



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

More than meets the nose

Boersma, M.R.

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Boersma, M. R. (2018). More than meets the nose: Regulation of floral scent biosynthesis in *Petunia*

General rights

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

Disclaimer/Complaints regulations

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

SUMMARY

Floral volatile benzenoids and phenylpropanoids (FVBPs) emitted by *Petunia* can attract pollinators. Variation in the composition of the FVBP mixture and the timing of their emission is linked with pollinator preferences. We used the recently sequenced genomes of *P. axillaris axillaris* N (*PaxiN*) and *P. integrifolia inflata* S6 (*PinfS6*) to determine the genetic basis of differences in FVBP biosynthesis and emission between these two wild *Petunia* species (CHAPTER 1). First we measured FVBP biosynthesis and emission by *PaxiN* and *PinfS6*. Our data confirmed that *PaxiN* emits a bouquet of volatiles in a rhythmic manner, peaking at the onset of the dark period. We confirmed that *PinfS6* emits high amounts of benzaldehyde and showed that its biosynthesis and emission are also rhythmic. Benzaldehyde biosynthesis and emission peak during daytime in *PinfS6*. Moreover, *PinfS6* also emits small amounts of isoeugenol and eugenol (CHAPTER 2). Studying the genomes of *PaxiN* and *PinfS6* did not reveal the genetic basis of the differences in FVBP biosynthesis and emission (CHAPTER 1). Therefore we studied the transcript levels of FVBP biosynthetic genes, regulators and transporters at the onset of the dark period, when both species make FVBPs. Transcript levels of many FVBP genes was higher in the fragrant *PaxiN* compared to the less fragrant *PinfS6*, from which *PaxiN* is derived. For example the transcription factor *PH4*, which regulates emission of FVBPs, is higher expressed in *PaxiN* than *PinfS6*. This could explain the higher rate of FVBP emission that we observed in *PaxiN* (CHAPTER 2). Interestingly, the rhythm of the transcript levels of a key transcriptional regulator of the pathway, *ODORANT1* (*ODO1*), was similar in *PaxiN* and *PinfS6* (CHAPTER 2). This is surprising because *ODO1* is known to regulate the timing of FVBP biosynthesis in *Petunia*. We propose that a different regulator, possibly EMISSION OF BENZENOIDSI (EOBI), causes the difference in timing of FVBP biosynthesis between *PaxiN* and *PinfS6* (CHAPTER 6).

ODO1 is known to regulate the precursor supply to the FVBP pathway by binding to the promoter of *5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE1* (*EPSPS1*). We showed that not only *EPSPS1*, but most genes in the shikimate, aroenate and C₆-C₃ branch of the FVBP pathway are regulated by *ODO1*. This was observed when comparing the transcript levels of these genes between *P. hybrida* cv. W115 wild type plants and an *ODO1* silenced line (*ODO1-ir*) and confirmed by chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) of *P. hybrida* cv. W115 pODO1:GFP-*ODO1* plants (CHAPTER 3). Especially *L-PHENYLALANINE AMMONIA LYASE1* (*PAL1*), *EPSPS1* and *ISOEUGENOL SYNTHASE* (*IGS*) are under strict transcriptional regulation of *ODO1* (CHAPTER 3). Interestingly, in *PaxiN* also many genes in the shikimate, aroenate and C₆-C₃ branches are higher expressed compared to *PinfS6* (CHAPTER 2). This might be caused by the slightly higher expression of *ODO1*

in *PaxiN* compared to *PinfS6* (CHAPTER 2). While the precursor supply of the FVBP pathway and biosynthesis of C₆-C₃ volatiles is regulated by ODO1, the C₆-C₂ and C₆-C₁ branches of the FVBP pathway seem not to be under strict control of ODO1 (CHAPTER 3). Unlike the majority of the shikimate, arogenate and C₆-C₃ genes, the genes in the C₆-C₁ and C₆-C₂ pathways do not display a general increase or decrease upon silencing of *ODO1* (CHAPTER 3&6). The C₆-C₁ and C₆-C₂ genes *CINNAMATE-COA LIGASE1 (CNL1)*, *S-ADENOSYL-L-METHIONINE:BENZOIC ACID/SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE1 (BSMT1)* and *BENZOYL-COA:BENZYLALCOHOL/2-PHENYLETHANOL BENZOYLTRANSFERASE1 (BPBT1)* are known to play an important role in the evolution of FVBP biosynthesis and pollination. However, the transcriptional regulation of these branches and genes remains poorly understood (CHAPTER 6). We mined the RNA-sequence data of the *P. hybrida* cv. W115 *ODO1*-silenced line to identify unknown regulators of FVBP biosynthesis. We have identified five transcription factors with a putative role in FVBP biosynthesis. In addition we identified two copies of *PHOSPHOLENOLPYRUVATE TRANSPORTER (PEPT)* and *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD)*. Silencing of *CAD1* and *CAD2* showed that *CAD1* is involved in the precursor supply for isoeugenol and eugenol biosynthesis (CHAPTER 3).

In the second part of this thesis we have switched the focus to regulation at the protein level. Regulation of the FVBP pathway has mainly been studied at the genomic and transcript level. However, transcript levels do not necessarily translate directly to protein levels and protein activity. For example, activity level of PAL, but not of BSMT, has been shown to correlate with its transcript level. We showed that ODO1 protein levels are low in the morning and high in the evening, similar to the transcript levels of *ODO1* (CHAPTER 4). Rhythmic turnover of ODO1 proteins is required for ODO1 to determine the rhythmicity of the FVBP pathway and confirms the key role of ODO1 in regulating FVBP biosynthesis. This cycling of ODO1 at the protein level indicates that ODO1 is actively targeted for degradation by for example ubiquitination or phosphorylation. Immunoprecipitation and western-blotting of GFP-tagged ODO1 revealed a posttranslational modification of ODO1 (CHAPTER 4). This modification had the same size as INTERACTING PARTNER OF ODO1 number 2 (IPO2) identified by a yeast-2-hybrid (Y2H). Besides IPO2, ODO1 also interacts with IPO1. IPO1 and IPO2 could potentially change the activity or localization of ODO1 (CHAPTER 5). Surprisingly IPO1 and IPO2 are not the type of proteins that are usually found to interact with MYB transcription factors such as ODO1. The other transcription factors (WRKY3, WRKY4, HSTF-B3 and HSF24) identified in the *ODO1* silenced RNA-seq data, besides MYB308, are also not the typical phenylpropanoid and benzenoid regulators (CHAPTER 3). Therefore we propose that these putative, atypical regulators of FVBPs biosynthesis and the regulation at the protein level of proteins involved in FVBP biosynthesis and emission needs further investigation (CHAPTER 6).

SAMENVATTING

De bloemgeur van *Petunia* bestaat uit vluchtige benzenoïde en fenylpropanoïde geurstoffen, die bestuivers kunnen aantrekken. De tijd waarop de bloemgeur wordt gemaakt en de kwalitatieve en kwantitatieve samenstelling van de bloemgeur houden verband met het type bestuiver van de specifieke *Petunia* soort. Wij hebben de recentelijke gepubliceerde genoom sequenties van twee verschillende wilde *Petunias*, *P.axillaris axillaris N (PaxiN)* en *P. integrifolia inflata S6 (PinfS6)*, gebruikt om de genetische basis verantwoordelijk voor de verschillen in bloemgeurbiosynthese en emissie tussen deze twee *Petunia* soorten te bestuderen (Hoofdstuk 1). De complex geurende *PaxiN* is waarschijnlijk een afstammeling van de minder complex geurende *PinfS6*. Allereerst hebben wij de samenstelling van de bloemgeur en het ritme van bloemgeurbiosynthese en emissie bepaald in deze *Petunia*'s. Onze metingen bevestigen dat bloemgeurbiosynthese en emissie ritmisch is in *PaxiN*. *PaxiN* begint 's avonds met het maken van een bloemgeur bestaande uit verschillende vluchtige benzenoïde en fenylpropanoïde stoffen. Wij hebben ook bevestigd dat *PinfS6* voornamelijk benzaldehyde maakt. Bovendien is de productie van benzaldehyde ritmisch en begint deze overdag in *PinfS6*. Daarnaast produceert *PinfS6* ook kleine hoeveelheden eugenol en isoeugenol (Hoofdstuk 2). Het bestuderen van de genoomsequenties van *PaxiN* en *PinfS6* is niet voldoende om te begrijpen welke genetische verschillen verantwoordelijk zijn voor het verschil in bloemgeurbiosynthese en emissie tussen deze *Petunia*'s (Hoofdstuk 1). Daarom hebben wij 's avond, op het moment dat zowel *PinfS6* als *PaxiN* bloemgeur maken, de transcriptieniveaus van genen die betrokken zijn bij de biosynthese, regulatie en transport van bloemgeur bepaald. De transcriptieniveaus van veel van deze genen zijn hoger in *PaxiN* dan in *PinfS6*. Een voorbeeld hiervan is transcriptiefactor PH4. PH4 reguleert emissie van bloemgeur en de transcriptieniveaus van PH4 zijn hoger in *PaxiN* dan in *PinfS6*. Dit zou kunnen verklaren waarom *PaxiN* een hogere emissieratio van bloemgeur heeft dan *PinfS6* (Hoofdstuk 2). De transcriptiefactor ODORANT1 (ODO1) is een belangrijke regulator van bloemgeurproductie in *Petunia*. Het is eerder aangetoond dat in sommige *Petunia*'s de dagelijkse cyclus in ODO1 expressie de timing van bloemgeurproductie bepaalt. Het verbaast dan ook dat er geen verschillen te vinden zijn tussen *PaxiN* en *PinfS6* in hun dagelijkse ODO1 expressie die het verschil in timing van bloemgeurproductie kunnen verklaren. In plaats daarvan denken wij dat een andere transcriptiefactor, mogelijk EMISSION OF BENZENOIDSI (EOBII), verantwoordelijk is voor het verschil in timing van bloemgeurproductie tussen *PaxiN* en *PinfS6* (Hoofdstuk 6).

Het is bekend dat ODO1 de precursoraanvoer voor bloemgeurproductie, en daarmee bloemgeurproductie zelf, reguleert door te binden aan de promotor van 5-

ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE1 (EPSPS1). Wij hebben aangetoond dat ODO1 naast *EPSPS1* het grootste deel van de biosynthesegenen in de shikimate, arogenate en C₆-C₃ routes reguleert (Hoofdstuk 3). Wij hebben dit laten zien door de transcriptieniveaus van deze genen te vergelijken tussen wild type *P. hybrida* cv. W115 en een transgene *P. hybrida* cv. W115 lijn waarin *ODO1* expressie onderdrukt wordt door middel van RNAi (*ODO1-ir*). Dit hebben wij bevestigd met chromatin-immunoprecipitatie van ODO1 en daaropvolgend het sequencen van de gebonden DNA fragmenten (ChIP-seq) in *P. hybrida* cv. W115 pODO1:GFP-ODO1 planten (Hoofdstuk 3). Vooral *L-PHENYLALANINE AMMONIA LYASE1 (PAL1)*, *EPSPS1* en *ISOEUGENOL SYNTHASE (IGS)* blijken sterk door ODO1 gereguleerd te worden (Hoofdstuk 3). Vergeleken met *Pinfs6* komen in *PaxiN* ook veel genen in de shikimate, arogenate en C₆-C₃ route hoger tot expressie (Hoofdstuk 2). Het kan zijn dat dit veroorzaakt wordt door een iets hogere expressie van *ODO1* in *PaxiN* vergeleken met *Pinfs6* (Hoofdstuk 2). Waar de precursoraanvoer voor geurproductie en de C₆-C₃ route gereguleerd worden door ODO1, lijken de C₆-C₂ en C₆-C₁ routes van de FVBP route niet sterk gereguleerd te worden door ODO1 (Hoofdstuk 3). De transcriptieniveaus van de biosynthesegenen in deze routes laten niet een duidelijk stijgende of dalende trend zien wanneer *ODO1* onderdrukt wordt (Hoofdstuk 3 en 6). Alhoewel het bekend is dat de C₆-C₂ en C₆-C₁ genen *CINNAMATE-COA LIGASE1 (CNL1)*, *S-ADENOSYL-L-METHIONINE:BENZOIC ACID/SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE1 (BSMT1)* en *BENZOYL-COA:BENZYLALCOHOL/2-PHENYLETHANOL BENZOYLTRANSFERASE1 (BPBT1)* een belangrijke rol spelen in de evolutie van geurproductie en bestuiving, is het onbekend hoe deze genen transcriptioneel gereguleerd worden (Hoofdstuk 6). Wij hebben de RNA-seq dataset van de *P. hybrida* cv. W115 *ODO1-ir* lijn gebruikt om nieuwe transcriptiefactoren te vinden met een mogelijke rol in geurproductie. Naast vijf transcriptiefactoren hebben wij twee kopieën van een *PHOSPHOLENOLPYRUVATE TRANSPORTER (PEPT)* en *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD)* gevonden. Door *CAD1* te silencen met RNAi hebben wij laten zien dat *CAD1* een rol speelt in de biosynthese van isoeugenol en eugenol (Hoofdstuk 3).

In het tweede deel van deze thesis hebben wij de focus gelegd op de rol van eiwitniveaus en eiwit-eiwitinteracties in de regulatie van geurproductie. Hoewel transcriptieniveaus niet altijd direct te vertalen zijn naar eiwitniveaus en activiteit, is de regulatie van geurproductie voornamelijk bestudeerd op genetisch en transcriptieniveau. Het is bijvoorbeeld bekend dat de activiteitniveaus van *PAL* niet gerelateerd zijn aan de transcriptieniveaus van *PAL*, terwijl de activiteitniveaus van *BSMT* wel gerelateerd zijn aan de transcriptieniveaus van *BSMT*. Wij hebben laten zien dat de eiwitniveaus van ODO1 laag zijn in de ochtend en hoog in de avond, vergelijkbaar met de transcriptieniveaus van *ODO1* (Hoofdstuk 4). Dit is belangrijk omdat ODO1 anders niet het ritme van geurproductie zou kunnen bepalen. Dit

bevestigt dat ODO1 een sleutelrol heeft in de regulatie van geurproductie. De sterke wisseling in ODO1 eiwitniveaus gedurende de dag suggereert dat ODO1 actief afgebroken wordt door bijvoorbeeld het binden van ubiquitin of door fosforylatie. Immunoprecipitatie en anti-GFP western-blots van GFP-ODO1 onthullen een posttranslationale modificatie van ODO1 (Hoofdstuk 4). De geschatte omvang van deze modificatie (12 kDa) komt overeen met de voorspelde grootte van een interactie partner van ODO1 (IPO2) gevonden door middel van een yeast-2-hybrid (Y2H) screen. Naast IPO2 blijkt ODO1 met nog een ander niet-gekaracteriseerd eiwit (IPO1) te interacteren, welke mogelijk de activiteit of lokalisatie van ODO1 kan veranderen (Hoofdstuk 5). Deze interacterende partners van ODO1 zijn niet de gebruikelijke interacterende partners van MYB transcriptiefactoren zoals ODO1.

De meeste transcriptiefactoren geïdentificeerd in de ODO1-ir RNA-seq dataset (WRKY3, WRKY4, HSTF-B3 and HSF24) zijn niet de gebruikelijke regulatoren van benzenoïde en fenylpropanoïde biosynthese (Hoofdstuk 3). Daarom stellen wij voor dat deze potentiële, maar ongebruikelijke regulators van geurproductie, en de regulatie van geurproductie op eiwitniveau verder onderzocht moeten worden (Hoofdstuk 6).

DANKWOORD

The big advantage of taking a bit longer for you PhD is that you get to meet even more friendly and fascinating people. Everywhere along the road; in the lab and office, during lunchtime and at conferences, at the bit less scientific events such as the SILS drinks and Friday afternoon borrels, but also during my travels in other parts of the world, I have met people that contributed to this work in one way or the other. I am grateful to everyone who played a part during my PhD or in finishing my PhD. Thank you for the gezelligheid, fun, and support you have brought into this adventure.

Rob, het is alweer een aantal jaar geleden dat ik als masterstudent in jouw lab rondliep waarna we samen begonnen zijn aan het schrijven van dit project. Ik ben er trots op dat we het samen afgemaakt hebben. Dankjewel voor je wetenschappelijke en persoonlijke adviezen afgelopen jaren, en bedankt voor je oprechtheid.

Michel, bedankt voor onze discussies over mijn boekje. Ik ben blij dat we toch nog een laatste krachtinspanning hebben geleverd om mijn promotie af te maken.

Congratulations Fariza for finishing your PhD, you can be proud of yourself! Thank you for sharing time-courses, Friday afternoon plant-transfer-trips to the greenhouse and *Petunia's*. I am happy that we are also sharing our defenses. Michel jij was altijd onze grootste, onvoorwaardelijke *Petunia* fan, dankjewel voor al je support. Jouw experimentele hulp, managen van het lab, luidkeels meezingen met de radio en gezellige roddels maakte het volatile lab een dynamisch lab. Petra, de masterstage bij jou overtuigde mij om door te gaan in de moleculaire planten biologie, en om uiteindelijk een PhD voorstel te schrijven in Robs lab. Dankjewel voor jouw inspiratie, enthousiasme en gezelligheid. Mijn stage in de groep van Ronald en Fransesca met Tijs heeft mij vervolgens de wondelijke wereld van *Petunia's* binnengeleid.

I would like to thank all the people from the volatile lab for their support and for the fun in the lab. I have learned that not only scent production by *Petunia's*, but also productivity in the lab is rhythmic. From early in the morning until late in the evening the lab was buzzing with colleagues. But at night, when I was collecting time-courses, there was an unusual silence in the lab. Only interrupted by the humming of freezer and shakers. Although. On some of these nights there was light in an office, where Arjen was still working on a manuscript. Everyone had its own rhythm. In the morning you could count on the fresh set of post docs. Aldana, Paula and Ahmed, thank you for your refreshing input in meetings and the lab. Suzanne, dankjewel voor jouw bijdrage aan het reilen en zeilen van het lab. In the evening there were other labmates I could count on. Thank you Jiesen, that I could always count on a warm

welcome. Pulu, thank you for the company in the evenings, when I was making figures while you were very loyal practicing your French. At the end of their projects, PhD's tend to become permanent inhabitants of the UvA. Carlos, thank you that I could always turn around and ask you for help when I was analyzing my data. Alessandra, thank you for relieving stress together in the office by watching movies of cats. And thank you for saving my phone on many occasions. De bezetting van het lab was altijd in beweging, en de constante toestroom van studenten en gasten bracht altijd veel gezelligheid in het lab. Het was leuk om de onbevangen verbazing van de studenten over gels, competente cellen, stikstof en ander soortige biologie te zien. In het bijzonder wil ik mijn masterstudenten Rachelle en Jerom bedanken, die allebei veel werk hebben verzet. Bedankt voor jullie bijdrage aan dit boekje. Silke and Eleni, with some breaks, you were around the lab most of my PhD (and made sure everyone worked safely in the fume hood). Silke thank you for your advises on statistics and Eleni for help with protocols. Petra jij groeide tijdens mij PhD steeds meer van het lab naar het kantoor, gelukkig heb jij dit gemis gevuld door allemaal leuke mensen aan te nemen. Michelle and Aleksandra, you were always friendly, in for a chat and made me smile, thank you. Marc, if you happened to leave your computer for the lab you were always up to changing protocols. Thank you for bringing hapiness along. En natuurlijk Ruy, zonder jou (als drinkmaatje) was het einde een stuk minder gezellig geweest. I would also like to thank Rosanna and Lisa, who along with Michel, Alessandra, Eleni, Petra, Silke and Fariza showed me around the lab at the start. Ik wil Julian en Alex bedanken, die voor Fariza en mij *Petunia* op de kaart zetten in het volatile lab, en wiens boekjes mijn meest waardevolle naslagwerken waren.

Natuurlijk begaf ik mij ook wel eens buiten het volatile lab, bijvoorbeeld om begeleid door happy hardcore in het eiwitlab gelletjes te runnen, iets te lenen bij de door Petra altijd goed bevoorrade fyto's of even te relativeren bij de meest uiteenlopende onderwerpen tijdens lunch. Ik wil Ringo bedanken dat het niet zo vaak nodig was om iets van de fyto's te lenen, dankzij jou en Michel waren er een hoop minder dingen waarover wij als PhDs ons zorgen over hoefden te maken in het lab. Harold, Thijs en Ludek, dank jullie wel voor alle ondersteuning in de kas. In het speciaal wil ik Ludek bedanken voor alle goede zorgen voor de *Petunia's*. Teun en Christa, dank jullie wel voor het meedenken tijd de Plant Phys meetings. Kathrin, Mara, Ido, Shermineh, Magda, Like, Peter and Ruy thank you for organizing all the fun or scientific activities with me, I enjoyed it. In het bijzonder Peter, bedankt dat jij altijd mijn enthousiasme deelde om weer iets leuks te gaan organiseren. Rachid, Till, Linda, Dorota, Ruy, Peter, Ringo, Petra, Cris en vele andere gezellige collegas, bedankt voor alle mooie herinneringen aan dansen en biertjes op de UvA, of als het lukte om de UvA te verlaten op andere locaties (The end en dan eindigen in the San Francansico.....), een legendarisch boottochtje, die ene pokeravond en alle andere feestelijkheden.

Hanna, dankjewel dat ik jouw mooie uitzicht over mocht nemen, en Louison en Magda bedankt dat jullie dit uitzicht allebei een tijdje met mij hebben gedeeld. I would like to thank all my colleagues from the lipid lab, plant pathology and developmental genetics groups for sharing lunches, coffee breaks, meetings, drinks and chats on the hallway. You made my time at the UvA unforgettable.

Mijn familie en vrienden weten als geen ander dat mijn PhD niet over rozen ging. Ik ben jullie dankbaar voor al jullie steun, geduld, afleiding en gezelligheid de afgelopen jaren. De laatste jaren zijn zwaar geweest, en jullie hebben mij er doorheen gesleept. Ik kijk ernaar uit om weer gelukkigere tijden met jullie te delen. Ik wil mijn roeimaatjes bedanken voor jullie luisterend oor, dat jullie wanneer het nodig was mij in een boot gooide voor wat roeithapie, en alle gezelligheid. Cefas, Joram en Thomas, ik ben blij dat ik jullie zus ben, en dat ik weet dat jullie er altijd voor mij zullen zijn. Thomas, dankjewel dat je altijd voor mij klaar staat, ook om gewoonweg een biertje te drinken. Kim dankjewel voor je vriendschap door de jaren heen, voor een vertouwdheid die er altijd direct is, ook al hebben we elkaar een tijd niet kunnen zien. Winnie, bedankt voor alle goede gesprekken en vele biertjes, dat we er nog veel mogen hebben van allebei.

Papa en mama, jullie waren erbij om het binnenhalen van mijn beurs te vieren en om straks mijn promotie te vieren. En jullie waren er altijd, de lange, soms moeizame weg daartussen in. Mama ik heb veel gehad aan jouw advies om ook altijd iets te doen wat ik leuk vind en wat zeker weten lukt. Dank jullie wel voor jullie vertrouwen in mij en jullie onvoorwaardelijke liefde, het is goed om te weten dat ik met jullie altijd een thuis heb. Lieve Allison, ook jij bent voor mij als een vertrouwd thuis. De laatste jaren voelde voor mij alsof alles veranderde, en soms wist ik niet goed waar ik op kon vertrouwen. Dankjewel dat ik altijd op jou kon en kan rekenen. Helaas kan jij mijn paranimf niet zijn, ik ben blij dat je te druk bent met een ander klein mensje. En in de toekomst komen nog genoeg mogelijkheden om samen te proosten met een biertje. Tenslotte mijn paranimfen, Aike en Joost. Jullie zijn naast mij komen staan op het einde, en waren mijn schouders als ik het zelf niet meer kon. Zonder jullie zou er geen boekje zijn. Aike, dankjewel voor alle vakanties (in eigen land), pizza's, zeur-tien-minuutjes voor het roeien, en avonturen op de Amstel. Ik weet zeker dat we nog vele avonturen zullen beleven.

Joost, dankjewel voor al je aanmoedigen om dit boekje af te maken op een manier die goed was voor mij. Je bent mijn lieve rots. Jouw geduld, liefde, trouw, oprechtheid, meeleven, nieuwsgierigheid en uitgesproken meningen in de afgelopen jaren geven mij alle vertrouwen om samen te beginnen aan onze toekomst in Utrecht (met Guusje).