

<http://hdl.handle.net/1765/135291>



**Summary & Conclusions**

**Future Perspectives**

**Nederlandse Samenvatting**

**Curriculum Vitae**

**List of Publications**

**Portfolio**

**Dankwoord**



## SUMMARY AND CONCLUSIONS

Ionizing radiation (IR) can induce a wide array of different types of DNA damage and, in the context of cancer therapy, is used to eradicate tumor cells. The underlying success of DNA damage-inducing radiation treatment is the rationale that tumor cells coordinately respond to DNA damage, thereby inducing a variety of responses that induce cell death or inhibit cellular proliferation. However, cells have evolved tightly controlled DNA damage repair mechanisms that can counteract the DNA damaging effects, possibly leading to radiation resistance. The most harmful type of DNA damage are DNA double-stranded breaks (DSBs) that are repaired in two fundamentally distinct manners, Non-Homologous End Joining (NHEJ) and Homologous Recombination (HR), depending on whether a DNA template is used during the process. More understanding how HR and NHEJ function together in DSBs repair, could assist in the search for possibilities to improve cancer therapy based on IR or counter IR resistance.

In cancer therapy, tumors are mostly treated from outside the body, using external beam radiation therapy (EBRT). However, irradiation of tumors deep within the body that reside next to healthy tissue can lead to toxicity. The development of radiopharmaceutical therapy (RPT) has improved treatment of cancers that are located deep in the body and of metastasized disease. In RPT, radionuclides are attached to delivery vehicles and systemically injected, delivering the radiation directly to the tumor. Internal irradiation provides the possibility to use radiation with a high linear energy transfer (LET), which is not an option for external irradiation due to a low penetration depth. High-LET radiation has a large probability to eradicate tumor cells, due to its potential to inflict a high amount of DSBs to cells in close proximity. However, to deliver the high-LET radiation efficiently and what types of DNA damage are inflicted is not yet fully understood.

This thesis describes; (1) The cooperation of NHEJ and HR in IR protection in mice and cells; (2) the development of a novel high-LET external irradiation device; (3) the differences in DSB processing after high- and low-LET irradiation and (4) polymersome processing after cellular uptake to assess efficient and safe delivery of high-LET radionuclides. In this section, we summarize our main findings and suggest future directions in which our research can continue.

In mammals, the two major DNA double-strand break repair pathways, HR and NHEJ, have overlapping as well as specialized roles. The relative contribution of these two DSB repair pathways can differ depending on mammalian developmental stage (i.e. cell type) and on the specific type of DNA damage. This implicates that the combination of NHEJ and HR regulates the grade of IR protection and further understanding how that combination is balanced could lead to more precise radiation treatment. In **Chapter 2**, we generated mice deficient for RAD54 (HR), DNA-PKcs (NHEJ) and both to investigate how NHEJ and HR cooperate in IR induced DNA damage repair. We found that mice lacking DNA-PKcs, but not RAD54, have elevated and sustained p21 expression after IR, particularly in the gut. In addition, DNA-PKcs appeared to play a

role in 53BP1 foci dissolution in both mouse embryonic stem (mES) cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Furthermore, RAD54 only contributed to IR protection in DNA-PK<sub>cs</sub><sup>-/-</sup> adult mice or in mES cells. This chapter supports the theory that the absence of DNA-PK<sub>cs</sub> leads to an enhanced stress response and HR functions as a backup in IR protection with a larger role in undifferentiated cell types. In addition, we show that the use of p21-reporter mice can detect the consequences of DNA damage repair deficiencies with high sensitivity.

The notion of a balanced role between HR and NHEJ after low-LET IR implicates a similar scenario for high-LET irradiation. Indeed, high-LET irradiation is thought to induce complex DNA damage in which HR, having the requirement of a DNA template, plays a larger role than NHEJ. To investigate whether HR or NHEJ have different impact in DSB repair after high-LET irradiation we first addressed a technical problem: commercially available  $\alpha$ -particle sources are often smaller in diameter than culture dishes, thereby precluding standardized biological experiments, such as quantitative cell colony formation assays. In **Chapter 3**, we report a novel procedure using large field external  $\alpha$ -particle irradiation for standard radiobiological experiments. With the use of this setup, we showed clonogenic survival assays which are reproducible and can be compared with other types of external irradiation. Furthermore, by optimizing the irradiation set-up we add super-resolution microscopy imaging to our toolbox to investigate DNA damage inflicted by  $\alpha$ -particles. In **Chapter 4**, we used the newly developed irradiation setup to compare DSB processing after  $\alpha$ -particle and X-ray irradiation using live-cell imaging. We found that, in contrast to the already initially larger  $\alpha$ -particle-induced 53BP1 foci, X-ray-induced foci increased in 53BP1 protein content and size over time. Moreover,  $\alpha$ -particle irradiation induced 53BP1 foci co-localized with multiple individual RPA foci, indicative for multiple resection events at a single damaged site, which was not observed after X-ray irradiation. In conclusion, our results indicate that the condensed energy deposition pattern of high-LET  $\alpha$ -particles induces closely interspaced DSBs. The abundance of multiple DSBs in close vicinity throughout the cell nucleus leads to 53BP1 protein insufficiency and ineffective DNA end protection.

In practice, irradiation using  $\alpha$ -particles would be internal and not external. Therefore, delivery vehicles (DVs) are designed to specifically deliver the  $\alpha$ -particle emitting radionuclides to the target tumor cells. Delivery of radionuclides to a therapeutic target comes with many challenges, such as target specificity, circulation time. However, with the high energy of  $\alpha$ -particle emitting radionuclides comes another challenge: recoiling daughter radionuclides break free from their DV and can distribute freely in the body, potentially causing harm to healthy tissue. Robust polymersomes (PMs) could provide support, being highly effective in retaining recoiling daughter radionuclides. In **Chapter 5**, we set out to characterize the cellular uptake of PMs. We found that PM uptake is cell type dependent and mitotic cells have increased uptake. In addition, PM uptake is mediated via endocytosis where after post-uptake transportation went via microtubules, eventually leading to lysosomal aggregates. Furthermore, we show that PMs, which carry  $\alpha$ -particle emitting radionuclides, only induce DNA damage to the cell in which they are taken up, as seen in a 2-D cell culture. These findings suggest that PM uptake and process-

ing can vastly differ between cell lines, which could possibly influence DNA damage inducing capabilities. In addition, the assays we report in this chapter provide advanced analysis of PM uptake and processing and should be considered to optimize PMs.

Overall, the studies presented in this thesis show fruitful collaborations between physics, radiology, and biology disciplines in which the basis encompasses: gaining fundamental knowledge of biological processes with the use of technological advances. The novel insights and assays we present could be useful for advancements in clinical treatment or drug development.

### Future perspectives

A better understanding how DSB repair cooperates could enlighten new ideas on how to exploit these processes for clinical benefit. The cell biological effects of high-LET irradiation seem vastly different compared to low-LET irradiation. The rising interest in several high-LET treatment options, such as  $\alpha$ -particle emitters and proton therapy, emphasize the need for better understanding. Therefore, DSB repair deficient mice or cells in combination with the newly developed high-LET irradiation set-up we present here can prove to be a successful combination to determine what processes are activated after high-LET irradiation. More specifically,  $\alpha$ -particle irradiation on DSB repair deficient cells could uncover whether DSBs induced by high-LET irradiation indeed require HR-directed repair or perhaps other pathways that are necessary for repair. In addition, high-LET irradiation inflicts DNA ends that showed resection, even in G1 phases. Other reports show that increasing low-LET irradiation dose leads to 53BP1 exhaustion, which converts limited DNA end resection to hyper-resection, and results in a switch from error-free HR to mutagenic single-strand annealing by Rad52. It would be highly interesting to see whether the reliance on Rad52 also occurs after high-LET irradiation, possibly making Rad52 inhibitors worth to investigate. Moreover, in chapter 4 we show altered DSB processing, possibly caused by perturbed chromatin remodeling. The use of confocal live-cell can provide more spatio-temporal detail on how DSB repair protein cooperate to repair such closely interspaced DSB. Moreover, with the use of super resolution microscopy, the organization of macromolecular protein assemblies could be analyzed, which might provide insight on how chromatin remodeling is regulated after high-LET irradiation. Furthermore, characterized tumor types often have DNA repair defects. Accumulating data demonstrate that DNA repair-defective tumors, in particular those defective in HR, are highly sensitive to DNA-damaging agents. It will be interesting to investigate whether proton radiation can be used to cause enhanced lethality in DSB repair-defective tumors.

On the other hand, for  $\alpha$ -particle emitters to be used as therapy, the radionuclides should be injected systemically for internal irradiation. Current delivery strategies show off targeting towards healthy tissue, which could be highly toxic with the use of  $\alpha$ -particle irradiation. Many delivery vehicle (DV) strategies have bottlenecks for specificity and circulation time, mostly investigated in mice. The assays provided here can be used to evaluate what factors or cell types determine the off-target delivery and provide inexpensive *in vitro* assays for evaluation.

For example, macrophages are thought to play a major role in fast clearing of DVs and high liver or spleen uptake. Testing *in vitro* whether macrophages have enhanced uptake efficiencies compared to other cell types could help to adjust DVs for longer circulation times. In addition, microfluidic devices can mimic the bloodstream to study how DVs leave the bloodstream and enter cells. Furthermore, our assays are based on 2-D cell culture, it would be highly beneficial to apply these techniques to 3-D applications to gain more insight on how DVs are distributed in the target tumors. Overall, to understand how DVs enter target cells or are taken up by macrophages will help to improve specific targeting in (pre-) clinical settings.

To take the next steps in understanding and improving the topics discussed in this thesis, collaboration between the fields of radiology, biology and physics are crucial. Multidisciplinary research stands at the basis of both technological, fundamental, and clinical breakthrough and should be encouraged.







## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Ioniserende straling (IR) kan veel verschillende soorten DNA-schade veroorzaken en wordt in de context van kankertherapie gebruikt om tumorcellen uit te roeien. Het onderliggende succes van DNA-schade-inducerende bestralingsbehandeling is de grondgedachte dat tumorcellen gecoördineerd reageren op DNA-schade, waardoor ze een verscheidenheid aan reacties veroorzaken die celdood induceren of cellulaire proliferatie remmen. Cellen hebben echter streng gecontroleerde herstelmechanismen voor DNA-schade ontwikkeld die de DNA-beschadigende effecten kunnen tegengaan, mogelijk leidend tot stralingsweerstand. De meest schadelijke vorm van DNA-schade vormen de dubbelstrengs DNA-breuken (DSB's) die op twee fundamenteel verschillende manieren worden gerepareerd, non-homologous end joining (NHEJ) en homologe recombinatie (HR), afhankelijk van of een DNA-sjabloon wordt gebruikt tijdens de werkwijze. Meer begrip van de samenwerking tussen HR en NHEJ bij het herstel van DSB's, zou kunnen helpen bij het zoeken naar mogelijkheden om kankertherapie op basis van IR te verbeteren of IR-resistentie tegen te gaan.

Bij kankertherapie worden tumoren meestal van buiten het lichaam behandeld met behulp van externe bestralingstherapie (EBRT). Bestraling van tumoren diep in het lichaam die zich naast gezond weefsel bevinden, kan echter tot toxiciteit leiden. Door de ontwikkeling van radiofarmaceutische therapie (RPT) is de behandeling van kankers diep in het lichaam zijn gelegen en van uitgezaaide ziekten verbeterd. Bij RPT worden radionucliden aan bezorgingsvehikels gehecht en systemisch geïnjecteerd, waardoor de straling rechtstreeks aan de tumor wordt afgegeven. Interne bestraling biedt de mogelijkheid om straling te gebruiken met een hoge lineaire energieoverdracht (LET), wat bij externe bestraling vanwege een lage indringdiepte geen optie is. Hoge-LET-straling heeft een grote kans om tumorcellen uit te roeien, vanwege het potentieel om een grote hoeveelheid DSB's toe te dienen aan cellen in de buurt. Het is echter nog niet helemaal duidelijk hoe de high-LET-straling het meest efficiënt afgeleverd kan worden en welke soorten DNA-schade worden toegebracht.

Dit proefschrift beschrijft; (1) de samenwerking van NHEJ en HR in IR-bescherming bij muizen en cellen; (2) de ontwikkeling van een nieuw extern bestralingsapparaat voor hoge-LET-bestraling; (3) de verschillen in DSB-verwerking na bestraling met hoge en lage LET en (4) polymersome verwerking na cellulaire opname in de zoektocht naar efficiënte en veilige levering van hoog-LET-radionucliden.

In het volgende stuk vatten we onze belangrijkste bevindingen samen en stellen we toekomstige richtingen voor waarin ons onderzoek kan worden voortgezet.

Bij zoogdieren hebben de twee belangrijkste herstelroutes voor dubbelstrengs herstel van DNA, HR en NHEJ, zowel overlappende als gespecialiseerde rollen. De relatieve bijdrage van deze twee DSB-herstelroutes kan verschillen afhankelijk van het ontwikkelingsstadium van zoogdieren (d.w.z. celtype) en van het specifieke type DNA-schade. Dit impliceert dat de combinatie van

NHEJ en HR de graad van IR-bescherming reguleert en een beter begrip van hoe die combinatie in evenwicht is, zou kunnen leiden tot een nauwkeurigere stralingsbehandeling. In **Hoofdstuk 2** hebben we muizen gegenereerd die deficiënt zijn voor RAD54 (HR), DNA-PKcs (NHEJ) en beide om te onderzoeken hoe NHEJ en HR samenwerken bij IR-geïnduceerde DNA-schadeherstel. We ontdekten dat muizen die DNA-PKcs missen, maar niet RAD54, een verhoogde en aanhoudende p21-expressie hebben na IR, vooral in de darm. Bovendien bleek DNA-PKcs een rol te spelen bij het oplossen van 53BP1-foci in zowel muis embryonale stam (mES) cellen als muis embryonale fibroblasten (MEF's). Bovendien droeg RAD54 alleen bij aan IR-bescherming in DNA-PKcs<sup>-/-</sup> volwassen muizen of in mES-cellen. Dit hoofdstuk ondersteunt de theorie dat de afwezigheid van DNA-PKcs leidt tot een verhoogde stressrespons en HR functioneert als back-up in IR-bescherming met een grotere rol in ongedifferentieerde celtypen. Bovendien laten we zien dat het gebruik van p21-reportermuizen de gevolgen van tekortkomingen in het herstel van DNA-schade met hoge gevoeligheid kan detecteren.

De suggestie van een gebalanceerde rol tussen HR en NHEJ na lage-LET-IR impliceert een soortgelijk scenario na hoge-LET-bestraling. Sterker nog, men denkt dat bestraling met een hoge-LET complexe DNA-schade induceert waarbij HR, met de vereiste van een DNA-template, een grotere rol speelt dan NHEJ. Om te onderzoeken of HR of NHEJ een verschillende impact hebben op DSB-reparatie na bestraling met hoge LET, hebben we eerst een technisch probleem aangepakt: commercieel verkrijgbare  $\alpha$ -deeltjesbronnen zijn vaak kleiner in diameter dan kwekschalen, waardoor gestandaardiseerde biologische experimenten, zoals kwantitatieve klonogene overlevingsassays, uitgesloten zijn. In **Hoofdstuk 3** rapporteren we een nieuwe procedure die gebruik maakt van externe bestraling met  $\alpha$ -deeltjes met een groot veld voor standaard radiobiologische experimenten. Met het gebruik van deze opstelling hebben we klonogene overlevingsassays getoond die reproduceerbaar zijn en kunnen worden vergeleken met andere soorten externe bestraling. Door de bestralingsopstelling te optimaliseren, voegen we bovendien superresolutie microscopiebeeldvorming toe aan onze toolbox om DNA-schade veroorzaakt door  $\alpha$ -deeltjes te onderzoeken. In **Hoofdstuk 4** hebben we de nieuw ontwikkelde bestralingsopstelling gebruikt om DSB-verwerking na  $\alpha$ -deeltjes en röntgenbestraling te vergelijken met behulp van live-cell imaging. We ontdekten dat, in tegenstelling tot de reeds aanvankelijk grotere door  $\alpha$ -deeltjes geïnduceerde 53BP1-foci, door röntgenstraling geïnduceerde foci in de loop van de tijd toenamen in 53BP1-eiwitgehalte en -grootte. Bovendien induceerde bestraling van  $\alpha$ -deeltjes 53BP1-foci die co-gelokaliseerd waren met meerdere individuele RPA-foci, wat indicatief is voor meerdere resectiegebeurtenissen op een enkele beschadigde locatie en wat niet werd waargenomen na bestraling met röntgenstraling. Concluderend geven onze resultaten aan dat het gecondenseerde energie-afzettingspatroon van hoog-LET  $\alpha$ -deeltjes DSB's met nauwe tussenruimten induceert. De overvloed aan meerdere DSB's in de directe omgeving van de celkern leidt tot 53BP1-eiwitinsufficiëntie en ineffectieve DNA-eindbescherming.

In de praktijk zou bestraling met  $\alpha$ -deeltjes intern en niet extern zijn. Daarom zijn afleverings-vehikels (DV's) ontworpen om specifiek de  $\alpha$ -deeltjes die radionucliden afgeven aan de doelwit

tumorcellen af te leveren. De levering van radionucliden aan een therapeutisch doel brengt veel uitdagingen met zich mee, zoals de specificiteit van het doel en de circulatietijd. Met de hoge energie van  $\alpha$ -deeltjes die radionucliden uitzenden, komt er echter nog een uitdaging bij: recoiling dochterradianucliden breken los van hun DV en kunnen zich vrij verspreiden in het lichaam, wat mogelijk schadelijk is voor gezond weefsel. Robuuste polymersomes (PM's) zouden ondersteuning kunnen bieden, omdat ze zeer effectief zijn in het vasthouden van recoiling dochterradianucliden. In **Hoofdstuk 5** wilden we de cellulaire opname van PM's karakteriseren. We ontdekten dat PM-opname afhankelijk is van het celtype en dat mitotische cellen een verhoogde opname hebben. Bovendien wordt PM-opname gemedieerd via endocytose, waar na opname het transport via microtubuli ging, wat uiteindelijk leidde tot lysosomale aggregaten. Verder laten we zien dat PM's, die  $\alpha$ -deeltjes emitterende radionucliden dragen, alleen DNA-schade veroorzaken aan de cel waarin ze worden opgenomen, zoals te zien is in een 2-D celweek. Deze bevindingen suggereren dat PM-opname en -verwerking enorm kunnen verschillen tussen cellijnen, wat mogelijk van invloed kan zijn op het vermogen om DNA-schade te induceren. Bovendien bieden de assays die we in dit hoofdstuk rapporteren een geavanceerde analyse van PM-opname en -verwerking en moeten worden overwogen om PMs te optimaliseren.

Over het geheel genomen laten de studies die in dit proefschrift worden gepresenteerd vruchtbare samenwerkingen zien tussen fysica, radiologie en biologie disciplines waarin de basis ligt: het verwerven van fundamentele kennis van biologische processen met behulp van technologische vooruitgang. De nieuwe inzichten en assays die we presenteren, kunnen nuttig zijn voor vorderingen in de klinische behandeling van ziekten of de geneesmiddelenontwikkeling.



## CURRICULUM VITAE

**Full name:** Stefan Johan Roobol  
**Date of Birth:** April 9th 1991  
**Place of Birth:** Rotterdam  
**Nationality:** Dutch

### Research Experience

2019 - present	<b>Post-doc</b> Erasmus Medical Center – Rotterdam, The Netherlands Department of Molecular Genetics and Radiology & Nuclear Medicine ‘Cellular radiation exposure effects of molecular radionuclide therapies’
2015 - 2019	<b>PhD student</b> Erasmus Medical Center – Rotterdam, The Netherlands Department of Molecular Genetics and Radiology & Nuclear Medicine ‘Ionizing Radiation Quality and Dose Effects on DNA Double Strand Break Repair’
2014 - 2015	<b>Second Master research internship</b> Erasmus Medical Center – Rotterdam, The Netherlands Department of Experimental Urology ‘Establishing a multimodality toolbox using a spontaneous prostate cancer liver metastasis model’
2013 - 2014	<b>First master research internship</b> Hubrecht Institute – Utrecht, The Netherlands Group of Jeroen den Hertog ‘Regeneration of the Zebrafish caudal fin and the function of PTP1B’
2013	<b>Bachelor research internship</b> Leiden University – Leiden, The Netherlands Department of Molecular Cell Biology ‘Scavenger receptors: MARCO and Cd36 in Zebrafish and their role in Tuberculosis’

### Education

2015 - 2019	<b>Doctor of Philosophy (PhD)</b> , Medical Genetics Centre (MGC) Erasmus Medical Centre – Rotterdam, The Netherlands
2013 - 2015	<b>Master of Science (MSc)</b> , Animal Biology & Disease Models Leiden University – Leiden, The Netherlands
2010 - 2013	<b>Bachelor of Science (BSc)</b> , Biology Leiden University – Leiden, The Netherlands



## LIST OF PUBLICATIONS

### **Homologous recombination and non-homologous end joining are mutually exclusive in ionizing radiation protection**

*(Manuscript in preparation)*

**Roobol SJ**, Swagemakers S, Ridwan RY, van Heijningen P, Henderson C, Wolf R, Garinis G, Badie C, Kanaar R, van Gent DC, Essers J.

### **Comparison of High- and Low-LET Radiation-Induced DNA Double-Strand Break Processing in Living Cells.**

*(International Journal of Molecular Science, 2020)*

**Roobol SJ**, van den Bent I, van Cappellen WA, Abraham TE, Paul MW, Kanaar R, Houtsmuller AB, van Gent DC, Essers J.

### **Uptake and subcellular distribution of radiolabeled polymersomes for radiotherapy.**

*(Nanotheranostics, 2019)*

**Roobol SJ\***, Hartjes TA\*, Slotman JA, de Kruijff RM, Torrelo G, Abraham TE, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Kanaar R, van Gent DC, Houtsmuller AB, Denkova AG, van Royen ME, Essers J.

*\*Authors contributed equally*

### **Large Field Alpha Irradiation Setup for Radiobiological Experiments.**

*(Methods and Protocols, 2019)*

**Roobol SJ**, Kouwenberg JJM, Denkova AG, Kanaar R, Essers J.

### **Elucidating the Influence of Tumor Presence on the Polymersome Circulation Time in Mice.**

*(Pharmaceutics, 2019)*

de Kruijff RM, Raavé R, Kip A, Molkenboer-Kuening J, **Roobol SJ**, Essers J, Heskamp S, Denkova AG.

### **The CST Complex Mediates End Protection at Double-Strand Breaks and Promotes PARP Inhibitor Sensitivity in BRCA1-Deficient Cells.**

*(Cell Reports, 2018)*

Barazas M, Annunziato S, Pettitt SJ, de Krijger I, Ghezraoui H, **Roobol SJ**, Lutz C, Frankum J, Song FF, Brough R, Evers B, Gogola E, Bhin J, van de Ven M, van Gent DC, Jacobs JLL, Chapman R, Lord CJ, Jonkers J, Rottenberg S.

### **Other publications**

#### **Phagocytosis of mycobacteria by zebrafish macrophages is dependent on the scavenger receptor Marco, a key control factor of pro-inflammatory signalling.**

*(Developmental and Comparative Immunology, 2014)*

Benard EL, **Roobol SJ**, Spaink HP, Meijer AH.





## PHD PORTFOLIO

### Courses

OIC course	3
5B	1
Safely working in the lab	0.5
Genome maintenance and cancer	0.8
Genetics	3
Biomedical writing	3
Special Topics Course: Chromatin Signalling	2
Research Integrity	0.3
Statistics	2

### Workshops

MGC workshop; Dortmund	1
MGC workshop; Leuven(Including organisation as Chair)	3
MGC workshop; Texel	1
NKRV Workshop; Delft	0.25
STW-Workshop; Utrecht	0.25

### Congress presentations

#### Oral

EMIM 2018; San Sebastian	1.5
Radiotherapy Research day	0.25
MGC workshop; Texel	1.5
MGC DDR meeting (Rotterdam)	0.25
EMIM 2019; Glasgow	1.5

#### Posters

MGC workshop (Leuven)	1
ERR meeting Amsterdam	0.5
WMIC 2017 Philadelphia	1
EMIM 2018 San Sebastian	0.25
Imaging on the Move (Radiology & Nuclear Medicine)	0.25

#### Attended

MGC workshop (Dortmund)	0.50
-------------------------	------

CGC Amsterdam	0.25
Egmond aan zee	0.25
Oncode Annual meetings	0.25

## Teaching

### *Courses*

Various Nanobiology courses	0.25
-----------------------------	------

### *Students*

Pim Bresselaar (Nanobiology bachelor student)	1
Carolien & Sabrah (NanoBiology minor students)	0.5
Meltem (Master medical student)	0.25
Stijn de Jong (Avans Hogeschool Bachelor student)	1
Irene van den Bent (Nanobiology bachelor student)	1

<b>Total</b>	<b>34</b>
--------------	-----------





## DANKWOORD

Dit was hem dan, proefschrift afgerond en (eindelijk) dit hoofdstuk afgesloten. In dit deel wil ik iedereen bedanken die mij geholpen heeft om mijn proefschrift compleet te maken. Zonder jullie was dit nooit gebeurd.

Graag wil ik beginnen met mijn copromotoren. Als eerste dr. Essers. Beste **Jeroen**, bedankt dat jij het vertrouwen in mij had om aan deze taak te beginnen. De kennis die je met me deelde en het enthousiasme dat je op mij overbracht van het begin tot aan het einde van dit project waren precies hetgeen wat ik nodig had om mij opgang te helpen en me over de streep te trekken. Daarnaast was het erg verfrissend en (gek genoeg) motiverend om met mijn directe begeleider meermaals per week gewoon slap te ouwehoeren. Onze fiets-tripjes naar Delft, de lange gesprekken over volleybal en nu de wielren-gekte zullen mij zeker bijblijven. Het was natuurlijk niet altijd 'geouwehoer', je liet me ook af en toe meekijken hoe het achter de schermen gaat bij samenwerkingen met bedrijven, wat mijn interesse altijd heeft gehad. Ik zal ook nooit vergeten dat ik meermaals met prangende vragen voor je kantoor stond, maar jij stoom moest afblazen ten aanzien van een totaal ander onderwerp en ik hierdoor met lege handen stond. Vergis je niet; dit zorgde voor zelfstandigheid en gaf mij uiteindelijk veel vertrouwen. Al met al wil ik je bedanken voor een zeer prettige samenwerking, welke ik de komende tijd nog hoop voort te zetten.

Als tweede dr. van Gent. Beste **Dik**, ook jij bedankt voor het vertrouwen. Jouw scherpe inzichten tijdens de werkbesprekingen hebben mijn verschillende projecten naar een hoger niveau getild. Ik heb veel bewondering voor je interpretatie van resultaten en het 'gemak' waarmee je verder filosofeert. Dit gaf bij een aantal projecten en publicaties de doorslag om het af te ronden of om juist de 'missing-link' te vinden. Ook jou wil ik bedanken voor de prettige samenwerking de afgelopen tijd en we gaan elkaar zeker weer zien op het lab.

Dan gaan we over naar mijn promotoren. Als eerste prof. dr. Kanaar. Beste **Roland**, hartelijk dank dat ik in jou groep mijn promotie onderzoek mocht starten. Al in de eerste paar weken wist ik dat ik op mijn plek zat en dat kwam grotendeels door de sfeer die ook jij in stand houdt. Daarnaast was jouw input tijdens de werkbesprekingen precies wat ik af en toe nodig had. Er werd gewoon gezegd waar het op staat, om daarna weer met goede moed verder te kunnen met mijn onderzoek. Het was ontzettend prettig om in de eindsprint van dit proefschrift met een of twee meetings een richting te krijgen waar we naar toe konden werken. Ik hoop dat ik ook de komende 2 jaar weer veel van je mag leren in de volgende stap van mijn carrière.

Als tweede mijn andere promotor, prof. dr. De Jong. Beste **Marion**, ook jij hartelijk dank dat ik mocht beginnen als OIO onder jouw vleugels. We hebben het al een aantal keren tegen elkaar gezegd: het project is anders verlopen dan verwacht. Maar dat dat heeft de interesse in het meedenken met het project zeker niet verminderd. Hoewel mijn project inderdaad steeds iets verder van de (toenmalige) SPECTRIM-groep ging staan, was jouw input tijdens de meetings altijd waardevol. Ik heb er enorm veel bewondering voor hoe jij, ondanks alles, de SPECTRIM-

en nu TRACER-groep laat uitbreiden en naar een hoger niveau tilt. Ik kijk uit naar de komende 2 jaar waarin onze interesses zeker weer dichterbij elkaar zullen komen liggen.

Over naar mijn kleine commissie: Prof. dr. Houtsmuller, Prof. dr. ir. Marteijs en Dr. ir. Denkova. Hartelijk dank voor het accepteren van de taak om mijn proefschrift te beoordelen. Dan mijn grote commissie: Dr. Nonnekens en Dr. Krawczyck. Ook jullie bedankt voor het plaatsnemen in mijn promotiecommissie.

Ik ben ongeveer 3x van lab-bench gewisseld waardoor ik mij eigenlijk in zowel lab 655 (nu 702C) als in lab 663 (nu 702D) thuis voel. De mensen die in deze twee labs hebben gewerkt of eraan gelieerd waren hebben mij enorm geholpen de afgelopen jaren. Of het nu ging om kleine vragen over een antilichaam of grotere vragen over de zin van het leven, altijd was er antwoord en konden de kleinste gesprekken uitmonden in één groot lab vol gezelligheid. De combinatie waarin er zowel serieus gediscussieerd als gerelativeerd kon worden, maakte het lab een tweede thuis. Een werkplek waar ik met veel plezier heen ging en nog steeds ga. Ik denk dat wij boffen met zo'n sfeer, wat alles leuker maakt. Ook als er experimenten tegenzitten of simpelweg geestdodend zijn.

Het opsommen van namen van zo'n grote groep gaat mij waarschijnlijk zeer slecht af; ik vergeet er vast wel één. Dus, aan iedereen die zich aangesproken voelt, mijn dank is groot. Next to the labs of 702C and D, are of course the other conjoining labs of 702. In addition, the groups of the other corridors of the 7<sup>th</sup> floor, which houses all other colleagues of the Molecular Genetics. As I said before in Dutch, summing up names makes me forget some. So, I want to thank all the current and previous colleagues for any fruitful discussion or burning questions I had. Good luck with your careers and future plans.

Dan zijn er een aantal die ik toch even wil noemen, vanwege uiteenlopende redenen.

**Yanto**, zonder jou had ik waarschijnlijk niet in deze positie gekomen. Nu je constant in de bunker bent, hoop ik dat we snel weer wat feestjes kunnen bijwonen. **Kishan**, ons contract overlapte 1 dag. Dat was genoeg! Bedankt voor alle gesprekken op en rond het terras, die hebben zeker geholpen met de laatste loodjes. Grappig dat we nu samen weer een nieuwe fase in gaan, spannend! **Nicole**, als ik ergens een ongezoeten mening over wil hebben ben ik bij jou aan het juiste adres. Naast dat ik als Rotterdammert dit weleens kon gebruiken, bleek het in sommige situaties ook heel waardevol om de juiste beslissing te nemen. **Danny**, het feit dat je mijn paranimf bent zegt denk ik al genoeg. Je bent een maatje geworden op het lab en buiten het lab om. **Thom**, jij bent erbij gekomen en de 3 musketiers waren compleet. De gekkigheid die wij met z'n drieën uithalen hebben mij zeker uit een soort 'schrijf-sleur' gehaald. Daarnaast kan het gesprek binnen 1 seconde wél over iets nuttigs gaan. **Maarten**, bedankt dat je mij in de wereld van microscopie geholpen hebt. Hoe snel en makkelijk jij ingewikkelde microscopen bedient en de data daaruit (kritisch) analyseert is indrukwekkend. Ik hoop met mijn nieuwe projecten nog veel met je samen te werken. **Julie**, jij was degene die mij mijn eerste rondleiding gaf op de afdeling, net voor (of na?) mijn sollicitatiegesprek. We hebben veel jaren in hetzelfde kantoor gezeten en nu heb je mij het vertrouwen gegeven om als postdoc in jouw groep aan

mijn volgende carrière-stap te werken. Bedankt hiervoor! Ik kijk uit naar onze samenwerking de komende tijd en ook nog vele rondjes op de racefiets!

To the TRACER-group. As I said to Marion, my PhD-project gradually parted ways from the TRACER-group and the CIL lab. However, during my presentations or discussions with you, your input was most valued and indeed, changed the way I looked at some results or experiments. For the better of course! Apart from work-related things, the Christmas parties of the past 4 years were legendary which I always will remember. Let's hope in 2021 we can repeat that legendary-ness again. To all of my current and previous colleagues: good luck in finishing your projects. Last year I was, and coming year I will be around much more frequently. I'm looking forward to it!

Zonder de hulp van het OIC had ik dit proefschrift nooit kunnen afmaken. In elk hoofdstuk zijn jullie microscopen aan bod gekomen en daarnaast is jullie input en ervaring van onschatbaar waarde gebleken. **Adriaan**, jouw input tijdens onze knusse meetings in jouw kantoor was zeer waardevol en wees me soms naar totaal onverwachte richtingen. **Thomas en Martin**, ons project met de polymersomes kwam in een stroomversnelling, mede door jullie eerder opgedane kennis. **Johan**, jouw hulp om de polymersomes in beeld te brengen met SIM heeft een hoop diepte aan het paper gegeven. **Gert-Jan**, jouw enthousiasme over de FNTDs en andere objecten die ik in beeld wilde brengen werkte zeer aanstekelijk. **Gert**, zonder jouw voorwerk en hulp bij het analyseren van bewegende 53BP1 foci was het niet gelukt. **Tsion**, zonder jouw hulp waren die bewegende 53BP1 foci nooit goed vastgelegd. Allemaal hartelijk dank!

Over naar Delft, het reactor instituut, de groep van **Antonia**. Bedankt voor de gastvrijheid om daar te komen en experimenten te doen. **Astrid**, onder jouw begeleiding ging het altijd goed en je had de beste ideeën om de experimenten toch uit te voeren. Ik zal de zomermiddag nooit vergeten toen alles op het lab besmet was en ik op slippers naar huis moest. **Guzman**, thank you for always providing us with plenty of polymersomes. Your enthusiasm for good coffee was inspiring! **Robin**, bedankt voor het beantwoorden van al mijn vragen omtrent hoe polymer-somes gelabeld en/of opgenomen worden. Daarnaast zijn jouw data over circulatietijden zeer intrigerend en ben ik benieuwd wat er nog meer uitkomt. **Jasper**, de snelheid van het afronden van jouw proefschrift is ongeëvenaard, ik bleef iets achter. Jouw alpha-stralings apparaat heeft veel losgemaakt bij mij en in mijn onderzoek. Bedankt voor je hulp bij het perfectioneren van dit apparaat en de artikelen die ermee gemoeid zijn.

Aan veel van dit werk hebben ook studenten gewerkt. **Pim, Stijn, Carolien, Sabrah en Irene**, jullie inzet heeft zeker geholpen en het was ook zeer leerzaam voor mij om jullie te begeleiden in de afstudeerstages.

Tussen de experimenten door gingen de **MGC-PhD-studenten** een aantal keren naar een workshop. Naast het wetenschappelijke programma, zal ik de nachten in de verschillende kroegen in Dortmund, Leuven en op Texel nooit vergeten. Dank voor deze weekjes fun.

Ook de steun buiten de werkomgeving heeft bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift. In dit volgende stukje wil ik diegenen bedanken die interesse toonden in wat ik de afgelopen jaren aan het doen was.

Alle vrienden en teamgenoten van **VCN**, hartelijk dank voor de interesse. Maar voornamelijk voor de kans om mijn stoom af te blazen na soms frustrerende en lange dagen of weekenden op het lab. Het steekt mij nog steeds dat ik (deels) door dit proefschrift de opmars van Heren 1 heb moeten missen, die tot in de eredivisie is opgeklommen. Als alles mee zit hoop ik nog veel met volleybal te maken te krijgen de komende tijd, in of buiten het veld.

Daarnaast zijn er ook vrienden naast het volleybal geweest die interesse in mijn onderzoek hebben getoond. Het klinkt misschien gek, maar alleen al de getoonde interesse was steun. Het uitleggen van mijn onderzoek aan iemand die niets tot nauwelijks iets van het onderwerp weet is lastig, maar creëerde voor mij juist hele duidelijke lijnen om het onderzoek voort te zetten. Ook hier heb ik er een aantal in het bijzonder. **René**, ik hoop dat dit boekje je nu wat meer (of minder?) duidelijkheid geeft. **Thomas, Marit, Michael, Eveline, Marcel en Myrthe**, de middagen, avonden of nachten met jullie hebben óók bijgedragen aan dit stuk. Al was het alleen maar om even te klagen of om gewoon heel veel bier te drinken. **Vu luitjes & consorten, fantastic 4 en Long time no see** groepjes, ook jullie bedankt voor het aanhoren van een soms ietwat cryptische beschrijving van mijn werkzaamheden. Boven alles: bedankt voor de gezelligheid! Op naar nog meer jaren.

Naast vrienden is er altijd familie. Ik wil alle leden van de **Roobol, Bouts, en Waasdorp** families hartelijk bedanken voor de interesse. Niet al te lang geleden heb ik nog wat familie erbij gekregen. Ook alle **van Thiel, van der Steene en Kluver** familie wil ik bedanken voor de interesse. Er was altijd wel de vraag: "hoe gaat het met je onderzoek?" En dan kon ik even mijn ei kwijt.

**Oma**, deze mijlpaal pakt u gewoon nog mee hoor. Er komt er dit jaar nog eentje, ook daar bent u bij.

**Pa en ma**, de basis die jullie ons thuis hebben gegeven is van onschatbare waarde. Jullie steun, en af en toe een schop onder mijn hol, heeft er mede voor gezorgd dat ik alles uit mijn opleiding heb willen en kunnen halen. Ik kan denk ik nooit genoeg zeggen hoe dankbaar ik hiervoor ben. Jullie zijn mijn voorbeelden!

**Dennis**, je staat bij de verdediging achter mij als paranimf, maar eigenlijk meer als mijn broer(tje). Onze band is de afgelopen jaren heel sterk geworden waar ik heel veel waarde aan hecht. Ik ben enorm trots op hoe jij je de afgelopen tijd hebt ontwikkeld en kijk uit naar een nóg hechtere band als ome Dennie.

**Bibi, lieve bieb**, bedankt voor je begrip, steun en liefde de afgelopen jaren. Jij hebt gezorgd voor een stabiele basis in ons thuis en liet me zien hoe erg dat nodig was. Hoe leuk ook al die feestjes tussendoor. Ik ben enorm trots op wat we samen in zo'n korte tijd hebben opgebouwd. Hoewel we met onze kat **Ony** al een raddraaier in huis hebben, krijgen we in juni een nieuwe huisgenoot die ons leven op z'n kop zal zetten. Ik kan niet wachten om dit met jou te beleven, ik hou van je!