



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Food for microbes. The interplay between indigestible carbohydrates, gut microbiota, and cardiometabolic disease**

Hoving, L.R.

### **Citation**

Hoving, L. R. (2019, January 31). *Food for microbes. The interplay between indigestible carbohydrates, gut microbiota, and cardiometabolic disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68263>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/68263>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

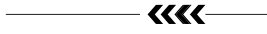
<http://hdl.handle.net/1887/68263>

**Author:** Hoving, L.R.

**Title:** Food for microbes. The interplay between indigestible carbohydrates, gut microbiota, and cardiometabolic disease

**Issue Date:** 2019-01-31





# ADDENDUM

09

Summary

Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

List of publications

Dankwoord





# SUMMARY



Cardiometabolic disease such as obesity, type 2 diabetes, and atherosclerosis, are a leading cause of morbidity and mortality in the Western world. Two important risk factors for the development of cardiometabolic disease are hyperlipidemia and inflammation. Recently, evidence strongly indicates a role for the gut microbiota in the development of cardiometabolic disease. Therapeutic approaches are therefore aimed at modifying the gut microbiota composition and function to beneficially affect the development of cardiometabolic disease and its underlying risk factors. A potential candidate to modify gut microbiota composition are indigestible carbohydrates, or prebiotics. In this thesis, we aimed to understand the interplay between various indigestible carbohydrates, gut microbiota composition and function, and the development of obesity, type 2 diabetes, and atherosclerosis.

**Chapter 1** serves as a general introduction in which hyperlipidemia and inflammation are introduced as the two main risk factors for cardiometabolic disease. More specifically, the role of the gut microbiota composition, function, and dysfunction (or dysbiosis) will be discussed as modifiable risk factors in the development of cardiometabolic disease. A tool to modify the gut microbiota composition and function and dietary interventions with indigestible carbohydrates are discussed in further detail. Finally, the importance of methods to quantify gut microbiota function is illustrated.

Since we exploit the use of high fat and high cholesterol diets in the development of cardiometabolic disease, it is important to have the ability to determine blood lipid composition. As the various fatty acids play distinct roles in health and disease, methods that can specifically determine the fatty acid profile are needed for fundamental and clinical studies. **Chapter 2** describes a method to determine the medium- and long chain fatty acid composition of blood of mice using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. This method quantitatively monitors fatty acid composition using a combination of pentafluorobenzyl bromide (PFBBR) derivatization, internal standards (IS), and electron-capture negative ionisation (ECNI) in a comprehensive, sensitive, and accurate manner.

In addition, we explore the use of indigestible carbohydrates to modulate microbiota composition and function. Microbial function can be determined by measuring the products



after microbial fermentation of indigestible carbohydrates, short-chain fatty acids (SCFAs). **Chapter 3** describes a method to determine SCFAs in blood, cecum, and feces samples using GC-MS analysis. By applying the combination of PFBBr derivatization, IS, and ECNI, this method represents a fast, reliable, and reproducible method for the separation and quantification of SCFAs in various mouse-derived samples which can be further exploited for quantification of SCFAs in human studies.

In **chapter 4**, we studied the effect of the indigestible carbohydrate and prebiotic inulin on accelerated atherosclerosis development after placement of a perivascular cuff around the femoral artery of the mice. Previous studies indicated a beneficial role of inulin on inflammation and hyperlipidemia. However, the effect of inulin on atherosclerosis development has not been extensively studied yet. Male APOE\*3-Leiden (*E3L*) mice were fed a high-cholesterol diet without or supplemented with inulin for 5 weeks and underwent perivascular cuff surgery in week 3 of the experiment. The combination of this well-established mouse model for human-like lipid metabolism and perivascular cuff placement around the femoral artery, enables us to specifically study the short-term effect of inulin on inflammatory-driven atherosclerosis development. In contrast to our hypothesis, inulin aggravated accelerated atherosclerosis development in these mice, which was accompanied by adverse lesion composition and outward vascular remodelling. Inulin did not affect blood monocyte composition, suggesting that the aggravated atherosclerosis development was driven by the significantly increased plasma cholesterol levels.

In **chapter 5**, we shifted our focus from short-term effects of inulin on atherosclerosis development to long-term atherosclerosis development in a lipid-driven atherosclerotic mouse model. Female APOE\*3-Leiden.CETP (*E3L.CETP*) mice were fed a moderate high (0.1%) or high (0.5%) cholesterol diet without or supplemented with inulin for 11 weeks. By combining the use of female *E3L.CETP* mice and different cholesterol-enriched diets, we were able to specifically study the long-term effects of inulin on lipid-driven atherosclerosis development. Inulin combined with a high cholesterol diet clearly showed prebiotic activity, but did not affect plasma cholesterol levels or atherosclerosis development. Surprisingly, inulin combined with

a high (0.5%) cholesterol diet resulted in mild hepatic inflammation. Inulin with a moderate high (0.1%) cholesterol diet did not result in liver inflammation. It was therefore concluded that, although inulin is widely acknowledged as a prebiotic with favourable effects on lipid metabolism and cardiovascular disease, inulin clearly not always exerts beneficial effects.

In **chapter 6**, we switched our attention from a well-known prebiotic to the relatively unknown indigestible carbohydrate MOS, which have great potential to modify gut microbiota composition, inflammation, and hyperlipidemia. MOS have proven effective at improving growth performance, while also reducing inflammation and hyperlipidemia. However, beneficial effects of MOS on inflammation have been shown mainly in the intestines. As obesity is associated with chronic low-grade inflammation that predominantly manifests in extra-intestinal adipose tissue, we aimed to determine the effect of MOS on inflammation in mesenteric white adipose tissue (mWAT) and liver. In addition, we determined the effect of MOS on whole-body glucose tolerance in both lean and high-fat diet (HFD)-induced obese mice. It was found that MOS slightly altered immune cell composition in mWAT and liver of lean mice, but MOS did not ameliorate HFD-induced glucose intolerance or inflammation. Our data therefore indicate extra-intestinal modulatory properties of MOS on immune composition as reported in previous studies. However, the effects are relatively modest.

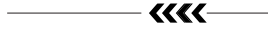
MOS have proven effective at improving growth performance, while also reducing hyperlipidemia and inflammation in livestock. As atherosclerosis is accelerated both by hyperlipidemia and inflammation, **chapter 7** describes the effect of dietary MOS on atherosclerosis development in hyperlipidemic *E3L.CETP* mice. Mice were fed a high cholesterol diet, with or without MOS for 14 weeks. This study revealed that MOS decreased the onset of atherosclerosis development, via lowering of plasma cholesterol levels. Furthermore, MOS modified the gut microbiota composition and function as was observed by increased cecal butyrate levels and fecal bile acid (BA) excretion. We therefore concluded that MOS presumably decreased atherosclerosis development and lowered plasma cholesterol levels via interactions with the gut microbiota.

In **chapter 8**, the results of this thesis and the value of our research regarding

methods to map gut microbiota composition and function, SCFAs as a marker for gut microbial function, factors that determine gut microbiota function, the role of the gut microbiota in the development of atherosclerosis, the translatability of mouse models in gut microbiota research, and implications for prebiotics are discussed. Taken together, the studies described in this thesis increased our knowledge on the potential of various indigestible carbohydrates in the modulation of the gut microbiota to affect the development of cardiometabolic disease, suggesting a promising strategy to further pursue with some caution.







# NEDERLANDSE SAMENVATTING



Cardiometabole ziekten zoals obesitas, type 2 diabetes en slagaderverkalking (atherosclerose) zijn een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit in de Westerse Wereld. Twee belangrijke risicofactoren voor het ontstaan van cardiometabole ziekten zijn hyperlipidemie en ontsteking. Ook bacteriën die zich huisvesten in ons darmstelsel kunnen een belangrijke rol kunnen spelen bij het ontstaan en het verloop van cardiometabole ziekten. Daarom wordt veel onderzoek gedaan om niet alleen de samenstelling, maar ook de functie van de darmbacteriehuishouding dusdanig te veranderen dat het ontstaan van cardiometabole ziekten wordt voorkomen. Vezels, voor de mens onverteerbare koolhydraten, vormen een primaire voedingsbron voor darmbacteriën en zijn daarom een belangrijk potentieel middel om de samenstelling en functie van de darmbacteriën te veranderen. Dit proefschrift heeft als doel om de wisselwerking tussen verschillende onverteerbare koolhydraten, de samenstelling en functie van de darmbacteriën, en het ontstaan en verloop van cardiometabole ziekten zoals obesitas, type 2 diabetes, en atherosclerose beter te begrijpen.

In **hoofdstuk 1** worden hyperlipidemie en ontsteking geïntroduceerd als twee belangrijke risicofactoren voor het ontstaan van cardiometabole ziekte. Nadruk wordt gelegd op de darmbacteriën als risicofactor in de ontwikkeling van cardiometabole ziekten. De samenstelling, de functie en verstoring van een gezonde darmbacteriehuishouding worden hierin belicht. Om het belang van het veranderen van de darmbacteriehuishouding in cardiometabole ziekten te benadrukken, wordt het nut van dieetinterventies middels onverteerbare koolhydraten in meer detail uitgelegd. Tenslotte wordt het belang van goede technische analytische methoden uitgelicht om metabolieten in feces te meten omdat deze metabolieten de functie van de darmbacteriën weerspiegelen.

Het onderzoek wat beschreven wordt in dit proefschrift maakt gebruik van vetrijke en cholesterolrijke diëten om cardiometabole pathologie in muizen op te wekken. Het is bekend dat verscheidene vetzuren een verschillende rol kunnen spelen in ziekte en gezondheid. Daarom is het belangrijk voor fundamentele- en klinische studies om de juiste meetmethoden in huis te hebben om ook het vetzuurprofiel van het bloed in kaart te brengen. **Hoofdstuk 2** beschrijft een methode die de samenstelling van middellange- en lange keten vetzuren in het bloed van



muizen kan bepalen met behulp van gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS). Deze methode wordt gekenmerkt door het gebruik van pentafluorbenzylbromide (PFBB<sub>r</sub>), interne standaarden (IS) en negatieve ionen voor elektronvangst (ECNI). Deze combinatie van kenmerken maakt deze methode geschikt om vetzuren op een volledige, gevoelige en nauwkeurige manier kwantitatief in kaart te brengen.

Tevens waren wij geïnteresseerd in het effect van koolhydraten, die door de mens niet kunnen worden verteerd, op de functie van de darmbacteriën. Een belangrijke functie van darmbacteriën is het verteren van deze koolhydraten, waarbij korte keten vetzuren (SCFAs) vrij komen. **Hoofdstuk 3** beschrijft een methode om SCFAs in bloed, dikke darm en in feces te meten met behulp van GC-MS. Ook deze methode maakt gebruik van PFBB<sub>r</sub>, IS, en ECNI en is een snelle, betrouwbare en reproduceerbare methode voor de scheiding en kwantificatie van SCFAs in verschillende monsters afkomstig uit fundamenteel muizenonderzoek. Bovendien kan deze methode ook toegepast worden in humaan onderzoek.

In **hoofdstuk 4** hebben we de korte termijn effecten van de onverteerbare koolhydraat inuline op de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd. Eerdere studies lieten al zien dat dit prebioticum een gunstig effect had op ontsteking en hyperlipidemie. Het effect van inuline op de ontwikkeling van atherosclerose is echter nog beperkt onderzocht. Mannelijke APOE\*3-Leiden (*E3L*) muizen werden gedurende 5 weken lang gevoed met een hoog cholesterol dieet mét of zonder de aanvulling van inuline. *E3L* muizen op een hoog cholesterol dieet lijken wat betreft lipiden metabolisme en atherosclerose ontwikkeling sterk op de mens. Om versnelde atherosclerose in deze muizen te induceren, ondergingen de muizen een operatie in week 3 waarbij een manchet rond de dijbeenslagader van de muizen werd geplaatst. Bij dit versnelde atherosclerose proces speelt ontsteking een belangrijke rol. In tegenstelling tot onze hypothese dat inuline atherosclerose zou verminderen, kwam uit het onderzoek in **hoofdstuk 4** naar voren dat inuline het proces van atherosclerose verergerd had. Dit ging gepaard met grotere, ontstoken laesies en een grotere diameter van het bloedvat. Tot onze verrassing had inuline geen effect op de samenstelling van immuun cellen in het bloed, maar verhoogde wel het cholesterol niveau in het bloed. Dit geeft aan dat de verergering van atherosclerose hoogstwaarschijnlijk

een gevolg was van een verhoogde cholesterol niveau.

In **hoofdstuk 5** richtten we ons op de lange termijneffecten van inuline op de ontwikkeling van atherosclerose. Vrouwelijke APOE \*3-Leiden.CETP (*E3L.CETP*) muizen werden gevoed met een matig hoog (0.1%) of hoog (0.5%) cholesterol dieet mét of zonder aanvulling van inuline. Met deze studie opzet ontwikkelen deze muizen in een periode van 11 weken atherosclerose rond het kleppengebied in het hart, wat overeenkomt met “natuurlijke” atherosclerose die ook in de mens wordt gezien en voornamelijk een gevolg is van het hoge lipidenniveau in het bloed. Uit dit onderzoek kwam naar voren dat inuline in combinatie met een hoog (0.5%) cholesterol dieet een duidelijke prebiotische activiteit liet zien, maar verder geen effect had op het lipiden niveau in het bloed of op de ontwikkeling van atherosclerose. Inuline in combinatie met dit hoge cholesterol (0.5%) dieet resulteerde zelfs in milde leverontsteking. Inuline gecombineerd met een matig hoog (0.1%) cholesterol dieet liet ook geen effect op plasma lipiden zien, maar had daarentegen geen nadelige gevolgen op ontsteking in de lever. Hoewel inuline dus wordt erkend als een prebioticum met gunstige effecten op het lipidenmetabolisme en cardiovasculaire aandoeningen, lieten onze experimenten duidelijk iets anders zien en kan geconcludeerd worden dat inuline niet altijd gunstig is.

In **hoofdstuk 6** hebben we onze aandacht verlegd van een erkend prebioticum naar een relatief onbekende onverteerbare koolhydraat met potentie om effect te hebben op de darmbacteriehuishouding, ontsteking en hyperlipidemie. Eerdere studies toonden aan dat MOS effectief zijn bij het verbeteren van de groei van dieren in de veehouderij, terwijl daarnaast een vermindering van ontsteking en hyperlipidemie werd waargenomen. De gevonden gunstige effecten van MOS op ontsteking lijken voornamelijk een gevolg van effecten op het darmstelsel. Echter zijn er ook aanwijzingen dat MOS buiten de darmen gunstige effecten kunnen uitoefenen. Omdat obesitas gepaard gaat met ontsteking die zich voornamelijk buiten de darmen manifesteert, hebben we het effect van MOS onderzocht op obesitas-gerelateerde ontsteking in extra-intestinaal metabool weefsel zoals vetweefsel en de lever. Daarnaast hebben we ook gekeken naar de effecten van MOS op glucosetolerantie. Obesitas induceerden we middels een hoog vet dieet (HFD) en vervolgens onderzochten we de effecten van MOS op

ontsteking in zowel slanke muizen als in muizen met obesitas. Wij vonden dat MOS de samenstelling van de immuuncellen binnen het mesenteriale witte vetweefsel (mWAT) en de lever van vooral magere muizen enigszins veranderde. Echter werden er geen effecten gevonden van MOS op het verbeteren van glucosetolerantie. Ondanks het feit dat de gevonden effecten relatief bescheiden zijn, concludeerden wij dat MOS de potentie heeft om ontsteking in weefsel buiten het darmstelsel te moduleren.

Zowel hyperlipidemie als ontsteking spelen een belangrijke rol in atherosclerose. In **hoofdstuk 7** onderzochten wij het effect van MOS op de ontwikkeling van atherosclerose in vrouwelijke *E3L.CETP* muizen. Deze muizen werden 14 weken lang gevoed met een hoog cholesterol dieet, mét of zonder toevoeging van MOS. Dit onderzoek liet zien dat MOS de ontwikkeling van atherosclerose reduceerde middels verlaging van het cholesterol niveau in het bloed. Daarnaast lieten MOS een sterke verandering zien op de darmbacteriehuishouding en op de activiteit van de darmbacteriën. Dit laatste bleek uit een verhoging van de SCFA butyraat in de dikke darm en een verhoogde uitscheiding van galzuren in de feces. Uit dit onderzoek kan daarom geconcludeerd worden dat MOS de ontwikkeling van atherosclerose en plasma cholesterol niveaus verlagen via interacties met de darmbacteriën en effecten op plasma cholesterol.

De belangrijkste resultaten die beschreven staan in dit proefschrift worden bediscussieerd in **hoofdstuk 8**. Het belang van het gebruik van methoden om de microbiota compositie en functie in kaart te brengen, factoren die de functie van de microbiota bepalen, de rol van de microbiota in de ontwikkeling van atherosclerose, de vertaalbaarheid van muismodellen in microbiota onderzoek en de implicaties van prebiotica worden eveneens besproken. Samenvattend hebben de studies in dit proefschrift onze kennis vergroot over de potentie van verschillende onverteerbare koolhydraten in het moduleren van de darmbacteriehuishouding om de ontwikkeling van cardiometabole ziekten te beïnvloeden. Dit is een veelbelovende strategie waarbij enige voorzichtigheid is geboden.





— ««« —

# CURRICULUM VITAE



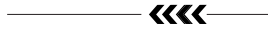
Lisa Rianne Hoving werd geboren op 5 december 1987 in Groningen. In 2005 behaalde zij haar havo diploma aan de Dr. Nassau College Quintus in Assen. In datzelfde jaar begon zij met de studie Verpleegkunde aan Hogeschool Windesheim in Zwolle, waarvan zij in 2006 haar propedeuse behaalde. Kort daarna verhuisde Lisa naar Maastricht om daar te beginnen als verzorgende in de thuiszorg. Dit heeft zij van 2006 tot 2013 voortgezet.

In 2007, na een kort oriëntatiejaar inclusief het behalen van de TOEFL iBT Engels op Malta, begon zij aan de studie Gezondheidswetenschappen aan de Universiteit van Maastricht met als afstuurrichtingen Bewegingswetenschappen en Bioregulatie. Tijdens deze opleiding heeft Lisa verscheidene stages gelopen waaronder een onderzoeksstage in Australië aan de University of Sydney. Tevens werd zij tijdens haar studie ingeloot als excellente student voor het Honours Programma 'International Health' dat parallel liep aan de studie Gezondheidswetenschappen. Haar externe afstudeeronderzoek volbracht zij aan Wageningen University & Research (WUR) waar zij onderzoek deed naar de effecten van flavonoïden op energie absorptie en metabolisme in de dunne darm.

Als logisch gevolg van het onderzoek in Wageningen, vervolgde Lisa na het behalen van haar Master of Science (MSc) diploma in 2013 haar weg richting promotieonderzoek op de afdeling Humane Genetica van het Leids Universitair Medisch Centrum in Leiden, onder begeleiding van Prof. Dr. Ko Willems van Dijk en Dr. Vanessa van Harmelen. Haar PhD project was onderdeel van het consortium IN-CONTROL dat gefinancierd werd door Cardiovasculair Onderzoek Nederland (CVON). Het promotieonderzoek, waarvan de resultaten staan beschreven in dit proefschrift, werd afgerond in 2018 en verdedigd in januari 2019.







# LIST OF PUBLICATIONS



**Hoving LR**, Langenberg M, Franke-Fayard B, Chevalley SC, Ramaser J, Janse C, van Harmelen V, Willems van Dijk K, Roestenberg M. Malaria liver stage and blood stage infection is determined by liver and plasma cholesterol. *In preparation*

**Hoving LR**, Katiraei S, Pronk A, Heijink M, Vonk KKD, Amghar-el Bouazzaoui F, Vermeulen R, Drinkwaard L, Giera M, van Harmelen V, Willems van Dijk K. The prebiotic inulin modulates gut microbiota but does not ameliorate atherosclerosis in hypercholesterolemic APOE\*3-Leiden.CETP mice. *Scientific Reports*. 2018;8(1)

**Hoving LR**, Katiraei S, Heijink M, Pronk A, van der Wee-Pals L, Streefland T, Giera M, Willems van Dijk K, van Harmelen V. Dietary mannan oligosaccharides modulate gut microbiota, increase fecal bile acid excretion, and decrease plasma cholesterol and atherosclerosis development. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2018;62(10)

**Hoving LR**, van der Zande HJP, Pronk A, Guigas B, Willems van Dijk K, van Harmelen V. Dietary yeast-derived mannan oligosaccharides have immune-modulatory properties but do not improve high fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *PLoS One*. 2018;13(5)

**Hoving LR**, Heijink M, van Harmelen V, van Dijk KW, Giera M. GC-MS analysis of medium- and long-chain fatty acids in blood samples. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1730:257-265

**Hoving LR**, Heijink M, van Harmelen V, van Dijk KW, Giera M. GC-MS analysis of short-chain fatty acids in feces, cecum content, and blood Samples. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1730:247-256

**Hoving LR**, de Vries MR, de Jong RCM, Katiraei S, Pronk A, Quax PHA, van Harmelen V, Willems van Dijk K. The prebiotic inulin aggravates accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic APOE\*3-Leiden Mice. *Nutrients*. 2018;10:172

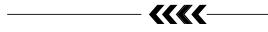
Katiraei S, **Hoving LR**, van Beek L, Mohamedhosein S, Carlotti F, van Diepen JA, Rensen PCN, Netea MG, Willems van Dijk K, Berbée JFP, van Harmelen V. BMT decreases HFD-induced weight gain associated with decreased preadipocyte number and insulin secretion. *Plos One*. 2017;12(4)

Konings J, **Hoving LR**, Ariëns RS, Hethershaw EL, Ninivaggi M, Hardy LJ, de Laat B, Ten Cate H, Philippou H, Govers-Riemslog JW. The role of activated coagulation factor XII in overall clot stability and fibrinolysis. *Thrombosis Research*. 2015;136(2):474-480

van der Stelt I, Hoek-van den Hil EF, Swarts JJM, Vervoort JJM, **Hoving L**, Skaltsounis L, Lemonakis N, Andreadou I, van Schothorst EM, Keijer J. Nutraceutical oleuropein supplementation prevents high fat diet-induced adiposity in mice. *Journal of Functional Foods*. 2015;14:702-715







# DANKWOORD





Dit proefschrift zou niet tot stand zijn gekomen zonder de betrokkenheid van velen. Daarom wil ik iedereen, ieder op zijn eigen wijze, bedanken voor hun waardevolle toevoeging.

Allereerst mijn promotor Prof. Dr. Willems van Dijk en co-promotor Dr. V.J.A. van Harmelen. Beste **Ko**, ik wil je bedanken voor je rust en vertrouwen die mij alle ruimte hebben gegeven om mijzelf te kunnen ontwikkelen binnen het onderzoek. Beste **Vanessa**, bedankt dat je 4 jaar lang mijn kamergenoot en de meest fijne co-promotor was die ik me kon wensen!

Mijn directe collega's, oftewel de lipido's. **Amanda**, bedankt voor je zorgzaamheid en droge grappen die de lange dagen op het PDC een eitje/uitje maakten. **Saeed**, bedankt voor het zijn van mijn directe PhD-microbiota-compagnon! Bedankt **Mattijs, Lianne, Sam, Jan, Ayze** en **Fatiha**, naast een fijne tijd op het lab heb ik met jullie mogen genieten van de leuke uitjes buiten het werk om. Tot slot **Dorina**, thanks for being my supportive (HG- and sports) friend!

Voorts wil ik ook alle andere mensen bedanken met wie ik samen gepubliceerd heb of die mij hierbij hebben bijgestaan. **Martin, Marieke**, en **Dick-Paul** van CPM, bedankt dat jullie mij op een basale en leuke manier kennis hebben laten maken met de wondere wereld van GC-MS. Collega's van de afdeling Parasitologie, met geen enkele afdeling heb ik zo nauw samengewerkt: **Bruno** en **Patrick**, bedankt voor de ontspannen en leuke sfeer tijdens de verschillende (mannan) studies. **Marijke**, mijn malaria-maatje, bedankt voor de prettige en gesmeerde samenwerking waarin twee specialismen met elkaar samensmolten. Bedankt **Meta, Blandine, Sev, Chris, Shahid, Jai, Hermelijn, Alice** en **Arifa** voor alle fijne kneepjes van het Parasitologie-vak en de aantal spannende (althans dat vond ik) malaria-uurtjes op het PDC. Alle collega's van **Lab Endo** en **Lab Meijer** wil ik bedanken voor de waardevolle bijdragen tijdens werkbesprekingen en gezellige koffiepauzes. **Lisanne**, ik had me geen betere paranimf-maatje kunnen wensen; ik ben blij dat ik jou heb mogen leren kennen. **Jimmy**, bedankt voor je wijze adviezen en de momenten dat ik mij zo nu en dan ook een PhD student van jou voelde. **Trea, Lianne** en **Isabel**, bedankt voor jullie geduld, analytische inzichten en goedlachse gesprekken op zowel het lab als op het PDC!

De afgelopen jaren heb ik het voorrecht gehad om een aantal studenten te mogen begeleiden, wat ik tot op de dag van vandaag één van de leukste dingen vond om te doen tijdens mijn promotietraject. **Lizette, Rosalie, Isabel, en Thomas**, bedankt voor de fijne tijd en dat jullie mij ook elke dag wat nieuws leerden.

Graag wil ik alle mensen bedanken van andere afdelingen en organisaties die mij hebben geholpen of gesteund gedurende mijn promotietraject. Collega's van het **PDC**: bedankt voor al jullie goede zorgen! De 3e verdieping inclusief het HG secretariaat, mijn tweede huis: bedankt voor alle wisselende gesprekken in de labs, de wandelgangen en tijdens de HG borrels. Ook alle **studenten in het lab**, bedankt voor jullie frisse blik en het harde werken. Leden van de **MGC-commissie 2016**: bedankt voor de geweldige commissie-ervaring tijdens de MGC workshop in Dortmund! Collega's uit het **CVON IN-CONTROL consortium**, bedankt voor de goede samenwerking en uitwisselingen van expertise tijdens de meetings en daarbuiten. Bedankt **Jettie**, voor je zorgzame en verhelderende loopbaan-inzichten. **Malou**, bedankt voor je geduld, je kundigheid, en je out-of-the-box mentaliteit tijdens het ontwerpen van mijn boekje. Je hebt er echt iets heel moois van gemaakt!

Vriendinnetjes! **Geerte**, a.k.a. Barrie: naast dat je een goede vriendin bent, bedankt dat je mijn WUR-LUMC buddy was! Praten over koetjes, kalfjes en ons hart kunnen luchten waren de momenten die het (LUMC)leven mooi maakten. **Paula**, ik ben zo dankbaar dat we onze Ozzie vriendschap na 6 stille jaren weer hebben voortgezet! **Iris** en **Maria**, ik ben blij dat wij nog steeds vriendinnetjes zijn na alle mooie tijden in Maastricht. Paranimfen / vriendinnetjes: **Hilde**, het lief en leed dat wij deelden tijdens Artikel 9 cursus ging verder dan gedrevenheid en ambities; wat heeft geleid tot een hele mooie, pure en zeer dierbare vriendschap. **Kelly**, bedankt dat je de afgelopen 4 jaar mijn inuline-redder-in-nood, mijn wandelende agenda en mijn rosé(bier)-genootje/vriendinnetje was en nog steeds bent!

Tot slot mijn lieve familie en schoonfamilie, ik ben enorm trots en dankbaar dat ik altijd bij jullie terecht kan voor onvoorwaardelijke steun, een moment van rust, liefde, gezelligheid en om de drukke stad even in te ruilen voor het nuchtere 'down-to-earth' plattelandsleven.

Lieve **Daan**, mijn beste maatje, mijn grootste steun, en allerliefste vriend! Jij hebt alles van heel dichtbij meegemaakt, stond altijd voor mij klaar en telkens was je weer even trots. Er zijn ontelbaar veel dingen waar ik je voor zou willen bedanken, maar vooral bedankt voor al je goede zorgen, je vertrouwen, je steun, je begrip, geduld en heel veel liefde de afgelopen 4 jaar!

Liefs  
lisa

