

VU Research Portal

The contribution of ABC transporters to dendritic cell development and function

van de Ven, R.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van de Ven, R. (2009). *The contribution of ABC transporters to dendritic cell development and function*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, S.I.]. s.n.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Chapter 10

Summary

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden



Chapter 10

Summary

The initiation of an effective immune response depends on the proper development and optimal activation of the primary coordinators of the immune response, the dendritic cells (DC). In an immature state, DC are well equipped to take up and process antigens. Under normal circumstances, antigens taken up by DC will be self antigens, or antigens from harmless bacteria, in which case DC will not become activated and will not activate effector cells of the adaptive immune system, i.e. the T- and B cells. When DC take up foreign, or altered-self antigens in the presence of activating "danger" signals, they will mature which in turn leads to altered expression of chemokine receptors, resulting in subsequent migration to the draining lymph nodes, coinciding with upregulation of co-stimulatory molecules like CD80 and CD86 and increased antigen-presenting capacities. Fully matured DC can prime and activate specific T cells within the lymph nodes. The activated T cells are then prepared to eradicate cells that have become infected or express altered-self antigens. In case of cancer, tumor cells that are not eradicated by the immune system often develop strategies to suppress or "fool" the immune response, e.g. by secretion of suppressive cytokines like VEGF, IL-10, IL-6 and TGF β or by down-regulation of MHC class I molecules or immunogenic tumor antigens. Immunotherapeutic strategies aim to alert and prime the immune system to fight cancer. DC are often used in immunotherapy, as they can present tumor-associated antigens (TAA) and thereby specifically activate TAA-specific T cells both for a rapid killer-response, as well as a memory response. DC-based therapies can consist of vaccination with *in vitro* cultured autologous (from the patient itself) or allogeneic (from a donor or cell line) DC, which are generated to present tumor antigens. Another way is to directly target DC *in vivo* to activate them and to load them with TAA, for instance by targeted therapies using adenoviral vectors. In order to make optimal use of DC for therapy purposes or to improve therapy strategies, it is important to know which factors influence DC development and functions.

ATP-binding cassette (ABC) transporters were first characterized for their role in the generation of chemotherapy-induced multidrug resistance (MDR). Over the years, it has become apparent that these transporters are also involved in protection of vital organs like the kidneys, the brain and the liver from endogenous and exogenous toxic compounds. More recently, ABC transporters were described to be expressed on cells of the immune system and several of them were shown to transport (pro-)inflammatory mediators like prostaglandins and leukotrienes. Chemotherapeutic agents themselves, although highly toxic when administered systemically and leading to immune ablation, were also found to act immunostimulatory when applied locally at lower doses.

For this thesis we had three main aims:

- i) Clarify the role(s) of ABC transporters in DC physiology and function.
- ii) Help delineate effects of cytotoxic drugs on DC and immune functions.
- iii) Provide clues for augmenting DC functions in immuno-suppressed cancer patients.

Chapter 1 gives an introduction of the immune system and the role of DC therein, the use of DC for immunotherapy, the role of ABC transporters in chemotherapy resistance, their drug- and physiological substrates and their expression patterns on immune cells.

In **chapter 2** the importance of P-gp (ABCB1) and MRP1 (ABCC1) activity for the differentiation of DC precursor cells into functional immature DC is described. Whereas inhibition of P-gp activity had no effect on DC differentiation, inhibition of MRP1 activity during DC differentiation from blood monocytes or during interstitial DC (IDC) and Langerhans cell (LC) differentiation from MUTZ3 progenitor cells led to poor differentiation. This block

Summary

in DC differentiation was revealed by reduced expression levels of typical immature DC/LC markers like CD1a, CD1c, Langerin, but also co-stimulatory markers like CD86 and CD40 and the antigen-presenting molecule MHC II. In addition, MRP1-inhibited DC secreted lower levels of the pro-inflammatory cytokine IL-12 and MRP1-inhibited MUTZ3-LC displayed a reduced capacity to stimulate T cell proliferation. Beside that, we observed co-localization of MRP1 and the DC marker CD1a on *in vitro* cultured DC and found that the lipid CD1a ligands sulfatide and ganglioside GM1 could be transported by MRP1. As these newly identified MRP1 substrates and the previously identified leukotriene (LT) substrates LTC₄ and LTD₄ were not able to restore DC differentiation in the presence of MRP1 inhibition, the MRP1 substrate(s) required for efficient DC differentiation remains to be identified. Based on these data we conclude that active MRP1 is important for optimal differentiation of DC.

In **chapter 3** we report that human skin LC and IDC, as well as CD34⁺ DC precursors from the blood, express BCRP (ABCG2) and that introduction of functional BCRP in MUTZ3 progenitor cells leads to faster differentiation kinetics and improved differentiation. Beside the acceleration of differentiation, which was confirmed on the signal transduction level by increased early RelB expression, a skewing towards a LC phenotype was observed. Even in the presence of the IDC-inducing cytokine IL-4 in the culture medium, these cells developed into cells with typical LC characteristics like CD1a^{hi} and Langerin expression. The emergence of these LC-markers appeared independent of Notch receptor signaling and was dependent on endogenously produced TGFβ. In conclusion, induction or introduction of BCRP in CD34⁺ DC precursor cells could be a means to accelerate and enhance LC differentiation.

Since ABC transporters are known to transport cytostatic drugs, we looked whether the prominent drug-substrates mitoxantrone and doxorubicin (which are both cytostatic anthraquinone-derivatives) could somehow influence DC development. In **chapter 4** we studied the effects of mitoxantrone and doxorubicin on DC differentiation. While performing a cytotoxicity assay on MUTZ3 progenitor cells, we observed changes in cell morphology. Phenotypic analysis revealed that upon high-dose drug administration the cells started to differentiate into LC-like cells. Addition of these cytostatic anthraquinone-derivatives to MUTZ3-IDC or –LC cultures revealed a stimulatory effect on differentiation. Optimization of the culture protocol (focusing on mitoxantrone) provided us with mitox-DC which could be cultured into phenotypically mature IDC within 3-4 days, whereas conventionally cultured IDC take 7-9 days to develop. The mitox-DC were as capable as the day 7-9 control DC in migrating towards the lymph node homing chemokines CCL19 and CCL21, stimulating T cell proliferation and priming functional, TAA-specific CTL. We conclude that this new culture method, based on the adjuvant effect of low-dose mitoxantrone (or related drugs), could be a time- and cost-effective way to culture functional mature DC for therapeutic purposes.

In **chapter 5** we aimed to examine whether drug-selection of DC precursor cells (MUTZ3) with the ABC-transporter substrate doxorubicin would result in induced ABC transporter expression and subsequent effects on DC development. Though no changes in ABC transporter protein levels were detected, long-term doxorubicin exposure of MUTZ3 cells, transduced with the active domain of human telomerase in order to increase their lifespan (hTERT-MUTZ3), negatively affected the capacity of these cells to differentiate into LC. Dox-selected hTERT-MUTZ3 cells rapidly and completely lost the ability to differentiate. Fortunately, by deprivation of the selection drug for 3 months, the DC-differentiation capacity of the cells was restored. Dox-selection resulted in loss of expression of the stem cell factor receptor (SCF-R) on CD34⁺ DC precursor cells. SCF-R expression returned upon removal of the drug, coinciding with the regained capacity of the cells to differentiate to DC. These data warn against immune suppression caused by insufficiently long cytostatic drug-free intervals, as specific DC

Chapter 10

precursors may need time to recover from protracted chemotherapy treatment and re-emerge among the circulating CD34⁺ haematopoietic stem and precursor cells.

It had previously been reported that the ABC transporters P-gp and MRP1 play a role in DC migration. In **chapter 6** we demonstrate that MRP4 (ABCC4) is required for human DC migration. MRP4 expression was observed in human skin LC and IDC. Intradermal injection of the MRP4 antagonist sildenafil resulted in reduced skin DC migration. To confirm the MRP4 dependence of this migration, MUTZ3 progenitor cells were stably transduced with a short-hairpin RNA (shRNA) construct against MRP4, reducing MRP4 mRNA and protein expression. LC cultured from these MUTZ3-shMRP4 cells displayed reduced migration toward the lymph node-homing chemokines CCL19 and CCL21. In addition, intradermal administration of a DC-targeted adenovirus encoding shMRP4, led to a significant reduction in numbers of skin-emigrating DC, confirming a role for MRP4 in human DC migration.

In **chapter 7** we studied whether MRP4, which we found to be involved in human DC migration (chapter 6), was also important for the migration of murine DC and consequently for the initiation of immune responses in mice. Mrp4 expression levels were very low in murine skin and no difference was observed in DC migration from ear-skin of FVBwt mice or Mrp4 knockout mice. In addition, no altered immunological parameters or alterations in the induction of an immune response upon immunization were found between FVBwt and Mrp4 knockout or Mrp4/Mrp5 double knockout mice. We thus conclude that, unlike in man, there is no role for Mrp4 in DC migration in mice. This is inline with earlier reports on differences between ABC transporter expression and functions between these species.

Our observations that ABC transporters can regulate DC development (MRP1 and BCRP) and functions (MRP4) would suggest that increasing the expression of these transporters on DC precursor cells or DC could result in enhanced DC functionality. In **chapter 8** we aimed to identify a suitable, DC-specific targeted vector for DC-based immunotherapy, e.g. for the delivery of ABC transporter(-modulating) genes. Comparative analysis with different fiber-modified adenoviruses (Ad) showed that Ad5/3 selectively transduced mature human DC with high efficiency, whereas Ad5.RGD selectively enhanced transduction efficiency of immature cells as compared to wtAd5. Whereas Ad5.RGD did not prove to be more efficient in transducing human skin DC than the commonly used wtAd5, Ad5/3 *did* prove to be more efficient. Ad5/3 was shown to target human skin DC via CD80 and CD86, without compromising their T cell-stimulatory capacity. In skin single cell suspensions Ad5/3 was more specific than the previously identified DC-targeting vector Ad5/35, as it transduced less bystander cells. Also in human lymph node (LN) suspensions Ad5/3 specifically targeted mature DC subsets with high expression of the co-stimulatory markers CD80 and CD86. In conclusion, Ad5/3 is a suitable candidate for targeting mature human skin and LN DC for immunotherapeutic strategies. It could thus potentially be used to target MRP4-encoding genes to maturing DC, thereby putatively enhancing their migratory capacity.

In **chapter 9**, we discuss the importance of ABC transporters for the physiology of human DC. The consequences and implications of these observations for the treatment of cancer are discussed. Inhibition of ABC transporters to overcome multidrug resistance of tumor cells may negatively influence the potency of an anti-tumor immune response as well as render patients more susceptible for infections due to the negative effects this can have on the cells of the immune system. On the other hand, increasing ABC transporters expression on DC precursor cells or DC, e.g. through adenoviral transduction, could enhance DC development and functionality *in vivo*. This could be a new strategy to promote a pro-inflammatory anti-cancer response (since most physiological ABC

Summary

transporter substrates are pro-inflammatory) and in addition make these cells less susceptible for chemotherapy-induced cell death (as their presence on DC would allow the export of cytostatic drugs from the DC). The unraveling of the roles of ABC transporters on DC has been the first step in the direction of employing these transporters and their physiological functions to improve immunity. The next step would be to see whether increasing their expression levels on DC will actually augment DC functionality and thereby the effectiveness of the immune system against tumor cells.

Chapter 10

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

Achtergrond

Het immuunsysteem beschermt ons tegen gevaarlijke virussen en bacteriën en is in staat om bedreigende veranderingen in het lichaam te detecteren. Er zijn twee soorten afweerreacties; een snelle antigeen onafhankelijke respons en een trager op gang komende, maar langduriger beschermende, antigeen specifieke respons. Een antigeen is een molecuul dat herkend kan worden door het immuunsysteem en een afweerreactie kan opwekken. Een effectieve immunerespons is sterk afhankelijk van de ontwikkeling en optimale activering van zogenaamde antigeen presenterende cellen, met name de dendritische cellen (DC). DC staan bekend als de dirigenten van de afweerrespons. Er zijn een aantal verschillende soorten DC en wij hebben onderzoek gedaan naar de Langerhans cellen (LC), die voorkomen in de opperhuid, en de dermale DC, die voorkomen in de lederhuid. (zie figuur 2 van de introductie). Een DC ontstaat uit een voorloper cel onder invloed van verschillende groeifactoren; deze ontwikkeling wordt differentiatie genoemd (zie figuren 1 en 3 van de introductie). Deze groeifactoren, ook wel cytokines genoemd, worden door verscheidene lichaamscellen gemaakt en uitgescheiden en kunnen in het lichaam zelf de circulerende voorlopercellen stimuleren tot LC of dermale DC differentiatie. In het lab kunnen we deze differentiatie nabootsen. Als voorlopercellen gebruikten wij voor onze studies cellen geïsoleerd uit bloed (CD14⁺ monocyten en CD34⁺ voorloper cellen) en de CD34⁺ MUTZ3 DC cellijn¹.

Onder normale omstandigheden zijn de DC in het lichaam in een immatuur ('onvolwassen') stadium aanwezig. De primaire functie van immature DC is het opnemen van antigenen uit de omgeving en deze verder verwerken voor presentatie aan andere afweercellen. Een immature DC is slecht in staat om een afweerreactie in gang te zetten. In een gezond lichaam is dit geen probleem, omdat in dit geval de antigenen die opgenomen worden door immature DC lichaamseigen antigenen zijn of antigenen afkomstig van onschadelijke bacteriën en tegen geen van beide is een afweerreactie gewenst. Gebeurt dit wel, dan kunnen autoimmuunziekten zoals reumatoïde artritis optreden. Indien er geen gevaren (b.v. bacteriële of virale infecties) in ons lichaam aanwezig zijn, hoeft het immuunsysteem dus niet gealarmeerd te worden, maar bij infecties of kanker moet dit juist wèl.

Indien schadelijke virussen of bacteriën aanwezig zijn, zullen de DC zogenaamde 'gevaarsignalen' ontvangen. Het contact tussen het virus/de bacterie en de DC zorgt ervoor dat er in de DC processen gestart worden die ertoe leiden dat de DC geactiveerd raken. Dit geactiveerd raken heet ook wel maturatie en leidt tot mature ('volwassen') DC. Ook bepaalde cytokines die door lichaamscellen uitgescheiden worden als reactie op een infectie kunnen de DC activeren. Tijdens DC maturatie verandert de mate van aanwezigheid (expressie) van verschillende oppervlaktemoleculen en zullen de DC zich verplaatsen (migreren) naar de lymfeklieren. Hier komen ze in contact met de uitvoerende (effector) cellen van het immuunsysteem, de T- en B-cellen. Volledig mature DC zijn perfect in staat om T cellen te activeren. De geactiveerde T cellen zullen gaan delen en uitrijpen en zijn dan in staat om virusgeïnfecteerde cellen of gemuteerde tumorcellen aan de hand van specifieke antigenen te herkennen en te elimineren. Sommige tumorcellen zijn in staat om te ontsnappen aan het immuunsysteem en muteren/veranderen dan vaak nog verder en worden zo minder immunogeen. Dat wil zeggen dat ze allerlei strategieën ontwikkelen om niet door de immuuncellen herkend te worden.

¹Verskillende celtypes hebben verschillende moleculen (waaronder verschillende zgn. Cluster of Differentiation (CD)-moleculen) op hun oppervlakte, waardoor ze van elkaar te onderscheiden zijn. Deze moleculen worden ook wel 'markers' genoemd; CD14 en CD34 zijn hier voorbeelden van.

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

Immuuntherapie wordt toegepast om het immuunsysteem wakker te schudden om (opnieuw) tumorcellen te herkennen en te elimineren. DC zijn ideaal voor immuuntherapie, omdat ze perfect in staat zijn om tumorantigenen te presenteren en tumor antigeenspecifieke T cellen te stimuleren tot zowel een snelle antitumor respons als een geheugenrespons. Therapieën die gebaseerd zijn op de werking van DC, kunnen gebruik maken van in het lab gekweekte (*in vitro*) DC uit voorlopercellen van de patiënt zelf of uit voorlopercellen van een donor of cellijn. Deze DC kunnen dan gebruikt worden om tumorspecifieke antigenen te presenteren. Een andere manier is het doelgericht activeren van DC in het lichaam (*in vivo*), bijvoorbeeld met antilichamen en/of onschadelijk gemaakte virussen die de genetische code voor een geselecteerd tumorantigeen in zich dragen. Om optimaal gebruik te maken van DC voor deze immuuntherapeutische strategieën, is het belangrijk om te weten welke factoren en welke eiwitten de ontwikkeling en het functioneren van DC kunnen beïnvloeden.

In dit proefschrift hebben we onderzocht of een bepaalde groep eiwitten, de zogenaamde "ATP-bindende cassette transporter" eiwitten (ABC transporters) aanwezig zijn tijdens de verschillende ontwikkelingsstadia van de DC en of deze een rol spelen in de ontwikkeling en het functioneren van DC. ABC transporters zijn pompen op het celmembraan (zie figuur 4 van de introductie) die in staat zijn om allerlei stoffen (substraten) die in de cel geproduceerd worden uit de cel te pompen. Deze transporters behoren tot een grote familie van membraaneiwitten die met behulp van de energie die vrij komt door omzetting van de cellulaire "brandstof" ATP (adenosine trifosfaat) hun substraten kunnen verpompen. De meest bekende leden van deze familie zijn P-glycoproteïne (P-gp), de multidrug resistentie proteïnen (MRPs) en het borstkanker resistentie proteïne (BCRP). De ABC transporters zijn in eerste instantie bekend geworden door hun rol in het veroorzaken van resistentie van tumorcellen tegen drugs die gebruikt worden tijdens chemotherapie behandelingen, een fenomeen dat bekend staat als multidrug resistentie (MDR). Het bleek dat ABC transporters in staat zijn om meerdere, vaak verschillende, drugs uit tumorcellen te pompen, waardoor de chemotherapie niet effectief is. Door de jaren heen is gebleken dat deze transporters ook een functie hebben in belangrijke processen in het lichaam; met name het beschermen van allerlei organen zoals de nieren, de hersenen en de lever tegen giftige stoffen. Wat minder lang bekend is, is dat ABC transporters ook aanwezig zijn op cellen van het immuunsysteem en dat ze in staat zijn om stoffen die belangrijk zijn voor de afweerreactie te verpompen. Deze ABC transporters zouden dus belangrijk kunnen zijn voor het ontwikkelen van een effectieve (antitumor) immuunrespons.

Om multidrug resistentie van tumorcellen tegen te gaan, worden er therapieën ontwikkeld waarbij tijdens het geven van chemotherapie de werking van de ABC transporters stilgelegd kan worden. Het idee hierachter is dat de transporters dan geen drugs meer uit de tumorcellen kunnen pompen en dat daardoor de drugs hun werk wel goed kunnen doen en de tumorcellen kunnen vernietigen. Tot op heden kunnen zulke strategieën echter nog niet specifiek op de tumorcellen gericht zijn en zal dus op meerdere plaatsen in het lichaam de werking van de ABC transporters worden stilgelegd. Indien ABC transporters een rol spelen in de ontwikkeling en het functioneren van DC, zal het blokkeren van de activiteit van de transporters dus ook gevolgen kunnen hebben voor de DC ontwikkeling en daarmee op het gehele verloop van een immuunrespons. Vanuit dit oogpunt is het daarom belangrijk te onderzoeken of ABC transporters aanwezig zijn op DC en zo ja, of hun aanwezigheid ook gevolgen heeft voor de ontwikkeling of het functioneren van DC.

Naast de rol van ABC transporters tijdens DC ontwikkeling, hebben we bestudeerd of verschillende drugs, die gebruikt worden bij chemotherapie (zogenaamde cytostatica), de ontwikkeling van DC kunnen beïnvloeden. Deze drugs zijn in het algemeen toxisch voor het lichaam en ook voor het immuunsysteem. Enkele studies hebben echter laten zien dat lokale toediening van een lage dosis van deze drugs het immuunsysteem (en mogelijk ook DC) juist kan activeren.

Chapter 10

Bij het onderzoek beschreven in dit proefschrift hadden we drie hoofddoelstellingen:

- i) Ophelderen of ABC transporters een rol spelen in de ontwikkeling en het functioneren van DC.
- ii) Onderzoeken welke effecten cytostatica kunnen hebben op de ontwikkeling en het functioneren van DC.
- iii) Aanwijzingen vinden hoe we d.m.v. cytostatica en/of het veranderen van de aanwezigheid van ABC transporters het functioneren van DC kunnen verbeteren in kankerpatiënten met een onderdrukt immuunsysteem.

Resultaten

Het onderzoek heeft aangetoond dat verschillende leden van de ABC transporter familie aanwezig zijn op DC gekweekt uit voorlopercellen uit bloed, op DC gekweekt uit de MUTZ3 DC cellijn en op DC die aanwezig zijn in de humane huid (**hoofdstukken 2, 3, 6 en 9**). De aanwezigheid van deze transporters op DC zou dus kunnen betekenen dat ze ook fysiologische functies hebben. De mogelijke functies van multidrug resistentie proteïne 1 (MRP1) (**hoofdstuk 2**), borstkanker resistentie proteïne (BCRP) (**hoofdstuk 3**) en multidrug resistentie proteïne 4 (MRP4) (**hoofdstuk 6 en 7**) zijn onderzocht.

Door de activiteit van de ABC transporter MRP1 stil te leggen tijdens het differentiatieproces van voorlopercellen naar immature DC, bleek dat deze transporter actief moet zijn voor een optimale ontwikkeling van de DC (**hoofdstuk 2**). In de afwezigheid van actief MRP1, bleven de DC in een onderontwikkeld stadium en waren niet in staat om T cellen te activeren. Actief MRP1 is dus belangrijk voor een goede DC ontwikkeling en daarmee voor een efficiënte immuunrespons.

Onze studies toonden aan dat ABC transporter BCRP aanwezig is in DC in de huid. De data in **hoofdstuk 3** laten zien dat een geïnduceerde, verhoogde aanwezigheid van BCRP in DC voorlopercellen er toe leidt dat deze cellen zich sneller kunnen ontwikkelen in Langerhans cellen. Het verhogen van BCRP expressie in DC voorlopercellen zou dus een manier kunnen zijn om een snelle ontwikkeling van LC te bevorderen, wat een verbeterde immuunrespons als gevolg zou kunnen hebben.

In eerdere studies was aangetoond dat de ABC transporters P-glycoproteïne en MRP1 nodig zijn voor de migratie van DC van de huid naar de lymfeklieren. In **hoofdstuk 6** tonen we aan dat DC ook MRP4 nodig hebben om goed te kunnen migreren. In humane huid zorgden het stilleggen van de MRP4 activiteit of het specifiek verlagen van de expressie van MRP4 in huid-DC ervoor dat er minder DC uit de huid migreerden. Eenzelfde blokkade in migratie werd gezien met MUTZ3-LC waarin de aanwezigheid van MRP4 was verlaagd. Aangezien DC naar de lymfeklieren moeten migreren om daar antigeenspecifieke T cellen te activeren, kan het stilleggen van de MRP4 activiteit dus een negatief effect hebben op de algehele immuunrespons. In **hoofdstuk 7** hebben we bestudeerd of MRP4 ook in muizen belangrijk is voor DC migratie en de ontwikkeling van een goede immuunrespons. Indien dit het geval zou zijn, zouden muizen namelijk een goed model zijn om verder onderzoek te doen naar het belang van MRP4 voor de immuunrespons. Om dit te onderzoeken hebben we wildtype muizen en MRP4 knock-out muizen vergeleken. In MRP4 knock-out muizen is het MRP4 eiwit kunstmatig verwijderd. In tegenstelling tot de humane situatie, waar MRP4 belangrijk was voor DC migratie, bleek de afwezigheid van MRP4 in muizen geen effect te hebben op DC migratie of de ontwikkeling van een immuunrespons. Deze resultaten geven aan dat verschillende ABC transporters mogelijk andere functies hebben in verschillende organismen.

Het tweede hoofddoel van dit proefschrift was onderzoeken welke effecten drugs die gebruikt worden tijdens chemotherapie (de cytostica) kunnen hebben op de ontwikkeling van DC. Aangezien het bekend is dat ABC

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

transporters in staat zijn om cytostatica te verpompen, hebben we getest of twee belangrijke drugssubstraten, mitoxantrone en doxorubicin, de ontwikkeling van DC zouden kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** zijn de korte termijn effecten van mitoxantrone en doxorubicin op de differentiatie van DC bestudeerd. Tijdens een toxiciteitsexperiment (om de gevoeligheid van de MUTZ3 DC cellijn voor deze drugs te bestuderen) viel het ons op dat de cellen van vorm veranderden. Eenmalige toevoeging van de drugs tijdens differentiatie in combinatie met DC-groefactoren, gaf een versnelde differentiatie. Aangezien voor de ontwikkeling van DC-vaccins het belangrijk is dat er in zo kort mogelijke tijd en met zo laag mogelijke kosten een optimaal vaccin geproduceerd kan worden, is een kweekmethode geoptimaliseerd waarbij in 3-4 dagen functioneel actieve, mature DC gekweekt kunnen worden met behulp van een lage dosering (2nM) drugs (in dit geval mitoxantrone). Onder normale omstandigheden (met alleen groeifactoren) duurt een DC differentiatie in het lab 7-9 dagen. Deze mitox-DC zijn getest op hun vermogen om te migreren, om T cellen tot deling aan te zetten en om tumor antigeenspecifieke T cellen te activeren en bleken over alle eigenschappen te beschikken die essentieel zijn voor effectieve antikanker vaccinatie.

In **hoofdstuk 5** was het doel om te bestuderen of langdurige selectie van DC voorlopercellen (in dit geval MUTZ3 cellen) met de drug doxorubicin ertoe zou leiden dat de cellen een hogere expressie van ABC transporters vertoonden, met eventueel veranderingen in DC ontwikkeling als gevolg. Hoewel geen verhoging van de ABC transporter expressie niveaus werd gevonden, bleek dat langdurige aanwezigheid van cytostatica een nadelig effect had op de DC voorlopercellen. De capaciteit om tot DC te differentiëren verminderde. Echter, het verwijderen van de drug zorgde ervoor dat de cellen weer bijna volledig herstelden in hun capaciteit om tot DC te differentiëren. De resultaten van deze studie wijzen op een mogelijk negatief effect van chronische, langdurige behandeling met cytostatica op DC ontwikkeling. Dit kan ertoe leiden dat patiënten vatbaarder worden voor mogelijke infecties en minder goed reageren op immuuntherapie.

Onze bevindingen dat ABC transporters de ontwikkeling van DC (MRP1 en BCRP) en het functioneren van DC (MRP4) kunnen beïnvloeden, suggereren dat verhoging van de expressie van ABC transporters op DC voorlopercellen of DC ertoe zou kunnen leiden dat de cellen beter functioneren en mogelijk beter in staat zouden kunnen zijn om een goede immuunrespons in gang te zetten. Om deze hypothesen in de toekomst te kunnen testen, is het nuttig om een manier te vinden waarop de expressie van ABC transporters op DC specifiek gereguleerd zou kunnen worden. Immunologen zijn dan ook voortdurend op zoek naar zogenaamde vectoren met genetische informatie die in het lichaam, gericht naar specifieke cellen gestuurd kunnen worden, om de effectiviteit van het immuunsysteem te bevorderen. In **hoofdstuk 8** was het doel om een geschikte DC-specifieke vector te identificeren die gebruikt zou kunnen worden voor DC-gerichte immuuntherapieën in de huid. Uit deze studie kwam naar voren dat het adenovirus Ad5/3 (een onschuldig verkoudheidsvirus dat genetisch veranderd is zodat het niet meer kan delen), zowel in de humane huid als in celsuspensies gemaakt van lymfeklieren, specifiek en efficiënt mature DC kon infecteren. Na infectie met Ad5/3 functioneerden de humane huid DC nog efficiënt in een T cel stimulatie experiment en dit geeft aan dat Ad5/3 een bruikbare, DC-specifieke vector is voor DC-gerichte immuuntherapeutische doeleinden.

In conclusie

In dit proefschrift met als titel 'de rol van ABC transporters in de ontwikkeling en het functioneren van dendritische cellen' hebben we aangetoond dat verscheidene ABC transporters belangrijk zijn voor een optimale ontwikkeling en voor het functioneren van DC. Tevens hebben we laten zien dat drugs die gebruikt worden tijdens chemotherapie, verschillende effecten kunnen hebben op de ontwikkeling van DC; enerzijds kan een korte toevoeging van een lage hoeveelheid van deze drugs de DC differentiatie bevorderen, anderzijds kan langdurige

Chapter 10

aanwezigheid van deze drugs ertoe leiden dat de DC voorlopercellen ongevoelig worden voor differentiatie-inducerende groeifactoren. In **hoofdstuk 9** worden de consequenties en mogelijke implicaties van onze bevindingen voor het immuunsysteem en de behandeling van kanker bediscussieerd. Het stilleggen van de activiteit van ABC transporters tijdens het geven van chemotherapie om drugresistentie tegen te gaan, zou verstrekende, nadelige gevolgen kunnen hebben voor de antitumor immuunrespons. Een dergelijke therapie zou zowel de DC differentiatie kunnen blokkeren (indien MRP1 wordt stilgelegd), als de migratie van DC naar de lymfeklieren (indien MRP4 wordt stilgelegd). Als gevolg hiervan zouden er dus minder mature DC in de lymfeklieren terecht komen en dit kan dan een nadelig effect hebben op de stimulatie van tumor-antigeenspecifieke T cellen. Tevens zou dit kunnen leiden tot verhoogde gevoeligheid van patiënten voor allerlei virale of bacteriële infecties tijdens (en na) de behandeling. De groeiende kennis van de rol van ABC transporters in de ontwikkeling en het functioneren van DC zou dus gebruikt kunnen worden om DC beter te laten functioneren in patiënten. Aan de andere kant zou de mogelijke stimulerende werking van lage doses cytostatica op de ontwikkeling van DC verder onderzocht kunnen worden in patiënten en dit alles zou uiteindelijk kunnen leiden tot nieuwe therapeutische strategieën om de ontwikkeling en het functioneren van DC in de patiënt te bevorderen en daarmee een sterke antitumor respons te induceren.



Chapter 11

Curriculum Vitae

Publication list

Dankwoord

Chapter 11



Curriculum Vitae

Rieneke van de Ven werd op 19 februari 1980 te Hapert geboren. Ze behaalde haar VWO Gymnasium diploma in 1998 aan het Rythovius college te Eersel, waarna zij in september van dat jaar Medische Biologie (Biomedische Wetenschappen) is gaan studeren aan de Universiteit van Amsterdam (UvA). Tijdens deze studie heeft zij zich de laatste 2 jaren gespecialiseerd in de immunologie / oncologie. Haar eerste wetenschappelijk stage van februari 2001 tot september 2001 was bij de afdeling Immunologie (H7) in het lab van Prof. Dr. Ada Kruisbeek aan het Nederlands Kanker Instituut (NKI), alwaar zij heeft meegedraaid in een onderzoek naar het identificeren van eiwitten die een interactie aangaan met het intracellulaire domein van verschillende co-stimulatoire receptoren (zoals CD28, CTLA-4, OX40 and ICOS) op T cellen. Voor haar afstudeeronderzoek heeft zij van januari 2002 tot september 2002 gewerkt in het lymphocyte activation laboratory (LAL) van Dr. Doreen Cantrell bij Cancer Research UK (CRUK) te Londen. Hier heeft zij gewerkt aan het karakteriseren van de signaal transductie pathways die het enzym Protein kinase D (PKD) activeren en heeft bestudeerd welke domeinen binnen dit enzym verantwoordelijk zijn voor de cellulaire lokalisatie. In november 2002 heeft Rieneke haar doctoraal diploma behaald aan de UvA en is vervolgens in april 2003 gestart met haar promotieonderzoek bij de afdeling Pathologie aan het Vrije Universiteit medisch centrum (VUmc) onder supervisie van Prof. Dr. Rik J. Scheper, Dr. Tanja D. de Gruijl en Dr. George L. Scheffer. De resultaten van dit onderzoek staan beschreven in dit proefschrift met de titel: 'de rol van ABC transporters in de ontwikkeling en het functioneren van dendritische cellen'. Na het afronden van haar proefschrift wil Rieneke haar wetenschappelijke carrière voortzetten in het buitenland. Totdat er duidelijkheid is over een mogelijke subsidie om in het lab van Prof. Eugene Butcher aan Stanford University te gaan werken, blijft zij voorlopig nog werkzaam aan het VUmc om contractonderzoek uit te voeren in samenwerking met Solvay.

Curriculum Vitae



Curriculum Vitae

Rieneke van de Ven was born on February 19th 1980 in Hapert, The Netherlands. She obtained her VWO gymnasium certificate at the Rythovius college in Eersel in 1998. That year, she started her Biomedical Sciences education at the University of Amsterdam (UvA). During her study, she specialized in Immunology / Oncology. Her first scientific internship was from February 2001 till September 2001 in the Immunology lab of Prof. Dr. Ada Kruisbeek at the Netherlands Cancer Institute (NKI) in Amsterdam. Here she participated in a project involving the identification of proteins binding to the intracellular portions of a number of co-stimulatory receptors (such as CD28, CTLA-4, OX40 and ICOS) on T cells. For her final graduation-project she went to the lymphocyte activation laboratory (LAL) of Dr. Doreen Cantrell at Cancer Research UK, London. She helped characterize the signal transduction pathways involved in the activation of the enzyme protein kinase D (PKD) and studied which domains within this protein were responsible for the cellular localization of PKD. Rieneke obtained her Master degree in Biomedical Sciences at the UvA in November 2002 and in April 2003 she started as a graduate student at the Pathology department of the VU University medical center (VUmc) in Amsterdam under supervision of Prof. Dr. Rik J. Scheper, Dr. Tanja D. de Gruijl and Dr. George L. Scheffer. The results of her research are presented in this thesis entitled: The contribution of ABC transporters to Dendritic cell development and function. After finishing her PhD, Rieneke will continue her scientific career abroad. Until there is clarity on a putative grant to work in the lab of Prof. Eugene Butcher at Stanford University, she will stay at the VUmc to perform contract research in collaboration with Solvay.



Publication list

R van de Ven, MJ de Jong, AW Reurs, AS Schoonderwoerd, G Jansen, JH Hooijberg, TD de Gruijl, GL Scheffer and RJ Scheper

Dendritic cells require multidrug resistance protein 1 (ABCC1) activity for differentiation.
J. Immunology 176 (9); 2006, p5191-5198.

R van de Ven, GL Scheffer, AW Reurs, JJ Lindenberg, R Oerlemans, G Jansen, JP Gillet, JN Glasgow, A Pereboev, DT Curiel, RJ Scheper and TD de Gruijl

A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4 ; ABCC4) in human dendritic cell migration.
Blood 112; 2008, p2353-2359.

SJAM Santeagoets, S Gibbs, K Kroeze, R van de Ven, RJ Scheper, C Borrebaeck, TD de Gruijl and M Lindstedt

Transcriptional profiling of human skin-resident Langerhans cells and CD1a+ dermal dendritic cells: differential activation states suggest distinct functions.
J.Leuk.Biology 84 (1); 2008, p143-151.

R van de Ven, JJ Lindenberg, AW Reurs, H van Crujisen, RJ Scheper, GL Scheffer and TD de Gruijl

The breast cancer resistance protein (BCRP; ABCG2) promotes Langerhans cell differentiation from CD34+ progenitor cells.
To be submitted

R van de Ven, JJ Lindenberg, D Oosterhoff, P van den Tol, RA Rosalia, M.P. van den Tol, M Murakami, M Everts, GL Scheffer, RJ Scheper, TD de Gruijl and DT Curiel

Selective transduction of mature DC in human skin and lymph nodes by CD80/CD86-targeted fiber-modified Adenovirus-5/3.
Submitted

R van de Ven, J de Groot, AW Reurs, PGJTB Wijnands, K van de Wetering, JD Schuetz, TD de Gruijl, RJ Scheper and GL Scheffer

Unimpaired immune functions in the absence of Mrp4 (Abcc4).
Submitted

R van de Ven, R Oerlemans, JW van der Heijden, GL Scheffer, TD de Gruijl, G Jansen and RJ Scheper

ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer (review)
Submitted

R van de Ven, AW Reurs, HJ Bontkes, E. Hooijberg, H.M. Pinedo, RJ Scheper, GL Scheffer and TD de Gruijl

Long-term doxorubicin exposure interferes with the differentiation of Langerhans Cells from CD34+ precursor cells.
Submitted

R. van de Ven, A.W. Reurs, P.G.J.T.B. Wijnands, S. van Wetering, A.M. Kruisbeek, G.L. Scheffer, R.J. Scheper and T.D. de Gruijl.

Exposure of CD34⁺ precursors to mitoxantrone induces rapid Dendritic Cell differentiation.
Submitted

R van de Ven, GL Scheffer, RJ Scheper and TD de Gruijl

The ABC of DC development and function! (review)
Submitted

Dankwoord

Dankwoord / Acknowledgements

En dan is dit de plek waar ik mijn dank mag betuigen aan al die mensen die mij geholpen hebben met het bereiken van dit punt in mijn carrière en mijn leven. Ik had deze weg niet zonder jullie steun kunnen bewandelen. Ik zal een aantal mensen bij naam noemen, maar kan onmogelijk iedereen persoonlijk bedanken die een steentje heeft bijgedragen.

Als eerste wil ik Professor Rik J. Scheper, mijn promotor, bedanken. Beste Rik, bedankt dat je me deze kans hebt gegeven. Ik herinner me nog goed dat jij, na mijn 2^e sollicitatiegesprek, hebt aangedrongen op een bedenperiode van 24 uur (dit was immers de 'gouden' regel), zodat we geen overhaaste beslissing zouden nemen. Dit terwijl het eigenlijk in jouw kantoor al duidelijk was dat ik de baan wel wilde hebben en jullie het wel wilden proberen met mij als AIO...Ik was nog niet terug in Den Haag diezelfde dag of je hing aan de telefoon om te zeggen dat die bedenperiode toch eigenlijk maar onzin was en dat je Linda al had gevraagd het contract mijn kant uit te sturen. Het was een begin van een hele fijne en boeiende samenwerking. Ik wil je bedanken voor de vele discussies die we hebben gehad, je geduld met deze toch wel af en toe eigenwijze AIO en je enthousiaste kijk op de wetenschap.

Mijn dank is ook groot voor mijn twee copromotoren: Dr George L. Scheffer en Dr. Tanja D. de Gruijl. Beste George, jij bent de onbetwiste koning van de ABCs! Zonder jouw hulp was de wereld van de ABC drug transporters een stuk onduidelijker geweest. Mijn voorliefde voor de immunologie heeft het onderzoek misschien erg naar de DC kant van het onderzoek gestuurd, maar jouw input en kennis van de ABC transporters was onmisbaar voor dit proefschrift. Ik kijk met veel plezier terug op onze trip naar Namur, en ik zal ook nog vaak terugdenken aan ons intieme moment op 8m hoogte samen met Joep tijdens het survivalweekend!

Lieve Tanja, ik ben je onmetelijk dankbaar voor de tijd en energie die je gestoken hebt in dit proefschrift. Je bent voor mij een groot voorbeeld en enorme steun geweest met je immense kennis op immunologisch vlak en je enthousiasme voor het werk. Ik heb enorm genoten van de frequente borrels, onze goede gesprekken en de congressen waar we samen heen zijn geweest met als toppunt ons bezoekje aan Sas in Philadelphia. We zaten er beiden een beetje doorheen die periode en ik denk dat de bezoekjes aan de vele Starbucks (NON FATI) en de (bijna) dagelijkse mojito een goede manier waren om wat bij te komen. Prof. Dr. Tanja de Gruijl (©), ik hoop dat we alle mogelijkheden aangrijpen voor vruchtbare samenwerkingen, waar ik dan ook terecht ga komen op de wereld. We houden contact!

Ik wil de leden van de lees- en promotiecommissie bedanken voor de aandacht die ze hebben besteed aan mijn proefschrift; Prof. Dr. Ada Kruisbeek, Prof. Dr. Reina Mebius, Prof. Dr. Gosse Adema, Dr. Gerrit Jansen, Dr. Theo Geijtenbeek, Dr. Fons van den Eerthwegh en Dr. Arjan van de Loosdrecht, bedankt voor het kritisch doornemen van mijn proefschrift.

Mijn wetenschappelijk carrière heeft zich niet alleen afgespeeld aan het VUmc, ik wil daarom ook Prof. Dr. Ada Kruisbeek, Dr. Doreen Cantrell en Prof. Dr. David Curiel persoonlijk bedanken.

Beste Ada, bedankt dat je me als studente zonder ervaring toch een kans hebt gegeven om stage te lopen binnen je afdeling. Je bent een ware springplank gebleken voor mijn verdere loopbaan aangezien je me meenam op congres in Limburg, alwaar ik contact wist te leggen met Doreen Cantrell en je een goed woordje voor me hebt gedaan bij Rik, Tanja en George. Bedankt voor je vertrouwen in mij!

Dear Doreen, I really enjoyed my stay in your lab and my time in London. I have learned a lot during those 9 months as you gave me my own project to manage. Hopefully we'll meet again so we can catch up on how things are going in science and life.

Chapter 11

Dear David, you gave me the opportunity to broaden my horizons and add some vectorology to my CV. I have had a great time and to everyone's surprise (especially Tanja's) I loved Birmingham, Alabama. I hope there will be more fruitful collaborations in the future.

En dan mijn 2 paranimfen: lieve Anneke en Saskia, bedankt dat jullie naast me willen staan op de grote dag. Ann, zonder jou was dit boekje er echt niet geweest! Ik ben me erg bewust van de luxe positie waarin ik als AIO verkeerde met zo'n kei van een analist aan mijn zijde. Ik moest dan ook enorm wennen toen je na mijn terugkeer vanuit de VS naar DC-Prime ging omdat jouw potje binnen het project op was. Ik vind het heel fijn dat je m'n paranimf wil zijn.

Sas, mede door jou, 'moeder van MUTZ3', ben ik toch ook een beetje 'tante van MUTZ3' geworden. Je hebt me de kneepjes van het MUTZ3 kweken prima bijgebracht. We hebben veel zinvolle en zinloze gesprekken gehad, en hebben elkaar een beetje kunnen ondersteunen bij stressvolle AACR momenten. Ik heb je erg gemist toen je in Philly zat en vond het dan ook leuk dat Tanja en ik de gelegenheid hadden om je daar te bezoeken. Ik ben blij dat we naast collega's ook vriendinnetjes zijn (we gaan vast nog veel wijntjes/biertjes/etentjes doen) en dat je mijn paranimf wil zijn.

En dan nog mijn lieve vriendinnetje Wanda, die ik tot partynimf heb gebombardeerd ☺ Wan, deze rol is jou wel toevertrouwd, want feesten dat kunnen we wel samen...Ik ben ontzettend blij dat je m'n vriendinnetje bent!

Lieve AIO vriendjes en vriendinnetjes! De '0^F49/0^F46 ouwe-garde': Inge, Sas, Cillie, Bart, Yuri, Johan, Joost, Maikel, Wouter, Jettie en Kirsten bedankt voor de immens mooie tijd! Dit traject was toch een stuk saaier en moeilijker geweest als we elkaar niet hadden gehad om mee te borrelen, klagen, huilen en lachen. Helaas heb ik net de 2008-trein gemist (NS-vertraging vanuit Den Haag), maar dat mag de pret niet drukken ☺ Maar ook de andere kamergenoten en mede-AIO's: Mascha, Maria, Hedy, Jelle, Annelies, Sue-Ellen, Mari, Hester, Berbel, Tineke ('Tineke en Rieneke'; we moeten maar samen in SF gaan integreren als ik daar beland!), Floor, Linda, Jolanda, Jessica, Willemijn, Saskia W, Jillian, en Annemieke, bedankt voor de gezelligheid tijdens de dagelijkse-AIO sleur (we hebben gewoon af en toe een vrolijk liedje nodig, toch Annelies en Sue-Ellen!), borrels, congressen en AIO-weekenden. Ik wil hier verder alle collega's bedanken van de pathologie/reumatologie/oncologie/MCBI/DC Prime voor alle gezelligheid en hulp (in willekeurige volgorde): Anita, Sinead, Dinja, Basav, Hetty, Robert, Adrie, Antoinet, Jan, Fons, Joost, Gerrit, Ruud, Clara, Wouter, Frits, Marco, de Petra's, Martine, Astrid, Niek, Erik, Janneke, Krista, Kim, Sander, Taco, Lot, Marein, Michiel, Theo, Michelle, Sandra, Pepijn, Peter Paul, Jorn, Nathalie, Laura, Notoya. En dan natuurlijk de studenten die ik begeleid heb en die mij geholpen hebben met het onderzoek: Marein, Jelle, Mirjam, Rodney en Alain. Verder dank aan het VUmc, het Tergooi ziekenhuis in Hilversum en het Slotervaart ziekenhuis in Amsterdam voor het beschikbaar stellen van huid en aan Jaap voor het op kwaliteit maken van m'n figuren voor publicatie. *I would like to thank Jean Pierre Gillet for receiving us in Namur and helping with the ABC arrays. Of course many thanks to all the colleagues at UAB for the fun time and all the help: Maaiké, Meredith, Vaibhav, Miho, Erin, Justin, Susan, Joel, Reinhard, Qiana, Andrea, Angel, Sasha and The Russians; Alex, Larisa, Svetlana, Lydia.* Tevens wil ik Dr. Pauline Breedveld (Solvay) bedanken voor de huidige samenwerking, waardoor ik het afgelopen jaar de laatste loodjes van m'n promotie met interessant toegepast onderzoek heb kunnen combineren. We gaan er een mooi artikel van maken!

Hoewel het soms anders lijkt, draait het leven van een AIO toch niet alleen om werken. Ik heb veel steun gehad van vrienden. Het zijn er te veel om op te noemen, maar een aantal wil ik toch persoonlijk bedanken: m'n 2 allerliefste vriendinnetjes, m'n partynimf Wanda en m'n 'zusje' Dianne! Bedankt voor jullie geduld als ik weer eens niet kon komen, of laat kwam, of niet belde en voor de ontzettend gezellige etentjes en weekendjes weg. Laten we het proberen vol te houden 1x per jaar! Pau, zonder jou was ik mijn studietijd niet doorgelopen, het is nog

Dankwoord

steeds altijd gezellig samen. Studievrienden Gerben, Jordi, Arne, het Congo-bestuur '99, de van Puffelenmannen: Roeland (fijn je zo veel te zien!), Bart, Jordi, René, vrienden van vroeger en nu: Tijno, Jolanda, Anna, Petra en Paula, Koen en Sanne, Igor; jullie allemaal bedankt voor jullie vriendschap en de nodige afleiding.

Of course this list wouldn't be complete without my friends from foreign countries: Shush, I had a great time with you in London (have to visit more often...). All my Birmingham friends, y'all made my time down South very special: Maaike (and Mike!), Justin, Carrie, Rob, Sam, Harold, Susan, Bradley, Ivo, Ana, Matt, Randy, John, Madhu and all the others. I hope we'll have the opportunity to visit each other and share many more hugs. I miss y'all, the parties, Surin's crab-angels, J&N's cheese biscuits, the pool, the golfing and the lake (house)! En in dit rijtje hoort natuurlijk ook KP. Kees, ik vind het gezellig dat we regelmatig afspreken en dat ik aan het hele Birmingham avontuur ook hier een vriend heb overgehouden met wie ik de herinneringen uit Bama kan delen en gezellig cocktails kan drinken ☺

En dan is dit het plekje voor mijn familie en andere speciale personen in mijn leven:

Ik wil alle ooms en tantes, neefjes en nichtjes van de families Grotenhuis, van de Ven, van de Wildenberg (en opa), als mede de hele familie Koffeman (met name m'n zelf uitgekozen peettante Hella!) bedanken voor hun interesse en voor de steun door de jaren heen. Lieve Mir, jou noem ik nog even apart, omdat je je altijd met zoveel liefde hebt bekommerd om papa, Hester en mij. Ik vind je geweldig en hoop dat er nu een tijd komt waarin je veel kunt genieten van je fijne gezin en je familie. Lieve 'schoon' (surro) familie, Arie & Kitty, Joost, Hans & Kim en Mirjam, jullie zijn prachtige mensen. Ik ben blij dat jullie ook nog liefde hebben voor een surro-schoondochter en ben erg dankbaar voor de liefde en goede zorgen die jullie aan Martijn hebben gegeven en nog steeds geven. Lieve pa (van Balken), ik hoop dat er weer een tijd komt met meer contact. Onze deur staat altijd voor je open.

Lieve Mariëtte, Tom en Jip, wat ben ik blij dat jullie in ons leven zijn gekomen en dat ik die bewuste 23 november de telefoon heb opgenomen. We hebben een fijn gezinnetje zo met z'n allen en ik hoop dat we daar nog jaren van mogen genieten. Erik, fijn dat je Hes zo gelukkig maakt.

Lieve papa en Hester, ik hoop dat jullie trots op me zijn. Het is soms een zware weg geweest voor ons alledrie. Het feit dat ik nu hier sta, en dat dit boekje af is, is deels een gevolg van het feit dat mama er niet meer is en het doel dat ik me toen als 10-jarig meisje heb gesteld. Nu ben ik nog ver van het genezen van kanker verwijderd, maar ik kan inmiddels wel berusten in de gedachte dat alle beetjes helpen en dat dus ook dit proefschrift wellicht wat bij zal dragen aan het geheel. Bedankt voor jullie steun en liefde, ik hou ontzettend veel van jullie.

Lieve mama en oma Grotenhuis, zonder jullie invloed en energie zou ik niet op dit punt zijn beland, vandaar ook dat dit boekje is opgedragen aan jullie. Mama, je blijft altijd in mijn leven, ik vind het jammer dat ik je niet beter mocht leren kennen. Oma, sorry dat ik het niet op tijd af heb kunnen krijgen zodat je er vandaag bij had kunnen zijn. Al jouw kaarsjes hebben toch echt geholpen al die jaren, ik mis je warme handen en onze gesprekken.

En dan is dit jouw plekje lieve Tijn! Je vraagt al jaren om een laatste auteurschap op een van mijn artikelen, maar ik heb je steeds voorgehouden dat er een andere, heel belangrijke laatste plek is gereserveerd voor jou...deze dus ☺ Het is soms moeilijk gebleken onze drukke, carrière gedreven, levens te stroomlijnen, maar ik ben blij dat we toch hebben doorgezet. We hebben nu een heerlijk huisje samen en nog veel gezamenlijke, buitenlandse avonturen voor de boeg. Mop, ik hou van je en hoop dat we heel gelukkig blijven samen!

Dikke knuffels / *many big hugs*

Rieneke



