

VU Research Portal

Molecular mechanisms of bortezomib resistance in acute leukemia

Franke, N.E.

2017

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Franke, N. E. (2017). *Molecular mechanisms of bortezomib resistance in acute leukemia*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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



Appendix

Nederlandse samenvatting

List of publications

About the author

Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In dit proefschrift zijn de mogelijke toepassing van het nieuwe geneesmiddel bortezomib (BTZ) in leukemie onderzocht. In **hoofdstuk 1** worden de genetische achtergrond van leukemie, behandelopties, redenen voor falen van de huidige therapie en lange termijn gevolgen besproken. Deze ziekte wordt veroorzaakt door ongecontroleerde overmatige deling van witte bloedcellen in het beenmerg waardoor de andere gezonde cellen in het beenmerg (rode bloedcellen, bloedplaatjes en gezonde witte bloedcellen) verdrukt worden en niet meer aangemaakt kunnen worden. Patiënten presenteren zich daarom vaak met klachten van veel blauwe plekken door verlaagd aantal bloedplaatjes, moeheid door bloedarmoede en infectie als het gevolg van gebrek aan gezonde witte bloedcellen. Leukemie is de meest voorkomende vorm van kinderkanker en kan worden onderverdeeld in Acute Lymfatische Leukemie (ALL) en Acute Myeloïde Leukemie (AML). Ook bij volwassenen komt leukemie voor, echter vormt dit een veel kleiner percentage van alle kankervormen op de volwassen leeftijd.

De kans op genezing van ALL is bij kinderen vrij groot, de overlevingskans is ongeveer 83-94%. Op de volwassen leeftijd zijn de overlevingskansen veel slechter, slechts 15-35% van de patiënten overleeft de ziekte. Hetzelfde verschil is te zien bij AML, van alle kinderen die de ziekte krijgen, overleeft 65-70% terwijl dat bij volwassen patiënten maar tussen de 10-45% ligt (afhankelijk van de leeftijd).

De behandeling bestaat momenteel uit een combinatie van verschillende chemokuren. Ondanks deze zeer agressieve behandeling komt de ziekte na het voltooien van de chemotherapie nog bij een behoorlijk grote groep weer terug. Daarnaast hebben de patiënten, die wel genezen door de behandeling, op de lange termijn vaak nog bijwerkingen van de chemotherapie. Daarom zijn nieuwe therapieën noodzakelijk die de overlevingskansen van leukemie patiënten verbeteren en minder bijwerkingen hebben op zowel de korte als ook de langere termijn.

In **hoofdstuk 2** wordt de ratio beschreven achter de remming van het proteasoom met bortezomib in de behandeling van leukemie. BTZ is de eerste uit de familie van de proteasoomremmers, een groep geneesmiddelen die de eiwitafbraak in de cel remt. In elke cel van het lichaam worden continu eiwitten aangemaakt. Deze eiwitten zijn één van de bouwstenen van de cel en voeren allerlei taken uit binnen de cel. Het DNA van de cel is de blauwdruk voor alle eiwitten in de cel. Indien een bepaald eiwit geproduceerd moet worden, wordt de DNA code gekopieerd in RNA. Dit RNA wordt uit de kern van de cel naar de plek getransporteerd waar het eiwit wordt geproduceerd. Onderweg kan de productie van dat eiwit nog beïnvloed worden doordat een microRNA zich bindt aan het RNA, waardoor deze niet gelezen kan worden. Dit complexe evenwicht bepaalt welke eiwitten gemaakt worden en daarmee wat er in de cel gebeurt.

Op het moment dat een eiwit versleten is of er tijdens de productie van het eiwit een fout wordt gemaakt, zal deze worden afgebroken door een voor eiwitafbraak verantwoordelijk eiwit complex, het proteasoom. Het geteste middel BTZ remt de eiwit afbraak, waardoor er een overschot ontstaat aan niet functionerende eiwitten, die in hoge concentraties giftig zijn voor een cel. Aangezien kankercellen snel delen en veel eiwit produceren, ontstaan er tevens veel misvormde eiwitten. Veel kankercellen zijn dus meer afhankelijk van de werking van het proteasoom dan gezonde cellen.

Het proteasoom is samengesteld uit twee verschillende grote onderdelen, de kap en de centrale cilinder. De kap herkent versleten en misvormde eiwitten doordat er een markeringsketen aan vast zit, ubiquitine. Vervolgens wordt door het cilindervormige middenstuk, het versleten of misvormde eiwit geknipt in kleine stukken, peptiden. Het middenstuk is opgebouwd uit 4 ringen. Deze ringen bestaan op hun beurt weer uit kleinere onderdelen, subunits. De 2 buitenste ringen zijn opgebouwd uit zeven subunits, de 2 binnenste ringen uit zeven subunits. Drie van deze subunits, de 1, 2 en 5, zijn verantwoordelijk voor het daadwerkelijke knippen van het af te breken eiwit. De daaruit ontstane peptiden kunnen verder worden afgebroken tot aminozuren, welke weer gebruikt worden om nieuwe eiwitten te fabriceren. Dit beschreven afbraakmechanisme is verantwoordelijk voor ongeveer 80% van alle eiwitafbraak in de cel. Naast deze standaard vorm, bestaat er ook nog een immuun proteasoom wat voornamelijk in afweer cellen wordt geproduceerd. Deze vorm van het proteasoom bevat de 1i, 2i en 5i subunits in plaats van de 1, 2 en 5 subunits die in het standaard proteasoom zijn ingebouwd.

Wanneer het proteasoom wordt geremd, zullen misvormde eiwitten ophopen in een cel wat in hoge concentraties dodelijk is voor de cel. Daarnaast remt dit de 5 en de 1 activiteit met als gevolg een blokkade in de afbraak van eiwitten. Kankercellen waaronder leukemiecellen delen sneller dan gezonde cellen waardoor er continu meer eiwitten aangemaakt worden met als gevolg ook meer misvormde eiwitten. Daardoor zijn kankercellen gevoeliger voor proteasoomremming dan gezonde cellen. In **hoofdstuk 2** worden tevens een overzicht gegeven van originele laboratorium onderzoeken en vervolgens de klinische studies met BTZ.

In het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, is onderzocht of BTZ en nieuwere proteasoomremmers effectief waren, wanneer leukemiecellen van kinderen in het laboratorium werden blootgesteld aan deze nieuwe therapieën. Aangezien BTZ reeds bij volwassen patiënten met de ziekte van Kahler, ook Multipel Myeloom (MM) genoemd, gebruikt werd en in deze groep ook patiënten ongevoelig waren voor deze nieuwe therapie, hebben wij een BTZ ongevoelig leukemie model ontwikkeld. Dit model werd gebruikt om het mechanisme van ongevoeligheid, resistentie genaamd, te ontrafelen. Vervolgens werd met behulp van dit mechanisme, gezocht naar mogelijkheden om aan te tonen c.q. te voorspellen of patiënten op BTZ gaan reageren.

In **hoofdstuk 3** wordt besproken hoe effectief BTZ is vergeleken met drie 2e generatie proteasoomremmers, wanneer deze getest werden op leukemiecellen afkomstig van het beenmerg van kinderen met leukemie. Getest zijn carfilzomib, de oraal beschikbare variant ONX 0912 en de immuunproteasoomremmer ONX 0914. Daarbij werd tevens onderzocht wanneer BTZ gecombineerd met dexamethason samen beter werkten als de afzonderlijke middelen (additief effect) of elkaar nog verder versterkten waarbij het effect van de combinatie meer is als het effect van beide middelen bij elkaar opgeteld (synergistisch effect).

Als eerste bleek, dat ALL cellen 5.5 keer zo gevoelig zijn voor proteasoomremmers dan AML cellen ($P < 0.001$). De combinatie van BTZ en dexamethason was additief tot synergistisch in het merendeel van de patiënten samples. Vervolgens werd gekeken of de hoeveelheid en de verhouding van de verschillende subunits van het proteasoom samen hing met de gevoeligheid voor proteasoomremmers. Daaruit bleek dat een toegenomen ratio van $\beta 5i/\beta 5$, $\beta 1i/\beta 1$ en $\beta 2i/\beta 2$ correleerde met de gevoeligheid voor proteasoomremmers. Deze data suggereerden dat de verhouding en de absolute hoeveelheid van de subunits kunnen bijdragen aan ongevoeligheid voor proteasoomremmers.

Vervolgens werden bortezomib ongevoelige cellijnen ontwikkeld, door steeds de concentratie van bortezomib in het kweekmedium stapsgewijs te verhogen. Gebruikt werden de THP-1 cellijn als AML model (**Hoofdstuk 4**), de CCRF-CEM cellijn als ALL model en RPMI-8226 als MM cellijn (**Hoofdstuk 5**). Als eerste werd gekeken naar de gevoeligheid van de BTZ ongevoelige cellijnen voor andere chemotherapeutische middelen. Daaruit kwam naar voren dat deze ongevoelige cellijnen nog volledig gevoelig waren voor de standaard chemotherapie, echter wel resistent waren voor andere proteasoomremmers. Toen vervolgens werd gekeken naar de 5 subunit, het primaire aangrijpingspunt van BTZ, werd een sterk verhoogde hoeveelheid waargenomen met als gevolg een sterk verlaagd $\beta 5i/\beta 5$ ratio. Tevens werd een kleine verandering, een mutatie, waargenomen in het DNA van deze specifieke subunit. Deze mutatie lag precies in de regio die codeert voor de locatie waar BTZ bindt aan de $\beta 5$ subunit. Ook in de andere cellijnen werden deze mutaties waargenomen. In dit hoofdstuk wordt door middel van een computer model onderzocht wat het precieze effect van de mutatie is op de uiteindelijk binding van BTZ. Middels deze modelering werd aangetoond dat de gevonden mutaties resulteerden in subtiele veranderingen precies op de plek waar BTZ bindt. Hoewel deze veranderingen klein waren, hadden ze allen direct of indirect effect op de binding en daarmee de effectiviteit van BTZ. Naast BTZ werd ook gekeken naar het effect op de normale functie van de $\beta 5$ unit, het afbreken van eiwitten. Daaruit bleek dat de test stof LLVY-AMC, die een indicatie kan geven over de normale $\beta 5$ functie, ook minder goed bond aan de $\beta 5$ unit. Dit laatste resultaat verklaarde waarom de $\beta 5$ subunit in zulke hoge hoeveelheden aanwezig was in de BTZ ongevoelige cellen. Door de mutatie kan BTZ

slechter binden aan de $\beta 5$ subunit, echter door de mutatie is deze tevens minder goed in staat zijn normale functie uit te voeren. De reactie van ongevoelige cellijnen daarop is verhoogde productie van de $\beta 5$ subunit ter compensatie.

Tot slot is in **hoofdstuk 6** middels een screening op DNA, mRNA en miRNA niveau in de CCRF-CEM cellijn, onderzocht of naast de mutaties nog aanvullende mechanismen een rol spelen in de resistentie voor BTZ. Uit deze screening bleek dat de ongevoelige cellijnen veel minder stress door misvormde eiwitten ondervonden van BTZ als de gevoelige cellen. Daarnaast werd gevonden dat het eiwit genaamd MARCKS in grote hoeveelheden aanwezig was in de BTZ ongevoelige cellen. Deze overproductie werd ook gezien in leukemiecellen van veel patiënten die niet goed reageerden op een combinatie therapie waar BTZ deel vanuit maakte, echter was deze overproductie niet significant meer dan de patiënten die wel reageerden op de therapie ($p=0.073$). Vervolgens werd in de ongevoelige cellijn een associatie aangetoond tussen MARCKS en het ontstaan van ubiquitine gevulde vesikels in de cel. Deze vesikels werden uitgescheiden en opgenomen in omliggende cellen. Vanuit deze data postuleren wij een nieuw BTZ resistentie mechanisme: via uitscheiding van vesikels gevuld met ubiquitine gebonden misvormde eiwitten, wordt het geremde proteasoom omzeild en zal geen stress optreden in BTZ ongevoelige cellen. Daarnaast is MARCKS potentieel marker voor BTZ mechanisme.

Samenvattend (**Hoofdstuk 7**) wordt in dit proefschrift getoond dat proteasoomremmers potentieel effectief kunnen zijn in de behandeling van leukemie. Daarnaast wordt aangetoond dat langdurige blootstelling aan BTZ in het laboratorium leidt tot ongevoeligheid. Deze resistentie is enerzijds te verklaren door mutatie in het $\beta 5$ gen tezamen met verhoogde productie van dit eiwit met als gevolg minder remming van de $\beta 5$ subunit door BTZ. Anderzijds kunnen de gevolgen van $\beta 5$ remming worden vermindert door ubiquitine gebonden eiwit uit te scheiden middels vesikels, waarmee het proteasoom omzeild wordt. Verder werd MARCKS geïdentificeerd als mogelijke voorspeller van het aanslaan van BTZ therapie. Aanvullend preklinisch onderzoek in combinatie met klinische studies zijn noodzakelijk om verdere voorspellers van response op proteasoomremmers te kunnen identificeren en bevestigen. Verder blijkt uit de huidige studie dat langdurige blootstelling aan proteasoomremmers resulteert in therapie resistentie. Om de overleving van patiënten met leukemie te verbeteren, zullen proteasoomremmer moeten worden gecombineerd met andere vormen van chemotherapie. Lopende en toekomstige klinische studies zullen het antwoord moeten geven welke combinatie hiervan het meest effectief is.

LIST OF PUBLICATIONS

Franke NE, Kaspers GJL, Assaraf YG, van Meerloo J, Niewerth D, Kessler FL, Poddighe PJ, Smeets S, Ylstra B, Bi C, Chng WJ, Horton TM, Menezes RX, Musters RJ, Zweegman S, Jansen G and Cloos J. Exocytosis of polyubiquitinated proteins in bortezomib-resistant leukemia cells: a role for MARCKS in acquired resistance to proteasome inhibitors. *Oncotarget*. 2016;7(46):74779-74796.

Niewerth D, Franke NE, Jansen G, Van Meerloo J, Zweegman S, De Haas V, Cloos J en Kaspers G.J.L. Het voorspellen van de gevoeligheid van kinderleukemiecellen voor proteasoomremmers, *Tijdschrift voor Kindergeneeskunde* 2014;82(2):79-88.

Niewerth D, Franke NE, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, Degenhardt J, Anderl J, Schimmer AD, Zweegman S, de Haas V, Horton TM, Kaspers GJ and Cloos J. Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica*. 2013;98(12):1896-904.

Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, van Meerloo J, Vojtekova K, van Zantwijk, CH, Zweegman S, Chan ET, Kirk CJ, Geerke DP, Schimmer AD, Kaspers GJ, Jansen G and Cloos J. Impaired bortezomib binding to mutant $\beta 5$ subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(4):757-68.

Li X, Wood TE, Sprangers R, Jansen G, Franke NE, Mao X, Wang X, Zhang Y, Verbrugge SE, Adomat H, Li ZH, Trudel S, Chen C, Religa TL, Jamal N, Messner H, Cloos J, Rose DR, Navon A, Guns E, Batey RA, Kay LE and Schimmer AD. Effect of Non-competitive Proteasome Inhibition on Bortezomib Resistance. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(14):1069-82.

Beumer JH, Franke NE, Tolboom R, Buckle T, Rosing H, Lopez-Lazaro L, Schellens, JH, Beijnen JH, van Tellingen O. Disposition and toxicity of trabectin (ET-743, Yondelis™) in wild-type en *mdr1* gene knock-out mice. *Invest New Drugs*. 2010;28(2):145-55..

Szilagyi K, Podracka L, Franke NE, Mojzis J and Mirossay L. A new link between steroid resistance, glucocorticoid receptor and nuclear factor kappa B p65 in idiopathic nephrotic syndrome. *Neuro Endocrinol Lett*. 2009;30(5):629-36.

Franke NE*, Oerlemans R*, Assaraf YG, Cloos J, Van Zantwijk I, Berkers CR, Scheffer GL, Debipersad K, Van der Heijden JW, Peters GJ, Dijkmans BAC, Scheper RJ and Jansen G. Selective overexpression of 26S proteasome beta-5 subunits as a molecular basis of bortezomib resistance. *Blood*. 2008;112(6):2489-99. *Shared first authorship

Franke NE, Vink J, Cloos J and Kaspers GJL, Proteasome and protease inhibitors. Innovative Leukemia and Lymfoma Therapy, Informa Healthcare: New York, 2007.

Beumer JH, Buckle T, Ouwehand M, Franke NE, Lopez-Lazaro L, Schellens JH, Beijnen JH and van Tellingen O. Trabectin (ET-743, Yondelis™) is a substrate for P-Glycoprotein, but only high expression of P-glycoprotein confers the multidrug resistance phenotype. Invest New Drugs. 2007;25(1):1-7.

Van den Berg TK, Honing H, Franke N, van Remoortere A, Schiphorst WE, Liu FT, Deelder AM, Cummings RD, Hokke CH and van Die. LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. J Immunol. 2004;173(3):1902-7.

ABOUT THE AUTHOR

Niels Erwin Franke was born on 15th of January 1979 in Ermelo. After finishing the Atheneum at the Chr. College Groevenbeek in Ermelo in 1997, he started to study medical biology at the Vrije Universiteit (VU) in Amsterdam. His first research internship was performed at the Department of Molecular Cell Biology of the VU under supervision of Dr. H. Honing, T. van den Berg and Dr I. van Die, where he studied the role of galectin-3 in the macrophage-schistosoma interaction. Subsequently, his second research internship was performed at the Department of Clinical Pharmacology of the Netherlands Cancer Institute (NKI) in Amsterdam under supervision of Dr. JH Beumer and Dr. O van Tellingen, where he tested the preclinical pharmacological properties of two novel anti-cancer drugs: Ecteinascidin-743 and E7070. He obtained his master's degree in 2004. From 1999 onwards, he simultaneously started to study medicine which led to his medical degree in 2006. His final rotation was performed at the Department of Pediatrics of the Diaconessenhuis in Paramaribo, Surinam.

In 2006 he started with the PhD project described in this thesis at the Department of Pediatric Oncology/Hematology of the VU University Medical Center (VUmc) in collaboration with the Department of Rheumatology. The project focusing on drug resistance in leukemia was supervised by Prof. GJL Kaspers, Prof. BAC Dijkmans, Dr. J Cloos and Dr. G Jansen. This research project was later transformed into a MD-PhD training program, a combination of a PhD program in Pediatric Oncology/Hematology and clinical specialization in pediatrics. During his PhD, he performed an internship microarray analysis at the Cancer Science Institute (CSI) of the National University of Singapore (NUS) under supervision of Dr. WJ Chng. January 2009 he started his clinical training at the Department of Pediatrics in the VUmc followed by an internship at the Department of Pediatrics in the OLVG hospital in Amsterdam in 2010. In 2011 he returned to the pediatric oncology-hematology laboratory for a year to continue his research. Thereafter he returned to the clinical pediatric department where he rotated between Pediatric Intensive Care Unit, Neonatal Intensive Care Unit and the outpatient clinic. He finished his clinical pediatric training at the department of pediatric oncology of the Emma Kinderziekenhuis (EKZ)/ Academic Medical Center (AMC) hospital in Amsterdam. Since November 2014 he is working as a fellow pediatric oncology in the EKZ/AMC Amsterdam.

DANKWOORD

Een onderdeel van de trouwgelofte, “in voor en tegenspoed”, is ook wel toepasselijk om voor een promotie traject af te leggen. Het onoverwinnelijke gevoel dat een geslaagd experiment, geaccepteerde publicatie of oral presentation op groot congres is geweldig, welke wordt afgewisseld met dips door een afgewezen artikel of het “laatste experiment” nodig voor een publicatie wat niet het gewenste resultaat geeft met als gevolg talloze aanvullende proeven. Desalniettemin is het gelukt het af te ronden. Al heeft het even geduurd, ik heb “of tot de dood ons scheidt” nog net weten voor te zijn.

Zonder de hulp van velen zowel binnen als buiten het lab, was dit proefschrift niet tot stand gekomen. Allereerst wil ik mijn promotie team bedanken voor al hun inspanning om dit proefschrift mogelijk te maken en ruimte die zij mij hebben gegeven binnen het onderzoek. Prof.Dr. G.J.L.Kaspers, beste Gertjan, heel veel dank voor het geven van de mogelijkheid om niet alleen mijn promotie onderzoek te verrichten binnen de kinderoncologie maar tevens mij te helpen om een opleidingsplaats binnen de kindergeneeskunde te bemachtigen binnen een AGIKO constructie. Door jouw positie, iets verder van mijn onderzoek af, kon jij altijd scherp het overzicht van het onderzoek zien en daarin sturen. Ik heb veel aan je vriendelijke doch eerlijke coaching gehad.

Emeritus Prof.Dr. B.A.C. Dijkmans, beste Ben, dank voor het mogelijk maken van het gezamenlijk onderzoek en daarmee de drug resistentie kennis van de reumatologie te kunnen bundelen met de kinderoncologie. Ondanks je grotere afstand van het onderzoek was je interesse altijd onverminderd groot. Prof.Dr. R. van Vollenhoven, beste Ronald, dank dat je na de pensionering van Ben zijn plaats als promotor hebt willen overnemen.

Dr J.Cloos, Jacqueline, jouw ongeremde enthousiasme en idealisme heeft mij erg geïnspireerd. Altijd wist je een plotseling voordoend probleem weer positief te benaderen. Met jouw uitgebreide ervaring vanuit je eerdere projecten en je betrokkenheid bij de verschillende actuele projecten, kon je altijd wel een kruisverband maken met een ander onderzoek en kende je iemand die ons misschien verder kon helpen. Daarmee heb je niet alleen mijn onderzoek verder gebracht maar ook Katka aan een mooie promotie plaats geholpen. Ik denk dat je alle kwaliteiten hebt om een geweldige professor te worden.

Dr. G. Jansen, beste Gerrit, ongelofelijk hoe groot jouw encyclopedische kennis is. Zelden was er een pathway of mechanisme bij jou niet bekend, en had je er wel een artikeltje over liggen. Dat jouw kamer nog nooit is ontruimd in verband met brandgevaar, is mij een raadsel. Groot respect hoe jij na een tijd van afwezig weer zo scherp bent teruggekomen. Ik heb veel geleerd van jouw geweldige kennis en schrijfkunst.

Graag wil ik ook mijn leescommissie bedanken: Dr. D.P.Geerke, Prof.Dr. C.R.Jimenez, Prof. Dr. H.Ovaa, Prof.Dr. B.Ylstra, Dr. J.Voortman, Prof.Dr. C.M.Zwaan en Prof.Dr. S.Zweegman. Allen dank dat jullie de tijd hebben gevonden voor het kritisch doorlezen van mijn proefschrift en het plaatsnemen in mijn oppositie. Jens, jammer het niet lukte om op 21 september aanwezig te zijn, maar desalniettemin dank voor de deelname aan mijn leescommissie. Daarbij een speciaal woord van dank voor de leden die ook bij mijn onderzoek betrokken zijn geweest. Daan dank voor het wegwijs maken in de wereld van *in silico* modellering, heeft tot een mooi stuk geleid. Bauke, bedankt voor de uitvoering van de GEP en CGH-arrays, de ondersteuning bij de uitwerking en je altijd scherpe commentaar op de manuscripten. Sonja, dank voor je constructieve input in de research meetings en artikelen, je myeloom perspectief en het beschikbaar stellen myeloom samples. Je bent een waardige opvolger van Peter.

Het onderzoek was niet mogelijk zonder samenwerking met verschillende laboratoria, zowel nationaal als internationaal. I would like to thank Dr. C.J.Kirk, Dr. J.Degenhardt, Dr. J.Anderl and Dr. E.Chan (Onyx Pharmaceuticals) for sharing their compounds and the contributions to the chapters involving second generation proteasome inhibitors. Next, I would like to thank Dr. T.M. Horton from the Children Oncology Group (USA) for sharing the clinical samples of BTZ treated patient with us. Prof.Dr. Y.G. Assaraf (Technion, Israel), dear Yehuda, thank you for your intellectual input on my research including revisions of my papers. Your enthusiastic way of discussing during the research meetings we had, was truly stimulating. Dr. W.J.Chng and Dr. C.Bi (NUS, Singapore), dear WeeJoo and Chonglei, thank you both for a very inspiring internship in your genomics lab, I had a great time there. Dr. R.X. de Menezes, dear Renee, thank you for all your help with my statistical struggles regarding the various arrays. Dr. A.D. Schimmer (Ontario Cancer Institute) thank you for sharing your compounds and your contributions to the publications. Dr. C.R. Berkers bedankt voor de hulp met de proteasoom probes. Van de microarray facility van het CCA/VUmc wil ik naast Bauke ook Paul en Serge danken voor het uitvoeren en de hulp bij de uitwerking van de microarray experimenten, dit was de basis voor de publicatie van het hoofdstuk 6. Dr. R.J.Musters (afdeling fysiologie) dank voor alle hulp bij de microscopie, heeft mooie plaatjes opgeleverd. Voor de cytogenetische ondersteuning wil ik Dr. P.J.Poddighe (afdeling klinische genetica) graag bedanken, en Dr. V. De Haas danken voor de ondersteuning vanuit SKION. Dr. G.L. Scheffer en Prof.Dr. R.J.Scheper (afdeling pathologie), Dr. K.Debipersad en Dr. J.W. Van der Heijden (afdeling reumatologie) en Prof.Dr. G.J.Peters (afdeling oncologie) voor jullie bijdrage aan publicatie in hoofdstuk 4. Dr. R.Oerlemans, beste Ruud, dank voor de mooie samenwerking die we hebben gehad waaruit het Blood artikel is ontstaan alsook het wegwijs maken binnen het reumatologie lab.

Mijn interesse voor het wetenschappelijk onderzoek is gewekt tijdens mijn wetenschappelijke stages in het moleculaire celbiologie lab van de VU begeleid door Timo van den Berg, Henk Honing en Irma van Die, en in het klinische farmacologie lab van het NKI/AvL begeleid Olaf van Tellingen en Jan Hendrik Beumer. Heren en dame bedankt voor het bijbrengen van de basis die noodzakelijk is om een promotie traject te kunnen beginnen. Speciaal woord van dank voor Timo die mij geïntroduceerd en aanbevolen heeft in de kinderoncologie groep met een promotieplaats als gevolg.

Het onderzoek startte in het oude HOI-lab in de kliniek. Aldaar een crash cursus van Josefien, Mark, Isabelle en Bianca gehad "How to survive being an AIO" en "How to survive at a congress". Die ook in de jaren erna flink hebben geholpen, dank voor het wegwijs maken in het AIO-bestaan binnen de kinderoncologie.

Vrij snel daarna verhuisde de onderzoeksgroep naar het nieuwe lab in het CCA samen met de afdeling hematologie waar de AIO's samen op een kamer kwamen. Daar heb ik nog de staart van het promotie traject van de Anna van Rhenen en Bijan mogen meemaken en werd ingewijd in het promotie cabaret traditie van de hematologie, Penny de Jager eat your heart out. Na het vertrekken van de "oude garde", ontstond er een nieuwe AIO groep waar ik het grootste gedeelte van mijn promotie mee heb mogen samenwerken. Lieve AIO's, mede dankzij jullie heb ik echt een top tijd gehad in het CCA. De leesweekenden waren altijd uitermate inspirerend, hebben me echt verder geholpen. Ook de vrijdagmiddag "discussies" waren altijd zeer diepgaand. Sjaan, Madri di tutti AIO's, als jij maar half zo goed zorgt voor je patiënten als je voor ons deed, mogen ze zich nog steeds in hun handjes knijpen. Monique, de overdenker, heerlijk hoe open, eerlijk en spontaan jij gevraagd of ongevraagd commentaar kan geven dingen, zowel wetenschappelijk als alles eromheen. Willemijn, stuiterbal, wat een ongelimiteerde hoeveelheid energie heb jij. Ik geloofde na het eerste AIO leesweekend pas dat jij ook kan slapen. Het congres in New Orleans gevolgd door roadtrip met jou en Monique was echt gaaf, jammer dat we alleen nooit in Tallahassee zijn geweest, het schijnt echt een top plek te zijn. Anna, The only foreigner in the village, respect for your ability to survive between all those cheese heads.

Maar gelukkig was er ook mannelijk tegengeluid. Costa, de paranoïde, niks mis met een gezonde dosis achterdocht als onderzoeker, al is de achterdocht in de jaren wel wat minder geworden als je huidige facebook activiteit zie. Marvin, de stoicijn, ik nooit begrepen hoe jij stug door kon werken tijdens borrels terwijl de kroonkurken over je hoofd vlogen. Het is mooi om te zien hoe dit compleet verandert bij jou tijdens een potje voetbal. Jurjen, gabber, hakkuh woensdag is niet meer hetzelfde zonder jou. Dave, de Ruben Nicolai van de AIO's, balletje trappen met jou is prima, maar ik kom echt nooit meer voetbal bij jou kijken. Denise, in het begin was het voor jou lastig om je plek te vinden aangezien we nog een overlap hadden in ons project. Maar snel heb jij je eigen lijn gevonden, die je

met indrukwekkende efficiëntie in een proefschrift heb weten te vertalen. Een eigenschap waar ik altijd jaloers op ben geweest. Voor alle “nieuwe AIO’s” die daarna erbij gekomen zijn, zoals je aan mij ziet, komt het uiteindelijk meestal wel goed.

Tijdens het onderzoek heb ik de luxe gehad analytische ondersteuning te krijgen van Ina, Katka V en Johan. Lieve Ina, het was heel bijzonder om met je samen te mogen werken, wetende dat jij met de helft van de professoren van kinderoncologisch Nederland hebt samengewerkt op hun promotie project. Naast dat het altijd heel gezellig was, heb ik ook heel veel van de berg met ervaring die je hebt geleerd. Geniet van je welverdiende pensioen. Katka V, “poppetje”, vanaf dag 1 bracht jij je Slowaakse spirit mee, wat een hele positieve invloed had op het lab. Met je secure manier van werken en documenteren heb je een mooie bijdrage geleverd aan het proefschrift. Tot slot Johan, begonnen als student en na afronden van je studie, weer terug op het oude nest. Door onze gezamenlijke liefde voor koffie, wat trouwens recent is bewezen helemaal niet zo slecht te zijn (Gunter et al. 2017), konden incubatie tijden altijd goed worden benut. De enorme stapel MTT platen, blotjes, prachtige microscopie plaatjes en nog veel meer data, hebben een groot gedeelte van de publicaties gevuld. Zeker tijdens mijn klinische periode, waarin ik geen tijd had om in het lab te staan, heb jij ervoor gezorgd dat mijn onderzoek door kon lopen. Veel dank voor al het werk dat je verzet hebt en dank dat jij mijn paranimf wil zijn.

En dan waren er nog naast Johan een aantal studenten die aan het onderzoek hebben meegewerkt. Nynke, Hon, Uzma, Linda en Danielle, allen veel dank voor jullie inzet. Mooi te zien hoe jullie je plek binnen of buiten de academie gevonden hebben. Hon, al ben ik heel benieuwd waar jij terecht bent gekomen.

Omdat ik veel te bang ben mensen te vergeten van het hematologie lab, wil ik iedereen van cleanlab tot ML-II lab, van secretariaat tot FACS lab bedanken voor een hele mooie tijd. Zowel binnen als buiten het lab zoals bij de pannenkoeken meetings, retraites en legendarische voetbal toernooien was er altijd een gezellige, behulpzame sfeer, maar zo nodig constructief kritisch m.b.t. tot mijn onderzoek of mijn voetbalkwaliteiten. Een aantal van jullie, met wie ik meer samengewerkt heb, wil ik toch even kort wil noemen. Floortje ondanks de foto op de deur, val je in het echt best mee. Dank voor je hulp waaronder de exosoom experimenten. Adri dank voor je magistrale coaching, als Advocaat vertrekt, moeten ze echt jou gaan benaderen. Daarnaast dank voor die kleine vragen en je Automacs hulp bij de MM samples. Willemijn S en Sander, dank voor jullie hulp bij de (signaal transductie) FACS experimenten, ik hoop dat ik de FACSen niet al te veel gesloopt heb. Angele dank voor het onder de duim houden van Costa, Bo dank dat jij je over Anna hebt bekommerd en haar een beetje Nederlands hebt bijgebracht. Fedor, Zinia en Paulien bedankt voor jullie moleculaire ondersteuning. Tot slot Richard, blot king, jammer dat je ons verlaten hebt, maar als ik de foto’s uit Chili zie, kan ik je geen ongelijk geven.

Daarnaast wil ik natuurlijk ook de staf van de hematologie bedanken. Vanuit de kliniek Gert, Peter, Arjan, Jeroen, Martine, Josee, Marielle en Otto, en vanuit het lab Gerritjan, Angelica, Linda, Paul, Hetty en Hans, allen dank voor al jullie inbreng tijdens de research meetings en retraites, en de gezelligheid tijdens de diverse congressen. Tevens wil ik ook de kinderoncologen, Dannis, Floor, Margeet en Arjenne, bedanken voor hun inbreng tijdens de research meetings. Daarnaast Reinoud, mijn opleider kindergeneeskunde in het VUmc, voor het mogelijk maken van de AGIKO constructie vanaf de klinische zijde. Daarbij wil ik zeker ook mijn klinische mentoren noemen. Lieve Raphaële en Chantal, dank voor alle coaching en ondersteuning die jullie tijdens mijn kindergeneeskunde opleiding gegeven hebben, hier ben ik zeer dankbaar voor.

Tot slot wil ik mijn familie bedanken, beginnende bij Sigrid. Het is even slikken als je kleine zusje je inhaalt en eerder promoveert dan jezelf, maar van jouw kan ik het net hebben. Ik ben supertrots op je. Dank voor al je voor al je praktische hulp als paranimf en bij het afronden van mijn promotie. Super zusje. Maar ook Inge, mijn grote zus, Dennis en mij mooie nichtjes Sarah en Daphne, bedankt voor jullie morele steun, hoop dat jullie nu uiteindelijk een beetje snappen waar ik die tijd mee bezig ben geweest.

Lieve Pa en Ma, heel veel dank voor jullie onvoorwaardelijk steun en ruimte die jullie mij tijdens mijn studie en promotie gegeven hebben en het vertrouwen dat het uiteindelijk ook wel een keer goed zou komen. Daarnaast voor alle praktische hulp zoals alle last minute oppas verzoeken en de mogelijkheid om bij jullie te schrijven terwijl jullie Olivia entertainde. Zonder jullie hulp, was ik nooit gekomen waar ik nu ben.

Liebe Babka, danke dir für deine Hilfe mit Olivia. Oft bist du in die Niederlanden geflogen, um auf Olivia aufzupassen. Das hat uns und Olivia sehr gefreut, du bist eine super Oma.

Tot slot mijn meisjes, Katka en Olivia, de liefdes van mijn leven. Olivia, mijn smurf, al heb je het niet door gehad, je hebt mij altijd heel veel geholpen om alles van mijn werk te kunnen relativeren en te ontspannen. Nu het eindelijk af is, heb ik weer volop tijd om met je 23 sinterklazen en pieten te knutselen, memorie te spelen en natuurlijk heel veel frozen puzzels maken. Katka ik vind het altijd heerlijk om met jouw over het onderzoek te discussiëren, met jouw kennis vanuit een andere hoek, kan je dingen op manieren benaderen waar ik nooit bij heb stilgestaan. Ik ben je heel erg dankbaar voor ruimte die je mij altijd gegeven hebt en nog steeds geeft om mijn onderzoek en klinisch werk allemaal te kunnen doen. Dank voor al die weekenden en avonden die jij hebt gecoverd omdat ik nog aan het werk, stage of congres was. Heel veel dank voor de alle knuffels maar ook voor de schoppen onder mijn kont als het nodig was om de promotie te kunnen afronden. Ďakujem, veľmi Ťa milujem.