of Prof. Dr. Chris Bakal at the Institute for Cancer Research in London.

In 2019, she continued her academic career as a PhD-candidate in the lab of Dr. Renée van Amerongen at the Swammerdam Institute for Life Sciences. Here, she studied the duality in function of the protein beta-catenin, which performs crucial roles in both cell adhesion and WNT signalling. The results of this research are presented in this thesis. During her PhD, Tanne was an active member of the PhD/Postdoc council, organizing monthly seminars, an annual congress day and engaging in PhD meetings with the institute management.

From 2020 until 2023, Tanne was on the editorial board of Radio Swammerdam and from 2022 to 2023 she was head editor, supervising the general scope of topics discussed. Radio Swammerdam is a scientific radio show that airs every Sunday morning on Radio Salto, live from the studios in Pakhuis de Zwijger. In her episodes, Tanne aimed to open conversations between different fields working on similar topics, often merging alpha, beta and gamma sciences.

During her master degree and PhD, Tanne developed her photography skills. She combined her technical education at the University of Toronto, University of Arts London and Fotoschool Statief in Utrecht. After completing these courses, she went on to study at Forum Beeldtaal from 2019 to 2024 and will present her graduation project in 2025.

As of march 2024, she is employed as a teacher and mentor at the University of Amsterdam, where she teaches Academic Skills to the first-year bachelor students of Biomedical Sciences. Tanne works as a photographer part-time.

List of publications

Aarts, M. T., Wagner, M., **van der Wal, T.**, van Boxtel, A. L., & van Amerongen, R. (2023). A molecular toolbox to study progesterone receptor signaling. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *28*(1), 24.

Chalmers, S. B., **van der Wal, T.**, Fre, S., & Jonkers, J. (2023). Fourteenth Annual ENBDC Workshop: Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *28*(1), 22.

van der Wal, T., & van Amerongen, R. (2023). Visualizing WNT signaling in mammalian systems. *Wnt Signaling in Development and Disease*, *153*, 61

de Man, S. M., Zwanenburg, G., **van der Wal, T.**, Hink, M. A., & van Amerongen, R. (2021). Quantitative live-cell imaging and computational modeling shed new light on endogenous WNT/CTNNB1 signaling dynamics. *Elife*, *10*.

van der Wal, T., & van Amerongen, R. (2020). Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: A balancing act for β-catenin. *Open Biology*, *10*(12), 200267.

Angulo-Urarte, A., **van der Wal, T.**, & Huveneers, S. (2020). Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1862*(9), 183316.

van der Wal, T., Lambooij, J. P., & van Amerongen, R. (2020). TMEM98 is a negative regulator of FRAT mediated Wnt/ß-catenin signalling. *PloS one*, *15*(1), e0227435.

Acknowledgements

Renée, al sinds mijn tweede studiejaar staat jouw naam op vele van mijn verslagen en projecten. Je nam de rol als mentor van harte aan en adviseerde over vervolgstappen in mijn carrière. Tijdens mijn bachelor stage heb ik gewerkt aan FRAT1/2 en TMEM98. Die eerste twee eiwitten (nu heb ik ze dan toch even genoemd in dit proefschrift) hadden tijdens jouw eigen PhD een bijzondere plek in jouw biologen-hart veroverd. TMEM98 werd dat voor mij en na een extra jaar in het lab leidde dit tot een publicatie. Na het afronden van mijn master mocht ik terugkomen voor mijn PhD, een aanbod dat ik graag aan nam. Dank voor alle wetenschappelijke sparsessies, daar kwamen de beste ideeën uit voort. Ook wil ik je graag bedanken voor de vrijheid die ik kreeg om naast mijn PhD ook mijn fotografie opleiding af te ronden.

Dan mijn co-promotoren, Marten en Marten. **Marten Smidt**, dank dat jij mijn promotor wilde zijn. Ook al spraken we elkaar inhoudelijk verder weinig, de input die je jaarlijks bij mijn voortgangspresentatie leverde heb ik altijd ter harte genomen. Het was fijn om een paar ogen van buitenaf naar het werk te hebben kijken. Je vroeg bij de koffie altijd even hoe het ging en in moeilijke tijden kon ik bij je terecht voor woorden van advies. **Marten Postma**, jij sloot als laatste aan bij mijn promotor-team. Het laatste jaar van mijn PhD hebben we intensief samengewerkt aan de kwantificatie van mijn imaging dataset. Toen ik deze presenteerde op de SILS-seminar, zei jij meteen, “daar is meer uit te halen”. Dat hebben we zeker gedaan! We moesten even leren dezelfde taal te spreken; jij denkt in formules (zoals ik vaak noemde, dat is abracadabra voor mij) en ik toch meer in biologische gevolgen, maar uiteindelijk is er een mooi stuk uit voort gekomen.

Of course I would like to thank my defence committee, **Ronald**, **Jaap**, **Teun**, **Bjorn**, **Micha** & **Madelon** for critically reading my thesis. I am looking forward to discussing the results with you in October. Tevens keken **Stephan** & **Micha** elk jaar mee naar mijn voortgang en de adviezen die uit deze meetings voortkwamen heb ik zeer gewaardeerd. Dank hiervoor.

Een speciaal dankwoord schrijf ik voor mijn paranimfen **Lola** en **Sanne**. Lola, toen we samen op de gang in Tartu college in Toronto kwamen te wonen had ik nooit verwacht dat we elkaar zoveel jaar later nog zo zouden spreken. Maar wat ben ik blij dat ik om samen de kakkerlakken

te trotseren op facebook voorstelde een kamer op dezelfde gang te huren. We hebben onze gezamenlijke routines van een wandelingetje, koffietje, serie en snackje inmiddels volledig onder de knie. De reisjes naar het mooie huize Kalives in Griekenland mogen natuurlijk ook niet ontbreken, ook daar hebben we onze eigen routine. Ik ben blij dat we onze vriendschap door dik en dun voortzetten, in Toronto, op het Rokin, in Amstelfissa of O-town. Sanne (of Dr. Lith zoals jij een week voor mij zult worden), we hebben ontzettend veel steun aan elkaar gehad tijdens dit traject. Eigenlijk startte dit al toen we beiden voor onze master stage naar het buitenland vertrokken. Het is fijn om iemand te hebben die volledig snapt waar je mee zit en vaak vonden we dat in elkaar. Daarnaast is het trouwens fijn om al je "domme vragen" even op whatsapp aan elkaar te kunnen stellen voor je ze hardop zegt (die zullen in mijn whatsapp-archief blijven). We hebben vaak avonden op de bank TV gekeken en even niets gedaan. Nu sluiten we een week na elkaar dit traject af en volgen er hopelijk nog vele meer. Het is bijzonder om met jullie beiden dit avontuur te mogen afsluiten.

Ingeborg, ik heb vaak tegen mensen gezegd dat wij de beste lab-technician ooit hebben en dat meen ik ook echt. Na vier jaar kan ik dat nog steeds met volle overtuiging zeggen. Dank voor de stabiele factor die je voor het lab bent, je kalmte, humor en goedgeplaatste advies op de momenten dat ik het echt nodig had. **Saskia** en **Yorick**, met jullie begon in corona tijden mijn PhD. **Saskia**, bedankt voor de goede collega en buur die je bent geweest en de vele lunch wandelingen tijdens de quarantaineperiode. **Vincent**, ik noem jou hier ook even, ook jij bedankt dat je tijdens de maximaal-3-personen-buiten-tijden ons vergezelde. Zonder onze gezamenlijke AH-bestellingen had ik nooit zoveel vla gegeten (waarvoor dank?). **Yorick**, jij was altijd in voor koffie ("KOFFIE?"), dat was top! Dan **Marleen**, ook al dronk jij geen koffie, we zijn toch goede maatjes geworden op het lab en konden altijd bij elkaar terecht. Het hoogtepunt was natuurlijk onze reis door Japan (*congres bezoek bedoel ik natuurlijk). We eten beiden nog steeds geen silken tofu, maar het was het waard! **Joelle**, ik ben blij dat jij mijn SILS-council stokje over wilde nemen en dat doe je geweldig. **Anoeska**, jij was eigenlijk al weg toen ik startte, maar gelukkig was je slechts naar een ander kantoor op de gang verplaatst. Bedankt voor de vele gezellige borrel en in-jou-deuropening-even-iets-komen-vragen-en-dan-blijven-kletsen momentjes. Dan wil ik nog **Thijs, Anna P.**, **Nika, Katrin**, **Eike**, **Franka**, **Joachim**, **Anna C.** en **Laura** bedanken voor de gezelligheid, taart-momenten en adviezen. In het bijzonder wil ik **Mark** en **Ronald** bedanken voor de goede hulp achter de microscoop.

Ik heb een aantal geweldige stage studenten mogen begeleiden tijdens mijn PhD, waarvan velen ook zijn verschenen als auteur op de hoofdstukken in dit proefschrift. **Femke**, jouw stage begon in de week dat de universiteit sloot door de COVID-19 pandemie, maar we hebben er het beste van gemaakt! Thuis analyseerde jij uiteindelijk een oude dataset van Saskia om te onderzoeken of het membraan wellicht interessante kwantificaties op zou leveren. **Melanie**, samen hebben we uren in de cell-culture en achter de FACS gezeten tijdens de CRISPR-trials. Het was geen gemakkelijk project om stage op te lopen en ik denk dat je meteen alle tegenslagen die bij onderzoek doen horen goed hebt meegemaakt. Wel was het altijd heel gezellig en ik wens je veel succes met je PhD in ethiek! **Britt**, jij werd door Renée en ik samen begeleid, waarbij Ingeborg veel hielp bij de vele stainings die jij uitprobeerde. Je wist je goed (altijd in een gezellige bui) een weg te banen door het experimentele project dat we je gaven om te proberen verschillende junctie componenten aan te kleuren in muizen weefsel. Helaas bleek dit, zoals met veel dingen in de wetenschap, te ambitieus. **Florence**, you were immediately a very independent student with great ideas and contributed a lot to the HAP1 chapter of this thesis. I am glad you found a great PhD position at the AMC and hope you will continue on your path in science, it suits you well. Then came **Aoming** and **Gwendolyn**, who I supervised together with Marten P. to improve the quality of the membrane segmentation. **Aoming**, it was interesting to hear your software engineering view on our biological problems. You often laughed a bit in presentations when I would say I manually analysed something and you would then call this the "Tanne method". Thanks for speeding things up with your code! **Gwendolyn**, you really put in a tremendous amount of work to help finish the chapter about the HAP1 live imaging data. You came in saying you weren't very strong in coding and I hope you agree that you proved yourself wrong. The different types of visualization of the live-cell data that you helped produce really started new discussions about this dataset and shaped our ideas about the increases of CTNNB1 at the membrane compartment.

Dan de neurobiologen, oftewel mijn collectieve adoptieouders. Traditiegetrouw werd ik net als Anoeska destijds opgenomen in jullie sociale netwerk. Dat deden jullie dermate goed dat er vele mensen na drie jaar zeiden "oh I thought you did neurobiology". **Reinofke**, mijn AH-order-borrel en SILS-council maatje, bedankt voor onze vele "rondjes" door de gangen om samen stoom af te blazen. Hopelijk komen er nog veel meer science & cocktails en par hasard momentjes (dat betekent dus per toeval). **Judith**, thanks voor alle kantoorbabbels, ook voor jou is de eindstreep in zicht! **Joost**, **Grace** and all the other neurobiologists thanks for the always amazing christmas drinks and all the chats in your office.

Een andere sociale uitlaatklep vond ik bij de SILS-council. There have been too many members to count in the 4 years that I was active in the council, but from the start **Lisa**, **Longjiao**, **Nienke** & **Emy** were great members to have around and I really enjoyed working together. Inmiddels ben ik gestart binnen het onderwijsteam BMW. Wat werd ik door jullie met open armen ontvangen en ik heb het al vaak gezegd, maar de steun die ik van jullie ontving tijdens die pittige laatste loodjes was erg waardevol. **Laura**, **Jorg**, **Nina**, **Petra**, **Ricardo**, **Saskia**, **Tom**, **Vincent** & **Yara**. Ik kijk erg uit naar een verdere samenwerking en de nieuwe dingen die ik nog binnen jullie team over het onderwijs mag leren!

Dan de laatste belangrijke mensen op Science Park; **Sjeel**, **Tony** en de **koffiebazen**. Bedankt voor de koffie, de praatjes en zelfs de barista lessen toen ik in mijn laatste jaar besloot dat het tijd was voor een machine-upgrade thuis.

We kennen elkaar inmiddels alweer langer dan we willen toegeven, **Paul**, **Rolf** en **Werner** (ofwel de **Bouncy Bois** (spreek uit: Bwas)). Niemand is zo gek om samen een luchtkasteel te huren en midden in mijn tuin te zetten, een oud-Hollandse spelletjes avond te organiseren of een net gedecoreerd gingerbread huis op te blazen met vuurwerk van de HEMA (nee, dat werkt dus niet). Bedankt voor alle gekkigheid, gezelligheid en liefde. Op nog vele jaren meer!

Ook ons PhD pubquiz team (Marieke, **Max**, Werner en Sanne) wil ik even bedanken. Ik vond het super om samen door dit proces heen te gaan en ben blij dat we elkaar sinds onze master zijn blijven updaten. We mogen dan de eindstreep van de pubquiz slechts één keer gehaald hebben (wat een memorabel moment was dat), de eindstreep van de PhD gaan we halen! **Marieke**, jij ook bedankt voor alle leuke concerten waar we heen gaan en de vele uitstapjes naar boulder- en klimhallen waar we altijd sneller aan een drankje zitten om bij te kletsen dan de bedoeling was. **Yara**, uit het OG-bachelor-excellentie-clubje, dank voor alle film, pubquiz en borek-buiten-op-een-bankje-momenten.

Floris, alhoewel ik dat soms vergeet leerden we elkaar kennen in Toronto. Bedankt voor de goede, trouwe vriend die je altijd bent. We kunnen met alles bij elkaar terecht en er is niemand met wie ik naar zulke slechte films ga (maar zelfs dan is het leuk!).

De laatste jaren van mijn PhD hebben ook jullie, **Job** & **Karin**, trouw gevraagd naar de voortgang. Dank voor alle gezellige etentjes! En dan natuurlijk **Ruben**, **Loulou**, **Joram** & **Alexandra**. Dank voor de etentjes, lunches, trips naar Berlijn en Londen en zelfs (op zijn tijd) de wetenschappelijke discussies. Kleine **Tobe**, het zal je nu nog weinig zeggen, maar wat je later ook gaat doen, ik hoop dat je het met het volle enthousiasme doet dat je ons nu al geeft!

Jorim, bedankt voor je altijd kalme en nuchtere invloed. **Papa** en **mama** dank voor alles. Het is moeilijk om in woorden te beschrijven welke rol jullie hebben gespeeld. Mam, ik kon je altijd bellen en trouw vertelde je me “dat het wel goedkwam”. Pap, jouw scherpe blik op zaken zette dingen vaak in perspectief. Ik waardeer de nieuwe relatie die ik met jullie beide heb opgebouwd als volwassene en onze gemeenschappelijke interesses in de fotografie en muziek.

Amos, dank voor alle steun tijdens dit volledige proces. Bedankt voor alles!

“So it goes.”

- Kurt Vonnegut – Slaughterhouse-five