



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

G-protein and Rho GTPase signaling in endothelial barrier regulation

Reinhard, N.R.

Publication date

2019

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Reinhard, N. R. (2019). *G-protein and Rho GTPase signaling in endothelial barrier regulation*.

General rights

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

Disclaimer/Complaints regulations

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

Appendices

Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

List of Publications

Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Ons bloedvatenstelsel bestaat uit een omvangrijk netwerk met een lengte van wel 100.000 kilometer. Dit vatenstelsel heeft als doel om bloed rond te pompen door het menselijk lichaam, waarbij onze organen worden voorzien van zuurstof en voedingsstoffen, terwijl afvalstoffen worden afgevoerd. De regulatie van deze processen is cruciaal omdat ons vatenstelsel essentieel is voor het “gezond” functioneren van het menselijk lichaam.

De binnenste laag van al onze bloedvaten bestaat uit een enkele laag van endotheelcellen, ook wel het endotheel genoemd. Hoewel lang werd gedacht dat endotheelcellen functioneren als een passieve laag cellen die enkel de bloedstroom faciliteren, is het nu algemeen geaccepteerd dat deze specifieke cellen een dynamische en actieve rol spelen in het functioneren van het vatenstelsel en de achterliggende weefsels en organen. Zo zijn endotheelcellen onder andere betrokken bij het reguleren van de bloeddruk en bloedstolling, het vormen van nieuwe bloedvaten, een goede doorbloeding van organen en de regulatie van ons afweermecanisme. Door de betrokkenheid van endotheelcellen bij deze cruciale functies, is het niet verrassend dat disregulatie van endotheel-gemedieerde functies aan de basis staat van vele ziekte-gerelateerde processen, waaronder: lekkage van bloedvaten, vochtophoping, atherosclerose (aderverkalking), ontstekingen, het afsterven van weefsel (bv. bij diabetes), en metastase (uitzaaiingen bij kanker).

De bovengenoemde normale, en ziekte-gerelateerde processen zijn sterk afhankelijk van een specifieke functie van endotheelcellen, namelijk: de regulatie van de endotheel barrièrefunctie. In de gezonde situatie liggen endotheelcellen dicht tegen elkaar aan waarbij zij cel-cel contacten maken. Deze cel-cel contacten gaan lekkage van onze bloedvaten tegen en voorkomen de passage van grote hoeveelheden vocht of bloedcellen vanuit de bloedbaan naar de weefsels. Aan de andere kant zorgt de regulatie van deze cel-cel contacten ervoor dat er een goede balans blijft bestaan tussen bloed en weefsels met betrekking tot het uitwisselen van vocht en immuun cellen. Dit principe vereist complexe en dynamische eigenschappen van het endotheel, waarbij aanwezige moleculen in endotheelcellen functioneel met elkaar verbonden zijn in zogeheten signaleringsroutes. In onze studies hebben wij ons gericht op verscheidene moleculen en signaleringsroutes die van belang zijn voor de regulatie van endotheelcel-cel contacten en daarbij de endotheel barrièrefunctie beïnvloeden.

In **hoofdstuk 2** introduceren wij de Rho GTPases, een groep moleculen die endotheelcel-cel contacten beïnvloeden via regulatie van het zogeheten actine cytoskelet, ook wel het raamwerk van de cel genoemd. Over de jaren heen zijn er meer dan 20 Rho GTPases gekarakteriseerd, elk met unieke eigenschappen, waarvan een deel de endotheel barrièrefunctie zowel positief als negatief kan beïnvloeden. Centraal in onze studies staan de Rho GTPases Rac1, Cdc42, RhoA, RhoB en RhoC, die meermaals terug zullen komen in het vervolg van deze samenvatting. Hoewel deze Rho GTPases al decennialang onder grote belangstelling staan, zijn er momenteel nog veel onbeantwoorde vraagstukken. Onderzoek hiernaar wordt onder andere bemoeilijkt door het feit dat deze Rho GTPases erg verwant zijn aan elkaar en het zeer complex is om

specifieke functies te ontrafelen. Daaraan gerelateerd is er een gebrek aan technische middelen om deze specificiteit te bestuderen.

In **hoofdstuk 3** hebben wij de specificiteit van RhoA, RhoB en RhoC in het endotheel onderzocht met vernieuwende moleculaire en microscopische technieken. We hebben ons gericht op deze 3 Rho GTPases, die qua structuur erg veel op elkaar lijken, om te achterhalen wat de verschillen zijn in functie en regulatie in het endotheel. Met zogeheten Förster resonance energy transfer (FRET) microscopie hebben wij dit bovendien kunnen onderzoeken in individuele endotheelcellen, tot op de micrometer nauwkeurig. Deze aanpak heeft ons nieuwe inzichten opgeleverd wat betreft de signaleringsmechanismen van RhoA, RhoB en RhoC. Zo hebben wij in **hoofdstuk 3** de activiteit van deze Rho GTPases in kaart gebracht onder invloed van Thrombine, een stimulus die belangrijk is voor de bloedstolling in het menselijk lichaam en de endotheel barrièrefunctie negatief kan beïnvloeden. Vervolgens hebben wij in **hoofdstuk 4** het gebruik van FRET microscopie nog verder kunnen uitbreiden, richting een meer fysiologisch-relevante context. Met behulp van een geavanceerd systeem hebben wij de menselijke bloedstroom na kunnen bootsen en tegelijkertijd de activiteit van RhoA, RhoB en RhoC binnen het endotheel verder in beeld kunnen brengen.

Het bestuderen van Rho GTPases alleen is onvoldoende om grote en complexe signaleringsnetwerken te kunnen begrijpen binnen de endotheelbarrière regulatie. **Hoofdstuk 5** richt zich daarom op een essentieel molecuul (G_{13}) dat Rho GTPases reguleert. Daaraan toegevoegd, staan de **hoofdstukken 6, 7 en 8** in teken van complete signaleringsnetwerken die de endotheel barrièrefunctie beïnvloeden. Hierin presenteren wij een dynamisch netwerk van Rho GTPases en regulatoren onder invloed van sphingosine-1-fosfaat (S1P). S1P is een lipide (vetzuur) dat in grote hoeveelheden wordt geproduceerd in het menselijk lichaam. Onder gezonde omstandigheden zorgt S1P voor een verhoogde endotheel barrièrefunctie. Echter, kan dit verstoord raken en de gezondheid negatief beïnvloeden. Onze studie heeft nieuwe inzichten opgeleverd wat betreft de regulatie van deze processen. Wij hebben onder andere nieuwe regulatoren onthult, zoals pRex1 en Cdc42, omschreven in **hoofdstuk 8**. Uiteindelijk hebben de studies in **hoofdstuk 5-8** geresulteerd in een dynamisch model dat de regulatie van de endotheel barrièrefunctie samenvat. Hierbij laten wij zien dat S1P antagonistische signaleringsroutes aanzet, bestaande uit de zogeheten barrière bevorderende S1PR1-Rac1 en S1PR1-G $\beta\gamma$ -pRex1-Cdc42, en barrière disruptieve S1PR2-G $_{13}$ -Rho signaleringsroutes. In het gezonde endotheel ligt de nadruk op S1PR1-Rac1 en S1PR1-G $\beta\gamma$ -pRex1-Cdc42 signalering, waardoor S1P de barrièrefunctie bevordert. Echter, kan dit evenwicht vanuit verscheidene invloeden verstoord raken. Hierbij krijgt de S1PR2-G $_{13}$ -Rho signaleringsroute de overhand, met een verlaging van de endotheel barrièrefunctie als gevolg. Deze verstoring van het evenwicht is desastreus en kan bijdragen aan het ontwikkelen van meerdere vasculair-gemedieerde ziektebeelden, waaronder ontstekingen, kanker en atherosclerose.

Samenvattend hebben onze studies verscheidene moleculen en signaleringsroutes ontrafeld die van belang zijn voor de regulatie van de endotheel barrièrefunctie. Hoewel de regulatie van het endotheel, en daarbij het vatenstelsel, complex en omvangrijk is, is er cruciale,

moleculaire kennis gegenereerd. Dit heeft onder andere bijgedragen aan het beantwoorden van grote vragen, zoals: “Hoe wordt de endotheel barrièrefunctie gereguleerd in ziekte en gezondheid?”, en “Wat zijn belangrijke eiwitten en signaleringsroutes voor potentiële therapieën tegen endotheel-gemedieerde ziektes?” Vanzelfsprekend zijn antwoorden op deze vragen essentieel voor de gezondheid van ons vatenstelsel en de mens, waarbij de resultaten in dit proefschrift nieuwe aanknopingspunten geven voor vervolgonderzoek.

CURRICULUM VITAE

Nathalie Reinhard was born on the 16th of February in Almere, The Netherlands. After obtaining her VWO diploma at the Luzac College, she continued her studies at the University of Amsterdam. In 2011, she graduated for the Bachelor Psychobiology, with a major in Cell Biology. At the end of 2011, Nathalie started her Master education in Biomedical Sciences, with a major in Cell Biology and Advanced Microscopy. During this Master program, she performed two research internships. The first internship was under the supervision of Dr. J. van Unen and Dr. J. Goedhart, in the lab of Prof. Dr. T.W.J. Gadella, at the Molecular Cytology department, University of Amsterdam. Here she studied the activation and subcellular localization of the exchange factor p63RhoGEF. Her second internship she performed in the lab of Dr. T. Balla, at the department of Molecular Signal Transduction, National Institutes of Health, Bethesda, USA. Under daily supervision of T. Balla, Nathalie studied the role of PIP₂ signaling in G-protein coupled receptor activation. In October 2013, Nathalie started as a PhD student. The first two years of her research, she performed at the Molecular Cell Biology department at Sanquin Research, Amsterdam, under the supervision of P.L. Hordijk. She continued this PhD project at the University of Amsterdam, in the Molecular Cytology department of Prof. Dr. T.W.J. Gadella, under daily supervision of Dr. J. Goedhart. The results of this collaborative research project are presented in this thesis. Since April 2018, Nathalie continued her scientific career in the group of Dr. S. Huveneers, at the Medical Biochemistry department at the Amsterdam University Medical Center, location AMC.

LIST OF PUBLICATIONS

Mastop, M., **Reinhard, N.R.**, Zuconelli, C.R., Terwey, F., Gadella, T.W. J., van Unen, J., Adjobo-Hermans, M.J.W. and Goedhart, J. (2018). A FRET-based biosensor for measuring Gα₁₃ activation in single cells. *PLoS One* **13**, e0193705.

Amado-Azevedo, J., **Reinhard, N.R.**, van Bezu, J., van Nieuw Amerongen, G.P., van Hinsbergh, V.W.M. and Hordijk, P.L. (2018). The minor histocompatibility antigen 1 (HMHA1)/ArhGAP45 is a RacGAP and novel regulator of endothelial integrity. *Vascular Pharmacology* **101**, 38-47.

Reinhard, N.R., Mastop, M., Yin, T., Wu, Y., Bosma, E.K., Gadella, T.W.J., Goedhart, J. and Hordijk, P.L. (2017). The balance between Gα_{12/13}-Cdc42/Rac and Gα_{12/13}-RhoA pathways determines endothelial barrier regulation by sphingosine-1-phosphate. *Molecular biology of the Cell* **28**, 3371-3382.

Amado-Azevedo, J., **Reinhard, N.R.**, van Bezu, J., de Menezes, R.X., van Beusechem, V.W., van Nieuw Amerongen, G.P., van Hinsbergh, V.W.M. and Hordijk, P.L. (2017). A CDC42-centered signaling unit is a dominant positive regulator of endothelial integrity. *Scientific Reports* **7**, 10132.

Reinhard, N.R., van Helden, S.F., Anthony, E.C., Yin, T., Wu, Y., Goedhart, J., Gadella, T.W.J. and Hordijk, P.L. (2016). Spatiotemporal analysis of RhoA/B/C activation in primary human endothelial cells. *Scientific Reports* **6**, 25502.

van Unen, J., Stumpf, A.D., Schmid, B., **Reinhard, N.R.**, Hordijk, P.L., Hoffmann, C., Gadella, T.W.J. and Goedhart, J. A new generation of FRET sensors for robust measurement of Gai1, Gai2 and Gai3 activation kinetics in single cells. *PLoS One* **11**, e0146789.

van Unen, J., **Reinhard, N.R.**, Yin, T., Wu, Y., Postma, M., Gadella, T.W.J. and Goedhart, J. (2015). Plasma membrane restricted RhoGEF activity is sufficient for RhoA-mediated actin polymerization. *Scientific Reports* **5**, 14693.

Bojjireddy, N., Guzman-Hernandez, M.L., **Reinhard, N.R.**, Jovic, M. and Balla, T. (2015). EFR3s are palmitoylated plasma membrane proteins that control responsiveness to G-protein-coupled receptors. *Journal of Cell Sciences* **128**, 118-128.

Schaefer, A., **Reinhard, N.R.** and Hordijk, P.L. (2014). Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* **5**, e968004.

DANKWOORD

Eindelijk is het dan zover... Na 5 jaar hard werken, mag ik beginnen aan het laatste hoofdstuk van mijn proefschrift. Doordat ik tijdens mijn PhD op twee locaties heb gewerkt, kan dit hoofdstuk van grote omvang worden. Maar als ik iedereen individueel ga bedanken, bestaat er natuurlijk de kans dat ik iemand vergeet. Toch wil ik deze laatste uitdaging aangaan, omdat mede dankzij jullie dit eindproduct tot stand is gekomen.

Dorus: als Master student ben ik begonnen bij de afdeling Moleculaire Cytologie en heb ik tijdens mijn stageperiode mijn eerste ervaring opgedaan op het lab. Hier ben ik enthousiast geraakt voor de wetenschap, mede dankzij de goede begeleiding, maar ook door de vrijheid die ik kreeg om als student een eigen project te leiden. Dit heeft er onder andere toe geleid dat ik een tweede Master stage heb mogen lopen in het lab van Tamas Balla, op het NIH in Bethesda. Ook mijn PhD heb ik (deels) op jouw afdeling mogen uitoefenen. Nu 7 jaar later heb ik ontzettend veel geleerd op zowel moleculair gebied als op het gebied van de microscopie. Ik wil je daarom graag bedanken voor alle leerzame en mooie jaren die ik bij Moleculaire Cytologie heb gehad.

Peter: als een van mijn promotoren wil ik je graag bedanken voor de begeleiding van de afgelopen 5 jaar. Hoewel ik fysiek maar twee jaar bij jou op het lab heb rondgelopen, stond jij altijd klaar voor advies en feedback. Ik heb dan ook met veel plezier voor jou gewerkt de laatste jaren. Misschien dat ik wat eigenwijs kon zijn, maar we zijn er altijd goed uitgekomen en ik heb zelfs jouw favoriete kymographs opgenomen in een van mijn hoofdstukken.

Joachim: graag wil ik jou bedanken voor al jouw enthousiasme en goede begeleiding van de afgelopen jaren. Ik heb jou stiekem wel eens een wandelende encyclopedie genoemd, want er zijn weinig vragen geweest waarbij ik niet bij jou terecht kon. Verder bewonder ik het feit dat jij uit alles het positieve kan halen, dat heeft mij vaak geholpen om met mindere resultaten om te gaan.

De leden van mijn promotiecommissie: Prof. Dr. Kees Jalink, Prof. Dr. Carsten Hoffmann, Prof. Dr. Eric A.J. Reits, Prof. Dr. Helmut W.H.G. Kessels, Prof. Dr. Elga de Vries en Dr. Jaap van Buul. Hartelijk dank voor het lezen en beoordelen van mijn proefschrift.

Jaap: hierboven al genoemd als commissielid. Toch wil ik jou graag nog bedanken voor al jouw enthousiasme en advies van de afgelopen jaren. Ook bedankt voor alle (sport)gesprekken die niks met werk te maken hebben gehad. Ik hoop voor ons allebei dat Federer en Nadal nog eens een Grand Slamfinale spelen.

Mijn paranimfen **Jos en Marieke**: hoewel ik mij realiseerde dat jullie elkaar niet eens kennen, wil ik jullie beide bedanken voor de leuke samenwerkingen en alle gezelligheid. Jos, ik heb dan wel niet veel met Trio gewerkt, ik kon altijd bij jou terecht voor hulp of advies, ook met dat ik al bij Sanquin weg was. Marieke, met dat jij vaak op onmenselijke tijden begon met werken, heb ik jou vaak maar halve dagen gezien. Evengoed bracht jij enorm veel gezelligheid mee. Ook bedankt voor alle poffertjes, koekjes, snoepjes, taartjes en nog heel veel meer.

Stephan: bedankt voor al jouw adviezen en ideeën tijdens mijn periode op Sanquin. Sinds een aantal maanden werk ik nu met veel plezier als Postdoc op jouw lab op het AMC. Ik hoop in de toekomst nog veel van jou te leren en samen te werken.

Mar en Coert: ook jullie bedankt voor alle adviezen, goede gesprekken en de leuke tijd op Sanquin.

Mark H: 7 jaar geleden heb ik tijdens jouw Advanced Microscopy cursus mijn eerste microscopie ervaring opgedaan. Bedankt voor alles dat je me geleerd hebt en ook om de Olympus enigszins te begrijpen.

Marten: zonder jouw macro was ik nog bezig geweest met de analyse van hoofdstuk 7. Erg bedankt voor al je hulp en ik hoop dat ik ooit net zoveel van Matlab en data-analyse mag afweten, als jij doet.

Renée: bedankt voor al jouw input en adviezen tijdens de Molcyto werkbijeenkomst.

Mijn “Peter” groepsgenoten op Sanquin, **Michel**: bedankt voor alle gezelligheid op het lab en achter de microscoop. Ondanks dat wij totaal uiteenlopende projecten hebben gehad (en ook wel eens een meningsverschilletje) heb ik een ontzettend leuke tijd met jou gehad. Ik heb altijd met veel bewondering gekeken naar alle papers die jij uit je hoofd wist. Bedankt ook voor de gezellige etentjes en drankjes, ik hoop dat we die erin houden. **Igor**: thanks for all the advice, coffee conversations and nice time in our office. **Antje**: thanks for the opportunity to collaborate in our review of chapter 2. **Eloise**: bedankt voor het wegwijs maken op het lab.

Timo, Yvonne en Tom: ook jullie bedankt voor de gezelligheid op kantoor. Timo, ik hoop je nog eens tegen te komen op een microscopie meeting. Yvonne, ik hoop dat we de borrels erin kunnen houden. En Tom, bedankt voor het oplossen van mijn computer problemen (sorry dat ik mijn Mac meebracht).

Jeffrey: bedankt voor de samenwerking bij het “flow” hoofdstuk. Helaas is het geen afgerond verhaal geworden, maar desondanks zijn er een aantal mooie proeven uitgekomen. Veel succes verder met je eigen research lijn op het AMC!

Niels: bedankt voor het wegwijs maken op de Nikon Observer. Aangezien de FRET proeven een groot deel zijn van mijn proefschrift, kan je wel stellen dat dit een grote bijdrage heeft geleverd.

Erik, Mark en Simon: hoewel jullie allen tot de faciliteit van Sanquin behoren, verdienen jullie natuurlijk een apart bedankje. Erik bedankt voor alle gezelligheid op kantoor, de mooie verhalen tijdens de lunch en jouw hulp met de microscopen. Natuurlijk ook bedankt voor jouw snoep pot, alleen nog steeds jammer van de M&M's met pinda. Mark, ik ben er nog steeds niet achter of er iets is waar jij niet mee kan helpen. Zonder jou was de Observer nog niet aligned geweest. Simon, jij kon altijd tijd maken om ergens mee te helpen. En mede dankzij jou staan er fatsoenlijke Western blots in dit boekje.

Ook andere MCB Sanquin groepsgenoten bedankt, **Dion:** bedankt voor de leuke gesprekken in de kweek. **Anne-Marieke:** bedankt voor je adviezen. Ik ben nog steeds onder de indruk van jouw geordendheid op het lab. **Kalim:** bedankt voor je gekke verhalen. Ik hoop dat je mij nog eens belt als je een walvis hebt gezien. **Corry:** wat zouden ze op Sanquin zonder jou moeten. Ook bij de borrels was jij onmisbaar.

Mijn "Joachim" groepsgenoten op de UvA, **Kobus:** wij zijn heel even groepsgenoten geweest voordat jij naar Zwitserland vertrok. Veel langer ben je mijn begeleider geweest tijdens mijn eerste Master stage. Bedankt voor de leuke tijd en de samenwerking voor jouw p63 en Gi verhaal. **Anna P:** thanks for the nice time in the lab and your feedback during our work discussions. **Anna C:** bedankt voor de gezelligheid en het kloneren van de pRex1 constructen. Ik kom snel een keer bij je op de koffie! **Sergei:** thanks for the nice time and your "fresh" energy. I still can't believe that someone can wear shorts and flipflops during winter

Mijn UvA "mScarlet" kamergenoten: **Laura, Daphne en Lindsay:** ook jullie waren al aanwezig met dat ik 7 jaar geleden als student bij Moleculaire Cytologie begon. Naast hard werken, hebben jullie een hoop gezelligheid gebracht; met popcorn, spongebob, loempia's in het tosti-ijzer, tekeningen op LB platen, koekjes, snoepjes en heel veel taart. Heel erg bedankt voor de mooie tijd en Laura succes met alle nieuwe FP's die nog komen gaan, Daphne succes met je postdoc in San Diego en Lindsay succes met je baan in Utrecht!

Ronald: ik heb nog nooit een probleem op de microscoop gehad die jij niet kon oplossen. Jij hebt mij vaak gered met dat ik al dacht dat ik mijn cellen weg kon gooien. Bedankt voor al je hulp.

De "van Amerongen" groep, **Katrin en Nika:** bedankt voor alle gezellige uurtjes in de kweek en veel succes met de afronding van jullie paper! **Anoeska, Saskia en Yorick:** bedankt voor de gezellige lunchsessies. **Amber:** bedankt voor de hulp op het lab.

Andere (voormalig) moleculaire cytologie collega's, **Christiaan, Stephanie en Orry**: ook jullie bedankt voor de leuke tijd.

Esmeralda: jij was mijn eerste student die ik mocht begeleiden. Uiteindelijk heb jij bijgedragen aan de RGS proeven, welke onmisbaar zijn in hoofdstuk 5 en 6. Bedankt hiervoor en veel succes met je PhD op het AMC.

Sanne: ik had het geluk dat ik jou mocht begeleiden met dat jij erg goed en efficiënt was op het lab. Zonder jou was ik nooit toegekomen aan alle DHPH kloneringen van hoofdstuk 7. Bedankt!

Joana: Thanks for the opportunity to collaborate in your papers.

Bas: door jouw mooie FRET macro heb ik de "flow" proeven van hoofdstuk 4 kunnen analyseren.

Ook wil ik graag mijn familie bedanken, allereerst **Pap en Natascha**. Bedankt voor alle steun, adviezen en interesse. Mede dankzij onze gesprekken heb ik er gelukkig voor gekozen om een postdoc te gaan doen. Ook bedankt voor het weekendje schrijven in Alkmaar, dat heeft geleid tot hoofdstuk 4 van dit boekje.

Mam: bedankt voor alle steun van de afgelopen jaren. Jouw bezoeken in Utrecht hebben voor veel ontspanning gezorgd. Fijn dat je er altijd voor mij bent.

Opa en Oma: bedankt voor alle interesse. Opa, ik ben erg blij dat ik u nog in uw nieuwe pak mag zien!

Pim en Marene: de laatste jaren hebben we veel leuke gesprekken gevoerd. Jullie proberen altijd mee te denken, stellen de leukste vragen en staan altijd voor ons klaar.

Mijn broers, zussen en aanhang, **Marcella en Joep, Femke en Freddy, Renée en Bradley, Frenk en Merel, Remco en Laura**: bedankt voor jullie gezelligheid en support.

Mike: bedankt voor onze koffiemomentjes, uitjes en onze mooie vakantie in Lissabon (of Lizabon).

Kimm: bedankt voor een luisterend oor en onze gezellige koffiemomentjes/etentjes.

Lieve **Koen**: graag wil ik mijn boekje afsluiten met jou te bedanken voor jouw geloof en steun van de afgelopen jaren. Jij stond altijd voor mij klaar en mede dankzij jou ben ik tot het einde van mijn proefschrift gekomen. Ook bedankt voor alle keren dat je naar mijn verhaal hebt willen luisteren en adviezen hebt willen geven. Sorry dat ik vaak te eigenwijs was om ernaar te luisteren (ik heb er stiekem toch wel wat mee gedaan). Ik kijk uit naar onze toekomst, samen met onze dochter Liz.