



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

A double-edged sword

Homologous recombination in genome maintenance and cancer treatment

Vriend, L.E.M.

[Link to publication](#)

Creative Commons License (see <https://creativecommons.org/use-remix/cc-licenses/>):

Other

Citation for published version (APA):

Vriend, L. E. M. (2017). *A double-edged sword: Homologous recombination in genome maintenance and cancer treatment*.

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.



ADDENDUM

Nederlandse samenvatting
Curriculum vitae
Portfolio
List of publications
Dankwoord

EEN DUBBELZIJDIG ZWAARD

Homologe recombinatie in DNA onderhoud en kankerbehandeling

Het menselijk lichaam is opgebouwd uit miljarden cellen, welke bijna allemaal DNA bevatten. DNA kan gezien worden als de bibliotheek met alle genetische informatie die nodig is voor de vorming van eiwitten, bouwstenen van cellen die de weefsels en organen vormen. DNA bestaat uit twee om elkaar gedraaide strengen - een dubbele helix - welke in de kern van cellen als een bolletje wol is opgerold. Onze cellen zijn constant blootgesteld aan factoren die het DNA kunnen beschadigen, waaronder schadelijke bijproducten van processen in de cel, maar ook externe factoren zoals chemische stoffen, straling en zonlicht. Cellen zijn uitgerust met specifieke DNA reparatiemechanismen om deze schade te herstellen en de cel te beschermen. Elk reparatiemechanisme is gespecialiseerd in het repareren van een bepaald soort DNA schade. Het minst gevaarlijk zijn de enkelstrengsbreuken (ofwel 'nicks'), omdat de gegevens gemakkelijk op basis van de andere, nog intacte streng gekopieerd kunnen worden. Dit wordt gedaan door het zogeheten enkelstrandbreuk reparatie mechanisme. De meest gevaarlijke vorm van DNA schade is een complete onderbreking van beide strengen ofwel een dubbelstrengsbreuk. Voor deze breuken zijn twee belangrijke reparatie routes beschikbaar, namelijk homologe recombinatie en niet-homologe 'end-joining'. Homologe recombinatie gebruikt tijdens reparatie een identiek stuk DNA, ook wel de homoloog genoemd, om hiervan de informatie te kopiëren. Dit homologe stuk DNA is alleen aanwezig als de cel zich aan het vermenigvuldigen is en het DNA verdubbeld heeft, welke later verdeeld wordt over de twee dochtercellen. Daardoor is tijdens deze 'synthese fase' de reparatie foutloos. Niet-homologe 'end joining' is daarentegen een eenvoudigere route die in feite de twee losse uiteinden van de DNA breuk weer aan elkaar plakt. Hierdoor verlies je vaak kleine fragmenten DNA aan de rand van de breuk en is deze route dus gevoelig voor fouten. Er is ook een zekere overlap tussen deze mechanismen, waardoor bij uitval van één van de mechanismen, de reparatie kan worden overgenomen door de andere.

Toch kan het voorkomen dat DNA niet geheel of correct wordt hersteld, wat leidt tot fouten in het DNA, zoals mutaties en herverdeling van DNA stukken. In de meeste gevallen zal de cel hierdoor dood gaan, maar in uitzonderlijke gevallen kan het de cel een groei voordeel geven wat kan bijdragen aan de ontwikkeling van ziektes zoals kanker. De reparatie van DNA is dus essentieel voor het behouden van de informatie op het DNA en het normaal functioneren van cellen. Helaas beschermen de reparatiemechanismen ook het DNA van kankercellen. Dit is voordelig voor de kankercel, maar nadelig voor het behandelen van kanker. De meeste klassieke behandelingen van kanker, zoals bestraling en chemotherapie, zijn er namelijk op gericht om zoveel mogelijk DNA schade te veroorzaken in kankercellen om deze te elimineren. Het efficiënt herstellen van het DNA beschermt de kankercellen dus tegen de geïnduceerde schade. In deze omstandigheden kan het remmen van de DNA reparatie de werking van kankerbehandelingen sterk verbeteren.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

In **hoofdstuk 1** geven we een korte introductie van DNA en de reparatie hiervan in normale situaties en tijdens de ontwikkeling en behandeling van kanker.

In het eerste deel van dit proefschrift is onderzoek gedaan naar de onderliggende mechanismen van nick reparatie door homologe recombinatie. Dit is een unieke manier van nick reparatie, omdat homologe recombinatie gezien wordt als een klassiek dubbelstrengsbreuk reparatiemechanisme. Daarnaast is bestudeerd of dubbelstrengsbreuk gestimuleerde homologe recombinatie gemeten kan worden in weefsels en organen van muizen.

Nicks kunnen homologe recombinatie activeren

In **hoofdstuk 2** geven we een overzicht van alle beschikbare data over nick-gestimuleerde homologe recombinatie. De eerste modellen laten zien dat nicks betrokken zijn bij het activeren van homologe recombinatie reparatie, maar in latere modellen is aangenomen dat een dubbelstrengsbreuk homologe recombinatie activeerd. Recentere data bevestigen dat nicks inderdaad in staat zijn om homologe recombinatie te activeren. We beschrijven wat er bekend is over dit mechanisme en welke vraagstukken nog onbeantwoord zijn. **Hoofdstuk 3** is een gedetailleerde handleiding voor het induceren van enkel- en dubbelstrengsbreuken in een reporter die homologe recombinatie meet, de DR-GFP reporter. Deze reporter is ingebouwd in cellen en na correcte reparatie van breuken door homologe recombinatie worden ze lichtgevend groen, wat vervolgens op verschillende manieren gemeten kan worden. Een speciaal knip-eiwit (Cas9) kan op specifieke plaatsen in het DNA breuken induceren. Dit eiwit is onderdeel van een oorspronkelijk bacterieel systeem, het CRISPR/CAS systeem, dat is aangepast om DNA te kunnen veranderen in menselijke cellen. Wij en anderen maken nu van dit systeem gebruik om DNA reparatiemechanismen te bestuderen, zoals in **hoofdstuk 4**. In deze studie is het onderzoek gericht op het ontrafelen van nick-geïnduceerde homologe recombinatie. We laten zien dat nicks daadwerkelijk homologe recombinatie kunnen induceren en dat deze niet afhankelijk zijn van belangrijke schade-signalerings eiwitten, zoals het geval is bij dubbelstrengsbreuken. Ook tonen we aan dat een nick niet wordt omgezet in een dubbelstrengsbreuk, omdat er geen competitie is tussen homologe recombinatie en niet-homologe 'end joining'. Als je daarentegen twee nicks vlak bij elkaar aanbrengt in het DNA, elk in een streng, worden deze wel omgezet in een dubbelstrengsbreuk. Echter, competitie tussen de reparatiemechanismen vindt alleen plaats in een bepaalde configuratie van deze nicks, een zogeheten 5'-overhang. Dit onderzoek helpt ons verder te begrijpen welke mechanismen een rol spelen bij nick-geïnduceerde homologe recombinatie.

Dubbelstrengsbreuk homologe recombinatie activiteit vermindert tijdens verouderen

Inmiddels is veel bekend over de dubbelstrengsbreuk homologe recombinatie uit experimenten met gekweekte cellen (*in vitro*), maar zijn we beperkt in onze kennis over homologe recombinatie in complexe organismen (*in vivo*), zoals de mens. Om hier verder inzicht in te krijgen, kunnen we gebruik maken van modelorganismen, zoals de muis. In **hoofdstuk 5** is een recentelijk ontwikkeld muismodel, de iDR-GFP muis, gebruikt om

homologe recombinatie te meten in weefsel en organen. Deze muis heeft in elke cel een kopie van de DR-GFP reporter en een knip-eiwit, dit keer genaamd I-SceI, die specifieke dubbelstrengsbreuken kan maken in de reporter. Onder normale condities is het knip-eiwit uitgeschakeld, maar geef je de muis water en voer met daarin een activator van het knip-eiwit, dan maakt het eiwit DNA breuken (het systeem staat 'aan'). Als reparatie van deze breuken door homologe recombinatie plaatsvindt, worden de cellen lichtgevend groen en dit hebben wij gemeten. Als eerste laten we zien dat homologe recombinatie actief is in weefsels en organen, waaronder de huid, het maag-darmstelsel, botten en klieren, welke allen snel delende cellen bevatten. Vervolgens zijn jonge met oudere (volwassen) muizen vergeleken en is gebleken dat de activiteit van homologe recombinatie drastisch afneemt in de oudere muizen groep. Tot slot is de DNA reparatie capaciteit tijdens de ontwikkeling van kanker onderzocht. Hiervoor hebben we huidkanker als model gekozen in deze muizen. In dit model bleek geen verandering op te treden in homologe recombinatie activiteit in een vroeg stadium van tumorontwikkeling ten opzichte van de gezonde huid. Deze resultaten tonen aan dat de iDR-GFP muis een waardevol model is om onze kennis van homologe recombinatie in complexe organismen te vergroten.

In het tweede deel van dit proefschrift is de focus gericht op het verbeteren van bestaande kanker behandelingen door middel van het lokaal in de tumor verhogen van de temperatuur tot 41-43 °C, ook wel hyperthermie genoemd. Verhoging van de temperatuur inactieveert essentiële eiwitten voor DNA reparatie, waaronder homologe recombinatie. Hierdoor wordt de efficiëntie van de therapie vergroot, omdat kankercellen minder efficiënt de geïnduceerde DNA schade kunnen repareren. Echter, niet alle patiënten zijn even gevoelig voor hyperthermie. Met behulp van specifieke remmers is onderzocht of de effecten van hyperthermie kunnen worden versterkt, zodat kankerpatiënten meer baat kunnen hebben bij deze behandelingsmethode.

Hyperthermie remt DNA reparatie mechanismen

Hoofdstuk 6 geeft een overzicht van de effecten van hyperthermie op DNA reparatiemechanismen en gerelateerde processen, inclusief schade signalering. Het meest bekende voorbeeld is het afbreken van een essentieel eiwit in de homologe recombinatie, genaamd BRCA2. We concluderen echter dat niet een enkele factor is aan te wijzen die ten grondslag ligt aan het effect van hyperthermie, maar dat hyperthermie effect heeft op bijna alle DNA reparatiemechanismen. Deze resultaten tonen aan dat hyperthermie een veelbelovende behandeling is om kankercellen gevoeliger te maken voor DNA schade-inducerende middelen, zoals bestraling en chemotherapeutica.

Het therapeutische effect van hyperthermie verbetert na toevoeging van specifieke remmers

Er zijn verschillende manieren om hyperthermie verder te verbeteren, waarvan er twee zijn beschreven in dit proefschrift. In **hoofdstuk 7** is het effect van een specifieke remmer van een essentieel nick reparatie eiwit, genaamd PARP1, onderzocht. Het idee hierachter is dat wanneer de nicks niet gerepareerd worden, ze kunnen leiden tot gevaarlijke dubbelstrengsbreuken. De reparatie daarvan kan weer door middel van hyperthermie geremd worden, waarmee de schade zich zal ophopen in de cel en dit

leidt tot celdood. In deze studie is het effect van de PARP1 remmer in combinatie met hyperthermie en het chemotherapeutikum cisplatin ('de veroorzaker van de breuken') in baarmoederhalskankercellen. We laten zien dat de PARP1 remmer slechts een minimaal additioneel effect heeft, maar dat het toxische cisplatin in veel lagere dosis kan worden toegediend zonder de effectiviteit van de behandeling te veranderen. Zo kunnen we de schade door bijwerkingen in gezonde weefsels beperken. Hieruit concluderen we dat PARP1 remmers behandeling van baarmoederhalskankerpatiënten kunnen verbeteren. Door het verhogen van de temperatuur raken cellen in een stress situatie, waardoor ze stress-beschermingseiwitten aanmaken. Een voorbeeld hiervan is de familie van hittegevoelige eiwitten ('heat-shock' eiwitten of HSPs). Dit zijn helper eiwitten die voorkomen dat andere eiwitten afgebroken of geïnactiveerd worden, zoals eiwitten die betrokken zijn bij schade reparatie. Het remmen van heat-shock eiwitten lijkt dus een goede alternatieve strategie te zijn om kankercellen gevoeliger te maken voor hyperthermie. In **hoofdstuk 8** worden de effecten van een specifieke remmer van het heat-shock eiwit HSP90 onderzocht. We laten zien dat een korte blootstelling aan de HSP90 remmer genoeg is om baarmoederhalskankercellen gevoeliger te maken voor de combinatie behandeling van hyperthermie en bestraling/chemotherapie. Bovendien heeft de remmer geen effect op cellen die niet door hyperthermie zijn opgewarmd. Deze resultaten suggereren dat we door middel van HSP90 remming hyperthermie behandeling in tumoren kunnen verbeteren zonder noemenswaardige bijwerkingen.

Hyperthermie heeft de potentie om de meest therapie-resistente kankercellen te elimineren

Het komt vaak voor dat kankercellen ongevoelig worden voor antikanker therapieën of dat na een succesvolle behandeling kanker terug keert. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het resistent worden en overleven van specifieke kankercellen in de tumor, de kankerstemcellen. Deze cellen zijn in staat om zich te verschuilen voor het afweersysteem, kunnen leven in een zuurstofarme omgeving en hebben een verhoogde DNA reparatie capaciteit. Dit zijn allemaal eigenschappen die voordelig zijn voor de kankerstemcellen om antikanker therapieën te omzeilen. Het is daarom van groot belang om nieuwe strategieën te ontwikkelen die deze populatie cellen kan bestrijden. In **hoofdstuk 9** wordt hyperthermie als potentiële kandidaat hiervoor bediscussieerd. We beargumenteren dat hyperthermie de genoemde eigenschappen van kankerstemcellen kan remmen waardoor deze weer gevoeliger wordt voor standaardtherapie, zoals bestraling en chemotherapie. Er moet echter nog veel onderzoek verricht worden om deze hypothese te testen.

Samengevat, worden in dit proefschrift twee kanten van homologe recombinitie bestudeerd. Aan de ene kant, het belang van homologe recombinitie in het intact houden van het DNA in cellen en aan de andere kant hoe we deze informatie kunnen gebruiken om de behandeling van kanker te verbeteren.

CURRICULUM VITAE

Lianne Elizabeth Maria Vriend werd geboren op 3 oktober 1987 te Hoorn. Na het behalen van haar VWO diploma Natuur & Gezondheid, startte ze in 2006 met de bachelor Biomedische Wetenschappen aan de Vrije Universiteit (VU) te Amsterdam. Tijdens haar bachelor liep zij een stage op de afdeling Celbiologie en Immunologie van de VU bij de groep van prof. dr. Theunis B.H. Geijtenbeek met de focus op C-type lectin receptor Langerin op de Langerhans cellen. In 2009 haalde zij haar bachelor diploma (Bachelor of Science, B.Sc.) en in hetzelfde jaar begon ze de master Oncology, wederom aan de VU te Amsterdam. Tijdens haar master legde zij de focus op immunologie en oncologie met bijbehorende stages en scriptie. De eerste stage liep zij bij de afdeling Pathologie van het VU Medisch Centrum in de groep van dr. Beatriz Carvalho. Tijdens deze stage bestudeerde zij de betrokkenheid van het 13q amplicon in dikke darm kanker. Voor de daaropvolgende stage vertrok zij eind 2010 naar Boston (USA) om onderzoek te doen naar innate NKT cellen in kanker. Dit deed zij in de groep van dr. Mark A. Exley in het Beth Israel Deaconess Medical Center - Harvard Medical School. De eindschrijving werd geschreven onder leiding van prof. dr. Cornelis J.F. van Noorden op de afdeling Celbiologie en Histologie van het Academisch Medisch Centrum (AMC) Amsterdam en ging over de rol van WEE1 in genoom instabiliteit. In 2012 behaalde ze haar master diploma (*cum laude*, Master of Science, M.Sc.) en vrijwel direct daarna begon ze als onderzoeker in opleiding (OIO of PhD student) bij dezelfde afdeling onder supervisie van dr. Przemek M. Krawczyk en prof. dr. Cornelis J.F. van Noorden. Na enkele maanden ging zij voor anderhalf jaar naar New York (USA) om een deel van haar promotieonderzoek uit te voeren in het lab van dr. Maria Jasin in het Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. De rest van het onderzoek werd in het AMC uitgevoerd en dit proefschrift is het resultaat hiervan.

PORTFOLIO

Name PhD student: Lianne E.M. Vriend
 PhD period: November 2012 - March 2017
 Name PhD promotor: Prof. Dr. C.J.F. van Noorden
 Name PhD co-promotor: Dr. P.M. Krawczyk

International experience	Year	ECTS
Maria Jasin laboratory, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), New York, New York, USA	2013-2014	
Courses		
Master course advanced microscopy (UvA)	2015	0.5
Radiation course (level 5B)	2014	1.5
How to raise external funding?	2013	0.1
Animal experimentation (MSKCC)	2013	0.25
Animal experimentation (UvA-AMC)	2013	3.0
Workshops		
'Pimp my poster' and 'Pimp my thesis lay-out' (APROVE-AMC)	2014-2015	0.1
Conferences and meetings (national and international)		
Weekly department seminars	2012-2017	4.0
1 st Cancer Center Amsterdam (CCA) retreat, Noordwijkerhout, The Netherlands - poster presentation	2017	0.5
Annual Genomic Instability in Cancer meeting, Cancer Genomics, Amsterdam, The Netherlands	2016	0.75
42 nd conference of the European Radiation Research Society, Amsterdam, The Netherlands - poster presentation	2016	1.25
10 th conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, Amsterdam, The Netherlands - poster presentation	2016	1.5
Maintenance of Genomic Instability (Abcam), Panama City, Panama - poster presentation	2016	1.25
European Society of Hyperthermic Oncology (ESHO), Zurich, Switzerland	2015	0.5
DNA repair & genomic instability in a chromatin environment (IMD), Mainz, Germany - poster presentation	2015	1.0
Annual Dutch Society for Radiology (NVvR) meeting, Utrecht The Netherlands - oral presentation	2015	0.5

Dutch Cancer Society - Hyperthermic Group Meeting, Amsterdam, The Netherlands	2014	0.25
Annual graduate student retreat (OOA), Renesse, The Netherlands - oral presentation and chair	2014-2015	2.0
Hyperthermia Meetings, Amsterdam/Rotterdam, The Netherlands	2014-2016	1
Frontiers in Basic Cancer Research (AACR), National Harbor, USA - poster presentation	2013	1.5
Genome Integrity Discussion Group Meetings, New York Academy of Sciences, New York, USA	2013	0.75
A symposium on Genome Integrity, London Research Institute of Cancer Research and MSKCC, New York, USA	2013	0.5
Center for Stem Cell Biology Symposium, MSKCC, New York, USA - poster presentation	2013	0.5
Chromatin & Epigenetics: 'interaction and processes' (Biomed Central), Boston, USA	2013	0.75

Teaching

Lectures on DNA repair and cancer - Human body II, Amsterdam University College	2015-2016	0.25
Lectures on DNA repair and cancer- Cellular Oncology, Biomedical Sciences UvA	2015-2016	0.25
Supervisor Bachelor student, Biomedical Sciences, UvA	2015	2.0
Supervisor Bachelor student, Laboratory Science, Hogeschool Utrecht	2014-2015	2.0

Scholarships

Dutch Cancer Society (KWF) travel grant for Academici	2014-2015	
---	-----------	--

LIST OF PUBLICATIONS

Vriend L.E.M., Kass E.M., Song J., Jasin M., Krawczyk P.M. Homologous recombination is active in a wide range of normal mouse tissues, in early-stage skin tumors and changes with age *in vivo*. *Manuscript in preparation*

Vriend L.E.M.*, Oei A.L.*, L'Acosta M., Van den Tempel N., Kanaar R., Franken N.A.P., Krawczyk P.M. HSP90 inhibitor Ganetespib potentiates the radiosensitizing and chemosensitizing effects of hyperthermia. *Manuscript in preparation*

* equal contribution

Oei A.L., **Vriend L.E.M.**, Krawczyk P.M., Horsman M.R., Crezee J., Franken N.A.P., Targeting therapy-resistant cancer stem cells by hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* (2017)

Vriend L.E.M. and Krawczyk P.M. Nick-initiated homologous recombination: Protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair* (2016)

Oei A.L.*, **Vriend L.E.M.***, Van Leeuwen C.M., Rodermond H.M., Ten Cate R., Westermann A.M., Stalpers L.J.A., Crezee J., Kanaar R., Kok H.P., Krawczyk P.M., Franken N.A.P. Sensitizing thermochemotherapy with a PARP1-inhibitor. *Oncotarget* (2016)

* equal contribution

Vriend L.E.M., Prakash R., Chen C.C., Vanoli F., Cavallo F., Zhang Y., Jasin M., Krawczyk P.M. Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks. *Nucleic Acids Research*. 44 (11), 5204-5217 (2016)

Oei A.L.*, **Vriend L.E.M.***, Crezee J., Franken N.A.P., Krawczyk P.M. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiation Oncology*. 10, 165 (2015)

* equal contribution

Vriend L.E.M., Jasin M., Krawczyk P.M. Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases. *Methods in Enzymology*. 546, 175-191 (2014)

Gringhuis S.I., Kaptein T.M., Wevers B.A., Van der Vlist M., Klaver E.J., Van Die I., **Vriend L.E.M.**, De Jong M.A.W.P., Geijtenbeek T.B.H. Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nature Communications*. 5, 5074 (2014)

De Groen F.L.M., Krijgsman O., Tijssen M., **Vriend L.E.M.**, Ylstra B., Hooijberg E., Meijer G.A., Steenbergen R.D.M., Carvalho B. Gene-dosage dependent overexpression at the 13q amplicon identifies DIS3 as candidate oncogene in colorectal cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 53 (4), 339-348 (2014)

Vriend L.E.M., De Witt Hamer P.C., Van Noorden C.J.F., Würdinger T. Wee1 inhibition and genomic instability in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1836 (2), 227-235 (2013)

Li S.*, **Vriend L.E.M.***, Nasser I.A., Popov Y., Afdhal N.H., Koziel M.J., Schuppan D., Exley M.A., Alatrakchi N. Hepatitis C virus-specific T-cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis. *Hepatology*. 56 (6), 2094-2105 (2012)

* equal contribution

De Jong M.A.W.P., **Vriend L.E.M.**, Theelen B., Taylor M.E., Fluitsma D., Boekhout T., Geijtenbeek T.B.H. C-type lectin Langerin is a β -glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Molecular Immunology*. 47 (6), 1216-1225 (2010)

DANKWOORD

Daar zijn we dan, vier jaar geleden had ik niet kunnen bedenken hoe snel de tijd zou gaan. Het lijkt heel lang, maar aan het einde kom je altijd tijd tekort. Mijn PhD begon met een speciale start in één van de gaafste steden ter wereld, New York. Een ervaring die ik nooit zal vergeten. Vele leuke, lange, intense dagen en maanden later ging ik terug naar de volgende wereldstad, Amsterdam. Nog meer experimenten, meetings en leuke avonturen. En nu kan ik met trots mijn proefschrift aan jullie presenteren.

Dit proefschrift was nooit tot stand gekomen zonder de hulp en steun van veel lieve mensen om mij heen. Hiervan wil ik een paar mensen apart bedanken.

Ten eerste wil ik mijn promotor en copromotor bedanken voor de dagelijkse begeleiding. Ron van Noorden, bedankt dat je mij de kans hebt gegeven om mijn onderzoek binnen de afdeling Celbiologie en Histologie te kunnen verrichten. Zelfs toen ik in New York zat, kwam je zo af en toe langs om een oogje in het zeil te houden. Van samen aan manuscripten sleutelen tot colleges geven, ik heb met veel plezier onder jouw leiding gewerkt en heb van onze samenwerking genoten. Przemek, na de aanbeveling van Ron en ons Skype gesprek durfde jij het aan om mij aan te nemen. Onze eerste ontmoeting was pas toen ik in New York aankwam. Direct vanaf dat moment hebben we bijna altijd samen op het lab gestaan en hebben we onze ups en downs gekend, maar we waren een echt onderzoeksteam. Jouw hoofd zit constant vol met nieuwe ideeën en dit is geweldig voor het onderzoek. Ik heb er dus ook vol vertrouwen in dat de Krawczyk groep groot gaat worden, veel succes. Je hebt mij in de afgelopen jaren in ieder geval enorm veel geleerd, bedankt.

Ik wil de leden van mijn promotiecommissie bedanken voor hun deelname in mijn commissie, voor het verdiepen in mijn onderwerp en voor het beoordelen van mijn proefschrift.

I could not have done part of my research without the kindness of Maria Jasin to welcome me in her group. Maria, thank you for this great opportunity, all the discussions and feedback on my work. I never learned so much in such a short period of time. I want to thank the whole Jasin lab for making my stay unforgettable and with your help my research became a succes. Also, thank you for the great time during holiday parties, drinks and outings. Liz, my lab roommate, I enjoyed our conversations and discussions about everything during our days in the lab. Francesca, next to being a nice colleague in the lab, we became really good friends and we had some great adventures around the world. I hope we will have a lot more in the future.

Jan, toen ik net kwam kijken op de afdeling heb jij mij wegwijs gemaakt in het lab en je hebt mij veel nieuwe technieken geleerd. Je bent een enorm geduldige en goede leraar en ik denk dat ik voor meer mensen kan spreken. Ron, het is niet te tellen hoe vaak ik bij jou ben langs geweest. Regelmatig voor problemen met de microscopen, maar ik had ook veel frustraties door problemen met mijn computer. Jij wist het vaak voor mij op te lossen, bedankt. Jacob, bedankt voor je kritische en waardevolle commentaar op mijn manuscripten. Kuba and Emilie, you both are a great addition to the Krawczyk group, good luck with the future research. Nicole, Anita, Henk en de 'oude' garde, bedankt voor de gezellige lunchmomenten. Daisy, jij stond altijd klaar bij alle bestel- en lab technische problemen, bedankt. Gelukkig konden we er achteraf altijd om lachen. Marcel, altijd even een praatje maken als de baas kwijt was. De 'Oogjes' en Reits groep bedankt voor alle feedback op mijn onderzoek tijdens de werkbesprekingen, deze waren heel waardevol. Mike en Fleur, ik had mij geen betere

studenten kunnen wensen, bedankt voor de bijdrage aan het onderzoek. En natuurlijk wil ik ook de rest van de afdeling bedanken voor alle hulp en gezelligheid.

Przemek en ik zijn ook 'parttime' opgenomen in de LEXOR groep voor o.a. werkbesprekingen. Jan-Paul, bedankt hiervoor, ik heb mij altijd welkom gevoeld en heb veel geleerd. Daarnaast wil ik de hele LEXOR groep bedanken voor de tips en het nuttige commentaar tijdens deze meetings. In het onderzoek zijn goede samenwerkingen onmisbaar. Klaas, Arlene, Bregje, Hans en Roos jullie groep was voor mij als een tweede thuis binnen het AMC. Voor de hyperthermie vragen kwamen wij naar beneden en voor homologe recombinitie vragen kwamen jullie boven, een goede balans. Klaas, wat een ontspannen en straightforward onderzoeker ben je, heerlijk om mee te werken. Treinreises naar Rotterdam hoorden er ook bij. Roland, Nathalie en de Kanaar groep, bedankt voor de kritische kijk op mijn hyperthermie onderzoeken en voor de hulp met de western blots. Barbara en Jurgen, bedankt voor jullie hulp met de kleuringen.

Irene en Venkat, wat een gezelligheid altijd op onze kamer. Vaste thee momentjes, 'treats' en leren van elkaars cultuur. De verrassingsfeestjes voor onze verjaardagen zijn inmiddels een bekend fenomeen op de M3 gangen. Stiekem alles regelen, ballonnen blazen en slingers ophangen, wat zal ik dat missen. Venkat, nu ben ik bijna een echte Dr. Doc. Irene, samen even het lab ontvluchten en ontspannen in de sauna, daar heb ik van genoten. Ivo en Anne-Eva, wat een groot succes waren de CBH-borrels met als hoogtepunt de kerstedities. Het werkoverleg en de 'test' borrel op de locaties was altijd erg gezellig en ik hoop dat we dit kunnen voorzetten. Ook kon ik altijd even bij jullie uitrazen als een experiment was mislukt. Ivo, jij wist mij altijd weer rustig te krijgen. Anne-Eva, ik ben blij dat je straks naast mij staat. Jullie komen nu zelf ook in de buurt van je eigen promotie, succes met de laatste loodjes!

Arlene, jij bent niet alleen collega, maar ook een goede vriendin en niet voor niets mijn paranimf. Samen het promotietraject doorlopen met leuke momenten en ook frustraties, maar je stond altijd klaar om te helpen, bedankt! Straks ga jij het grote avontuur in de USA aan, succes en geniet ervan. Nu eerst nog even samen een groot feest maken van onze promoties!

Tijdens de vier jaar heb ik veel kunnen delen met vrienden en familie, zij hebben mij gesteund als ik er even doorheen zat. Sarah, wat leuk dat wij elkaar weer in New York hebben gevonden, dat maakte mijn tijd daar extra speciaal. Yolanda, Lieke, Maartje, Wina, Marieke en Annemieke, studiemaatjes, we zijn na onze studies ieder een andere kant op gegaan, maar praatten nog veel over onderzoeken. Toch wel fijn om te horen dat ik niet de enige was met af en toe een dipje tijdens het promotietraject. Manon, wat ben ik blij met jou als vriendin. Leonie, Eva, Irene, Ira en Rikkert, ik geniet van jullie gezelligheid, vaak onder genot van goede muziek natuurlijk! Na het weekend kon ik altijd weer met nieuwe energie verder gaan.

Lief nichtje, zonder jouw creativiteit was het boekje nooit zo mooi geworden, bedankt. Wij hebben er heel wat uren ingestoken, maar het resultaat mag er zijn en we kunnen samen trots zijn. Pap, mam, Bianca, Tijmen en Richard, ik weet niet of jullie alles van mijn onderzoek begrepen, maar jullie hebben altijd geïnteresseerd en aandachtig geluisterd. Als ik thuis ben, kom ik altijd weer even tot rust. Mam, je weet mij dan altijd te verwennen, alles te relativieren en zet mij met beide voeten weer op de grond. Pap, jij hebt mij altijd aangemoedigd om te doen wat ik leuk vindt, waar dat ook mocht zijn, dit waardeer ik heel erg.

En nu is het klaar, dit zijn de laatste woorden die ik schrijf. Op naar de volgende uitdaging!