

University of Groningen

Exploring Redox Biology in physiology and disease

Koning, Anne

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Koning, A. (2017). *Exploring Redox Biology in physiology and disease*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Appendices

Nederlandse samenvatting

Oxidatie-reductie- of redoxreacties zijn verantwoordelijk voor de regulatie van allerhande processen die zich afspelen in het menselijk lichaam. Verstoring van de balans tussen oxidatie en reductie leidt tot oxidatieve of reductieve stress en speelt een belangrijke rol bij het ontstaan van ziekte. Onderzoek naar het functioneren van het redox systeem kan dan ook in belangrijke mate bijdragen aan onze kennis van pathofysiologische processen en mogelijk nieuwe therapeutische aangrijpingspunten identificeren. Voor **dit proefschrift** werden verschillende elementen van het redoxnetwerk, waaronder vrije thiolen en metabolieten van gasotransmitters, waterstofsulfide (H_2S) en stikstofdioxide (NO), in humane populaties bestudeerd en gerelateerd aan het risico op en de uitkomst van cardiovasculaire en renale aandoeningen. Ook werd de relatie onderzocht tussen variaties van het *cystathionine β -synthase (CBS)* gen - een gen dat betrokken is bij de regulatie van endogene H_2S -productie - en de overleving van donororganen na humane niertransplantatie. Ten slotte werd in ratmodellen van nierziekten de therapeutische potentie van H_2S getest.

Zoals besproken in **Hoofdstuk 2** draagt een zogenaamd "interactoom" van reactieve verbindingen zorg voor een snelle verwerking van signalen waardoor het lichaam adequaat kan reageren op zowel interne als omgevingsstressoren. Bij de signaaloverdracht nemen thiolen een centrale plaats in. Derhalve worden deze functionele groepen, bestaande uit een sulfur en een waterstof atoom, ook wel redox-schakelaars genoemd. **Deel 1** van dit proefschrift richt zich op de rol van thiolen in hartfalen.

Hoofdstuk 3 beschrijft het onlosmakelijke verband tussen de metabole veranderingen die onderdeel uitmaken van de pathofysiologie van hartfalen en de overmatige productie van zuurstofradicalen, met name door mitochondriën. Deze radicalen reageren met thiolen en zorgen zo voor oxidatie. De overgebleven circulerende concentratie van gereduceerde, of vrije, thiolen kan worden gezien als een directe afspiegeling van de balans tussen oxidanten en anti-oxidatieve capaciteit en dus van de algehele mate van oxidatieve stress. **Hoofdstuk 4** laat zien dat in een klein cohort van 101 patiënten met stabiel chronisch hartfalen (CHF) een bovengemiddelde (voor eiwit gecorrigeerde) serumconcentratie van vrije thiolen geassocieerd is met een gunstige uitkomst van ziekte. Aangezien dit een studie van patiënten met stabiele ziekte betreft, lijken vrije thiolen in serum een robuuste afspiegeling te zijn van de redoxstatus. Aan bevestiging van deze bevinding in een groter cohort wordt op dit moment gewerkt. Vergeleken met conventionele markers van oxidatieve stress, is het voordeel van vrije thiolen dat dit actieve componenten zijn van het anti-oxidatieve verweer. Bovendien is van thiolen bekend dat deze ontvankelijk zijn voor therapeutische modulatie, bijvoorbeeld door cysteïnerivaten, zoals N-acetylcysteïne. De tot dusver inconsistente en veelal teleurstellende resultaten van behandelingen gericht op het herstellen van de redoxstatus hangen waarschijnlijk samen met de belemmering van fysiologische functies van radicalen. Echter, het is goed mogelijk dat geselecteerde patiënten met een tekortschietende endogene anti-oxidatieve capaciteit wel degelijk baat zouden hebben bij deze therapieën. Ook is het de moeite waard te onderzoeken of bepaalde aandoeningen gepaard gaan met specifieke variaties wat betreft de samenstelling van thiolen, in het bijzonder ten behoeve van therapieontwikkeling. Daarnaast liggen er mogelijkheden in het farmacologisch stimuleren

van moleculen die in reactie met thiolen reversibele eiwitmodificaties teweegbrengen, waaronder gasotransmitters, H₂S en NO. Het is denkbaar dat via deze weg het aantal vrije thiolen, maar ook de functie van eiwitten kan worden beïnvloed. **Deel 2** van dit proefschrift is gewijd aan deze gasvormige signaalmoleculen en hun metabolieten.

Hoofdstuk 5 omvat een uitgebreid overzicht van de beschikbare literatuur over de rol van H₂S in de fysiologie, pathologie en transplantatie van de nier. Zo is er wetenschappelijk bewijs voor een positief effect van H₂S op de nierfunctie via een toename van doorbloeding, glomerulaire filtratiesnelheid en tubulaire excretie van elektrolyten. Ook impliceert de beschikbare data een therapeutische rol voor H₂S bij nierziekten, aangezien vele van de biologische functies van deze gasotransmitter rechtstreeks ingaan tegen de mechanismen die betrokken zijn bij de ziekteprogressie. Dit wordt ondersteund door **Hoofdstuk 8** dat toont dat H₂S behandeling in de vorm van natriumwaterstofsulfide (NaHS) en natriumthiosulfaat (STS) beschermt tegen door Angiotensine II-geïnduceerde hypertensie, proteïnurie en nierschade. Het is interessant dat onze onderzoeksgroep ook heeft vastgesteld dat in dit ziektemodel de H₂S producerende enzymen, CBS, cystathionine γ -lyase en 3-mercaptopyruvaat, verminderd aanwezig zijn. Deze bevinding impliceert dat de endogene H₂S-productie in het geval van hypertensieve nierziekte beperkt is, wat bijdraagt aan de rationale voor H₂S behandeling in deze context. Ondanks dat verscheidene experimentele studies een heilzaam effect van H₂S demonstreren bij nierziekten, alsmede andere aandoeningen, blijft de ontwikkeling van klinische toepassingen een uitdaging. Dit is voornamelijk te wijten aan de toxiciteit van H₂S in hoge concentraties, in combinatie met de vluchtige aard van dit gas welke gecontroleerde toediening bemoeilijkt. In dit opzicht zijn de beschermende effecten van H₂S behandeling in de vorm van STS, zoals beschreven in **Hoofdstuk 8**, bijzonder veelbelovend gezien dit middel veilig aan mensen kan worden toegediend. Sterker nog, het wordt klinisch toegepast in meervoudige grammen, bijvoorbeeld als behandeling van calcifylaxis bij dialyse patiënten. Hoewel thiosulfaat (TS) vaak wordt afgeschreven als inert afbraakproduct van H₂S, zijn er aanwijzingen dat dit *in vivo* her-omgezet kan worden in H₂S. Studies uiteengezet in **Hoofdstuk 5** wijzen ook op een gunstige rol voor zowel endogene als toegediende H₂S bij renale ischemie-reperfusieschade (IRI) en transplantatie. **Hoofdstuk 6** van dit proefschrift toont aan dat een *single nucleotide polymorphism (SNP)* van het CBS gen in niertransplantatiepatiënten positief geassocieerd is met orgaanoverleving. Dat deze associatie zijn statistische significantie verliest na meeweging van mogelijke *confounders* is waarschijnlijk te verklaren door het relatief lage aantal patiënten dat deze gen-variant draagt. Aangezien eerder onderzoek heeft laten zien dat renale IRI de activiteit van CBS beperkt, kan de eerder genoemde bevinding van aanzienlijk belang zijn en vraagt deze om bevestiging in een groter cohort. Het vergroten van de renale beschikbaarheid van H₂S, zij het door exogene toediening of door stimulatie van endogene productie, kan een veelbelovende strategie zijn om het ontstaan van IRI tijdens niertransplantatie te minimaliseren. Terwijl de resultaten van verscheidene experimentele studies dit idee ondersteunen, laat ons unilaterale renale IRI experiment in ratten, zoals beschreven in **Hoofdstuk 7**, geen beschermend effect van NaHS en STS behandeling zien. Deze discrepantie kan mogelijk worden verklaard door ons specifieke behandelingschema

van tweemaal daags intra-peritoneale injecties. Gedetailleerde analyse van de beschikbare literatuur doet namelijk vermoeden dat toepassing van de behandeling rondom of zelfs tijdens de reperfusiefase essentieel is om de nier *in vivo* tegen IRI te beschermen. Dit is mogelijk gerelateerd aan het feit dat de doorbloeding van de nier maar in beperkte mate reageert op hypoxie of hyperoxie en voornamelijk wordt bepaald door mechanismen die de nierfunctie reguleren. Tijdens reperfusie schiet de arterioveneuze shunt waarschijnlijk tekort, waardoor de nier ongebreideld wordt blootgesteld aan hyperoxie en oxidatie. Het is vermeldenswaardig dat *ex vivo* experimenten in **Hoofdstuk 7** laten zien dat NaHS hypometabolisme kan induceren in geïsoleerde rattennieren. Hoewel H₂S-geïnduceerd hypometabolisme in een organisme als geheel ontoepasbaar is in grotere dieren, waaronder mensen, impliceert deze bevinding een mogelijke rol voor H₂S behandeling in de preservatie van donornieren. Helaas lijkt STS voor dit doel ongeschikt, aangezien eerder onderzoek erop wijst dat de omzetting van TS in H₂S voornamelijk plaatsvindt in de lever en wel onder hypoxische omstandigheden. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 8** heeft STS, in tegenstelling tot NaHS, dan ook geen effect op de intra-renale druk in de geïsoleerd geperfuseerde rattennier.

Naast de potentiële toxiciteit en de vluchtige aard van H₂S is er nog een factor die klinische translatie bemoeilijkt. Dit is het ontbreken van een betrouwbare en bruikbare methode voor de directe detectie van H₂S in biologische monsters. Mogelijk weerspiegelen H₂S-metaboliëten (gedeeltelijk) endogene H₂S levels. In dit opzicht is het interessant dat de dagelijkse excretie van TS en sulfaat in de urine in eerder onderzoek geassocieerd zijn met een gunstig cardiovasculair risicoprofiel bij niertransplantatiepatiënten en met het behoud van nierfunctie bij patiënten met diabetes. **Hoofdstuk 9** laat een sterke omgekeerde relatie zien tussen de dagelijkse excretie van sulfaat, maar niet van TS, en mortaliteit in een grote groep proefpersonen uit de algemene populatie. In dit kader is het van belang te vermelden dat de excretie in de urine van sulfaat noch andere metaboliëten wordt bepaald door de nierfunctie. Het mechanisme dat de associatie wel verklaart, is vooralsnog niet opgehelderd. In tegenstelling tot onze verwachting vonden wij geen bijzonder sterke relatie tussen TS- of sulfaatexcretie en cardiovasculaire voorvallen of gerelateerde mortaliteit in deze populatie. Tegelijkertijd laat **Hoofdstuk 10** zien dat in patiënten met stabiel CHF dagelijkse sulfaatexcretie positief geassocieerd is met een gunstige uitkomst van ziekte, zij het niet zo sterk als de renale sulfaatklaring. Mogelijk maken TS en sulfaat deel uit van een adaptieve respons die wordt getriggerd in geval van ziekte - ofwel direct ofwel via hun voorloper, H₂S. Dit zou een verklaring zijn voor het ontbreken van een sterke associatie tussen de uitgangswaarden van TS en sulfaat en cardiovasculaire uitkomsten in een groep van overwegend gezonde individuen uit de algemene populatie. De ogenschijnlijke betekenis van de renale klaring van sulfaat in patiënten met CHF vraagt om nadere analyse. In deze context is het interessant dat voor bepaalde factoren die H₂S-productie stimuleren dan wel remmen een vergelijkbaar effect op de tubulaire reabsorptie van sulfaat is beschreven. Terwijl vitamine D zowel H₂S-productie als tubulaire reabsorptie van sulfaat stimuleert, worden beide geremd door glucocorticoiden. Wellicht dienen deze processen een gemeenschappelijk doel. Dit zou het vergroten van de circulerende sulfaat levels kunnen zijn. Echter, het behoort

ook tot de mogelijkheden dat sulfaat, in strijd met de huidige overtuiging, *in vivo* wordt heromgezet in H₂S.

Van het eind-oxidatieproduct van NO, nitraat, is alom bekend dat het gerecycled wordt met hulp van bacteriën in de mondholte die nitraat in speeksel reduceren tot nitriet. Daarentegen wordt de potentiële invloed van de renale verwerking van nitriet en nitraat op hun circulerende concentraties doorgaans niet onderkend. Het is zelfs zo dat de bestaande literatuur nauwelijks informatie biedt over de verwerking van deze anionen door de nier. Onze studie, beschreven in **Hoofdstuk 11**, is de eerste die referentiewaarden verschaft voor de renale klaring van nitriet en nitraat in mensen. Bovendien laten wij zien dat nitriet en nitraat ieder op een afzonderlijke manier door de nier worden verwerkt. Dat alleen de klaring van nitraat en niet die van nitriet geassocieerd is met een gunstige uitkomst van ziekte bij patiënten met CHF onderstreept de klinische relevantie van dit onderscheid. Ten slotte representeert renale tubulaire reabsorptie, naast de reductie van nitraat tot nitriet in speeksel, een aanvullende route van nitriet- en nitraatherwinning die in aanmerking moet worden genomen bij toekomstig onderzoek.

Toekomstperspectieven

Hoewel data van humane studies nog altijd schaars en observationeel zijn, onderschrijft het beschikbare materiaal de door experimenteel onderzoek geïmpliceerde belangrijke rol van het redox systeem in gezondheid en ziekte. Bevordering van de beschikbaarheid van vrije thiolen, zij het direct middels cysteïnerivaten of indirect via farmacologische stimulatie van reversibele eiwitmodificaties, zou heilzaam kunnen blijken in geselecteerde patiënten. Verder onderzoek naar de manier waarop modificaties door kleine moleculen, waaronder NO en H₂S, eiwitfuncties beïnvloeden is nodig om ervoor te zorgen dat dit concept therapeutisch benut kan worden.

Het ziet er niet naar uit dat de obstakels die de klinische translatie van het onderzoek naar H₂S bemoeilijken in de nabije toekomst zullen worden overwonnen. H₂S-gerelateerde middelen die veilig aan mensen kunnen worden toegediend, waaronder STS, hebben echter wel een veelbelovende klinische toepasbaarheid en onderzoek naar de effecten van deze middelen in humane populaties is dan ook gerechtvaardigd. In dit kader zal binnenkort een klinische trial van start gaan waarin patiënten met een myocardinfarct STS zal worden toegediend.

Om onze kennis van het redox systeem te vergroten en de werkelijke rol hiervan binnen het menselijk lichaam te bepalen, is het onder andere interessant gezonde individuen te bestuderen, onder fysiologische omstandigheden en blootgesteld aan verschillende vormen van stress. Zo analyseren wij momenteel serumconcentraties van vrije thiolen in een grote groep proefpersonen uit de algemene bevolking. Ook verdienen de voorlopers (die voorkomen in voeding) en metabolieten van de voornaamste elementen van het redoxnetwerk aandacht, zoals cysteïne en sulfaat voor sulfur- en arginine en nitraat voor stikstofradicalen. Het is denkbaar dat deze het functioneren van het redox systeem en daarmee het verouderingsproces of het ontstaan van ziekte beïnvloeden. Ten slotte is studie



van het redox systeem in de context van verschillende humane aandoeningen van groot belang.

Hoewel onderzoek zich doorgaans richt op het vaststellen van een enkelvoudige oorzaak van een ziekte, zou een systemische aanpak licht werpen op de verscheidene elementen van het redoxnetwerk en inzicht verschaffen in onderlinge interacties. Dit type informatie zou ons begrip van de opbouw en het functioneren van het redox systeem in gezondheid en ziekte aanzienlijk vergroten en naar alle waarschijnlijkheid bijdragen aan de ontwikkeling van gerichte therapeutische toepassingen.

Author affiliations

M Bachtler ¹	MP Frenneaux ¹⁰	M Minnion ⁹
SJL Bakker ²	JM Fukuto ¹¹	I Minović ²
E van den Berg ²	RT Gansevoort ²	P Nagy ¹⁴
CL Bianco ³	H van Goor ⁵	G Navis ²
RA de Boer ⁴	JL Hillebrands ⁵	IM Nolte ¹⁵
HG Booiij ⁴	DH Hoeksma ⁶	KR Olson ¹⁶
JC van den Born ⁵	AA Jackson ⁹	C Osmond ¹⁷
EM Bos ^{5,6}	C Ji ⁷	A Post ²
MLC Bulthuis ⁵	M Kelm ⁸	A Pasch ¹
FP Cappuccio ⁷	GGC Kuhnle ¹²	IJ Riphagen ²
MM Cortese-Krott ⁸	AJ Kwakernaak ²	PM Snijder ^{5,6}
MM Dekker ⁵	HGD Leuvenink ⁶	P Strazzullo ¹⁸
M Feelisch ⁹	M Madhani ¹³	LH Venema ⁶
BO Fernandez ⁹	WC Meijers ⁴	BD Westenbrink ⁴
AS Frenay ⁵	MA Miller ⁷	D Wink ¹⁹

¹Department of Clinical Research, University of Bern, Bern, Switzerland

²Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, University Medical Center Groningen (UMCG), University of Groningen (RUG), Groningen, the Netherlands

³Department of Chemistry, Johns Hopkins University, Baltimore, United States of America (USA)

⁴Department of Cardiology, UMCG, RUG, Groningen, The Netherlands

⁵Department of Pathology and Medical Biology, Division of Pathology, UMCG, RUG, Groningen, the Netherlands

⁶Department of Surgery, UMCG, RUG, Groningen, the Netherlands

⁷Clinical Sciences Research Institute, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, United Kingdom (UK)

⁸Cardiovascular Research Laboratory, Department of Cardiology, Pneumology and Angiology, Medical Faculty, Heinrich Heine University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

⁹Clinical and Experimental Sciences, Faculty of Medicine, and NIHR Biomedical Research Centre, University of Southampton and University Hospital Southampton NHS Foundation Trust, Southampton, UK

¹⁰Faculty of Medicine and Health Sciences, University of East Anglia, Norwich, UK

¹¹Department of Chemistry, Sonoma State University, Rohnert Park, USA

¹²Department of Food & Nutritional Sciences, University of Reading, Reading, UK

¹³Centre for Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK

¹⁴Molecular Immunology and Toxicology, National Institute Oncology, Budapest, Hungary

¹⁵Unit of Genetics Epidemiology and Bioinformatics, UMCG, RUG, Groningen, the Netherlands

¹⁶Indiana University School of Medicine-South Bend, South Bend, IN, USA

¹⁷MRC Lifecourse Epidemiology Unit, Southampton General Hospital, Southampton, UK

¹⁸Department of Clinical and Experimental Medicine, "Federico II" University of Naples Medical School, Naples, Italy

¹⁹Cancer and Inflammation Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD, USA

Dankwoord / Acknowledgements

De afgelopen jaren heb ik met veel plezier gewerkt aan mijn promotieonderzoek. En dan ineens is het zover; eindelijk kan ik de terugkerende vraag van mijn schoonvader “Is ‘het’ al af?” beantwoorden met een volmondig JA! Een heerlijk gevoel dat ik nooit zou hebben bereikt zonder de samenwerking met en de hulp van velen. Een aantal van hen wil ik hieronder in het bijzonder noemen.

Om te beginnen zijn dit mijn promotoren prof. Harry van Goor, prof. Henri Leuvenink en prof. Martin Feelisch.

Mijn promotie-avontuur begon nadat Harry van Goor mij 48 uur de tijd had gegeven om te beslissen: “*Are you in or are you out?*”. Beste Harry, Nog altijd word jij gekenmerkt door aanstekelijk enthousiasme en voortvarendheid. Daarnaast versta jij als geen ander de kunst van *motivational speaking*; een vaardigheid waar ik bij tijd en wijle veel profijt van heb gehad. Ook waardeer ik het dat jouw blik altijd gericht is op de toekomst en jij nooit zou zeggen “*I told you so*”. Hoewel we wel eens botsen, zijn we langzamerhand uitgegroeid tot een *dream team*. Gelukkig biedt mijn interesse in de oudere mens aanknopingspunten om onze samenwerking in de toekomst voort te zetten. Dank voor alles!

Beste Henri, Hoewel de uiteindelijke inhoud van mijn proefschrift anders doet vermoeden, heb ik de afgelopen jaren een groot deel van mijn tijd bij jou op het Chirurgisch Onderzoekslab doorgebracht. Onder het motto “een promovendus is als zelfrijzend bakmeel” liet jij mij naar hartenlust zwemmen tussen de slangetjes die uiteindelijk en goed functionerende geïsoleerde perfusieopstelling voor ratten nieren zouden vormen. Ondertussen stond jouw deur altijd open voor vragen en vooral ook voor een praatje. De manier waarop jij je kunt verwonderen is inspirerend. Het mysterie van het vasodilerende zout zal ook mij niet snel loslaten. Dank voor de ruimte die je me gaf om het zelf te proberen, maar ook voor de creatieve oplossingen die je me bood wanneer dat nodig was.

Dear Martin, I am honoured you decided to join Harry and Henri and become my promotor. Your profound knowledge and critical view have greatly contributed to the quality of this thesis. Thank you so much. I am also very grateful to you for hosting Marian and me in your lab in Southampton. I fondly remember the lively discussions we had in the ordained chaos of your office. It inspires me to see you live by the 12th proposition that comes with this thesis; anything is interesting in your eyes.

Geachte leden van de beoordelingscommissie, prof. Bindels, prof. Gaillard en prof. Reijngoud, hartelijk dank voor het beoordelen van mijn proefschrift.

Mijn paranimfen, Cyriel Olie en Leon van Dulleman, en ik werden samen in Oxford door Benedikt ‘*The Dutch Team*’ gedoopt. Ik vind het geweldig dat we ons nu opnieuw zullen verenigen. Lieve Cyriel, Jij weet niet half hoe leuk je bent. Gelukkig had Becky dat meteen wel in de smiezen. Dank voor je gezelligheid! Lieve Leon, Dankzij jou kwamen Roeland en ik in Oxford in een warm bad terecht. Helemaal suup, maar helaas voor jou geen reden om je te laten winnen bij Boonanza. Ik hoop in de toekomst nog vele malen de strijd met je aan te gaan, bij voorkeur op locatie onder het genot van een toetje.

In Groningen laveerde ik voor mijn onderzoek tussen de afdeling Pathologie met het O&O-lab en het Chirurgisch Onderzoekslab, oftewel het COL. Op beide locaties voelde ik me thuis dankzij vele leuke collega's. Eenieder van hen wil ik hiervoor hartelijk bedanken. Een aantal heeft een belangrijke rol gespeeld bij de totstandkoming van dit proefschrift.

Allereerst Marian Bulthuis. Lieve Marian, Wat ben jij een bijzonder mens! Uit puur enthousiasme besloot jij in je vakantie (!) met mij mee te gaan naar Southampton om van 's ochtends vroeg tot 's avonds laat in het donker te pipetteren. (Door af toen heel even uit het wc-raampje te hangen, wisten we een vitamine D deficiëntie nog net te voorkomen.) Waar het chemiluminescentie apparaat meermaals oververhit raakte, bleef jij cool. Wat hebben we ondanks alles een lol gehad samen! Ik ervaar het als een voorrecht dat ik je tijdens deze trip beter heb leren kennen. Dankjewel voor alles.

Ook Marinda Dekker en Lisette den Boef ben ik dank verschuldigd. Lieve Marinda, Ook jij hebt er lustig op los gepipetteerd. Heel hartelijk dank voor je tomeloze inzet. Je wordt gemist op het lab sinds je aan een nieuwe uitdaging begonnen bent. Lieve Lisette, Door omstandigheden duurde onze samenwerking maar kort. Jammer, want we konden het samen opperbest vinden. Bovendien was jij werkelijk van alle markten thuis. Ik wens je alle goeds. Ook Annelies Adema wil ik hartelijk bedanken voor onze kortdurende, maar prettige samenwerking. Lieve Annelies, Als jij er niet geweest was, waren de eerder genoemde slangetjes misschien wel nooit op de juiste plek terechtgekomen.

En dan de opperbevelhebber van het COL, Jacco Zwaagstra. Lieve Jacco, Zonder jouw hulp zou menig experiment van mij in de soep zijn gelopen. Gelukkig draai jij je hand niet om voor een *last-minute* bestelling. Bedankt dat ik op de gekste momenten en zelfs op afstand op jouw hulp kon rekenen.

Ook Petra Ottens en Susanne (inmiddels) Berghuis-Veldhuis stonden steeds weer voor mij klaar. Lieve Petra en Suus, Altijd even goed gehumeurd verschenen jullie voor dag en dauw met 'taartdoos' op het lab om voor mij de zoveelste nier te prepareren. Hoe de planning er ook uitzag, jullie bleven de rust zelve. Dank voor alles dat jullie voor mij hebben gedaan.

Verder wil ik Douwe Samplonius, Janneke Wiersema-Buist, Jelle Adelmeijer, Jeltsje Kloosterman en Sippie Huitema hartelijk bedanken voor hun hulp bij verschillende experimenten.

Geachte dr. Bart, beste Jos, Jij bent degene die mij in contact heeft gebracht met Harry. Dank daarvoor.

Geachte prof. Hillebrands, beste Jan-Luuk, Wanneer jij mijn onderzoek vanuit een andere invalshoek bezag, leidde dat vaak tot waardevolle nieuwe inzichten. Bedankt voor je betrokkenheid.

Door de jaren heen was ik ook regelmatig in het proefdierenlaboratorium te vinden. Graag wil ik André Zandvoort, Annemieke Schaafsma, Annemieke Smit-van Oosten, Bianca Meijeringh, Michel Weij, Pieter Klok en Sander Twickler in het bijzonder bedanken voor de ondersteuning die zij mij geboden hebben, waar nodig met stoom en kokend water. Zonder jullie hulp waren mijn dierexperimenten niet uitvoerbaar geweest. Ook gaat mijn dank uit naar Catherine Thuring, Minke van der Laan, Miriam van der Meulen en Wiebe Hofstra.

Met veel plezier heb ik samengewerkt met collega's van verschillende afdelingen. Mijn dank gaat in het bijzonder uit naar de mannen van de Cardiologie, Daan Westenbrink, Harmen Booij, prof. Rudolf de Boer en niet te vergeten Wouter 'Kaplan' Meijers; prof. Stephan Bakker, prof. Gerjan Navis en Isidor Minovic van de Nefrologie; Gertrude Moeke van de Chirurgie; Ilja Nolten van de Epidemiologie; Klaas Kok van de Genetica; en Azuwerus van Buiten en Hendrik Buikema van de Farmacologie.

I have also had the privilege to collaborate with some inspiring people from outside the Netherlands. These include prof. Andreas Pasch from Bern and prof. Peter Nagy from Budapest. Dear Andreas and Peter, many thanks to the both of you for your willingness to answer any question. I have greatly appreciated your feedback.

I also kindly thank all of my co-authors who have not yet been mentioned for contributing to my thesis.

Ook heb ik het geluk gehad als onderdeel van mijn MD/PhD traject onderzoek te mogen doen op locatie in Oxford en Southampton.

Geachte prof. Ploeg, beste Rutger, dank dat je mij de kans bood naar Oxford te komen, zelfs nadat je hoorde dat ik niet de ambitie heb Chirurg te worden. Ik heb daar een fantastische tijd gehad.

Dit heb ik zeker ook te danken aan Prof. Kessler. Dear Benedikt, I am tremendously grateful to you for welcoming me into your lab the way you did. Unfortunately, my time there did not result in a paper or such to benefit you. Nevertheless, I hope you know how much I have learned during my stay and appreciate all of the selfless help you have given me.

In the lab it was Honglei Huang who took me by the hand. Dearest Honglei, I do not know how I would have managed without you. Thank you so much for your guidance. Your helpfulness knows no limit.

I would also like to express my gratitude towards Jade Bailey, Letizia La Faro, Maria Kaiser, Marie Thezenas, Rebecca Konietzny, Roman Fischer and Zhanru Yu for helping me and making me feel so very welcome.

In Southampton Bernie Fernandez and Magda Minnion were the pillars of support for me and Marian. Dear Bernie, Thank you for being so patient with us HPLC and chemiluminescence nitwits. You are such a kind person, I am happy I got to know you. Dear Magda, Thanks to you we finished the whole lot in time. Your working speed is superhuman! Diogo Silva and Jey a.k.a. Beyoncé Jeyapala, you guys are the funniest. Thank you all so much for a wonderful time.

Dit alles werd mogelijk gemaakt door de Junior Scientific Masterclass en de Groningen University Institute for Drug Exploration. Deze organisaties ben ik dan ook zeer erkentelijk.

Met veel plezier herinner ik mij talloze gezellige en vaak hilarische momenten met mijn mede-promovendi. Al mijn kamergenoten, lab-maatjes en andere metgezellen, onder wie Andrie Westerkamp, Anne-Roos Frenay, Anne Van Erp, Cyril Luman, Cheng Chen, Dane Hoeksma, Eelke Bos, Fariba Poosti, Felix Poppelaars, Geert Van Rijt, Gerda Noordmans, Isidor Minovic, Jelmer Humalda, Johannes Wedel, Joost Van den Born, Joris Van Ark, Jurian Kloeze, Kim Holwerda, Laura Burlage, Laura De Vries, Leonie Venema, Madina Baratashvili, Marc



Kirschbaum, Marieke Van Gastel, Marjolein Leemkuil, Maxi Hottenrott, Michele Eisinga, Paria Mahboub, Pauline Snijder, Rik Mencke, Rolando Rebolledo, Ryanne Hijmans, Siobhan Conroy, Silvana Della Penna en Welmoet Westendorp, wil ik dan ook geweldig bedanken voor alle keren dat ze me aan het lachen hebben gemaakt. Ik wens jullie stuk voor stuk het allerbeste!

Lieve A-R, Jouw positieve energie en enthousiasme zijn ongeëvenaard. Ik heb van je genoten op Capri en in Japan, maar ook 'gewoon' achter de gevulde paprika's. Jij verdient niets dan het beste!

Lieve Dane, Jouw legendarische uitspraken (zoals "Wonen die dieren gemengd of in studio's?") en onze gezamenlijke stroomtochten door het ziekenhuis gaven kleur aan een periode waarin ik vrijwel niets anders deed dan 'IPK-en'. Dank daarvoor!

Lieve Joost, Als geen ander ben jij wie je bent en weet jij wat je wilt en dat bewonder ik in je. De manier waarop jij dagelijks de dag beschouwt, vind ik inspirerend. Dank dat ik daar deelgenoot van mocht zijn.

Lieve Leonie, Op de valreep deden wij nog een dappere poging tot een gezamenlijk project. Hoewel het experiment faliekant mislukte, heb ik het heel leuk gevonden om er samen op uit te gaan.

Lieve Rik, *a.k.a.* Rikipedia, Dankzij jou was ik op het lab, letterlijk en figuurlijk, nooit alleen. Bedankt voor je grenzeloze behulpzaamheid, maar vooral ook voor alle gezellige momenten waarop je mij met jouw scherpe taalvondsten verblijdde.

Lieve Sio, Bijzonder mens! Wat konden we samen toch heerlijk klagen om vervolgens in lachen uit te barsten. Dank voor je interesse en gezelschap.

Inmiddels heb ik Groningen verruild voor Deventer waar ik tot mijn grote geluk aan de slag mag bij de Klinische Geriatrie. Beste Ellen E., Ellen S., Evelien, Inge, Marieke en Truus, Dank voor het warme welkom en voor de ruimte die jullie mij gegeven hebben voor het afronden van mijn proefschrift, maar ook om even thuis te zijn. Ik verheug me enorm op de komende periode.

Buiten het werkzame leven heb ik de nodige steun en afleiding gekregen van vrienden en familie:

Lieve BFF's, lieve Britt, Emilie, Eva, Evelien, Liesbeth, Liselotte, Lotte, Margot, Roos en Rosanne, 'Twentse leu, leuke leu', dat blijkt maar weer. Zo'n hechte vriendinnengroep van 'thuishuis' schijnt een unicum te zijn. Dank voor alle gezellige momenten. Ondanks dat ik al jaren de enige ben die buiten Amsterdam woont, kan ik me gewoonweg niet voorstellen dat ik me bij jullie ooit een buitenbeentje zou voelen. Sterker nog, toen het nodig was bleken jullie ondanks de geografische afstand stuk voor stuk pal naast me te staan.

Datzelfde geldt voor mijn lieve clubgenoten, Marion, Marieke, Marlies, Merel, Nathalie, Nynke, Karlijn, Lisette en Renée. Samen vormen wij een bonte mix. Dank voor de gezellige avonden, de trouwe PAC festival bezoeken en alle andere momenten van afleiding.

Lieve Mary, Heel veel succes, maar ook plezier bij jouw promotieonderzoek. Met dat organisatietalent van jou moet dat toch goedkomen. Ik hoop van harte dat je over een aantal jaren net zo positief terug zal kijken als ik nu.

Lieve Kar, jouw betrokkenheid was en is wel heel bijzonder. Steeds als ik het even niet meer zag zitten, vond ik niet veel later een kaartje van jou op de deurmat om me een hart onder de riem te steken. Tenminste, als je niet in persoon naar Groningen of Hengelo was getogen. Met jou kan ik lachen en huilen. *Thank you honey!*

Lieve familie Vas Nunes, lieve Marja, Peter, Sabine, Bas en Jonathan, Dank voor de manier waarop jullie de voortgang van mijn onderzoek gevolgd hebben; met interesse en af en toe een prikkelende vraag. Voor de nodige ontspanning werd ook gezorgd; geen betere afleiding dan Emma die "tante Aaanne" roept. Ik ben blij met jullie!

Ook de broer van Marja, Eric Krenning ben ik dankbaar. Beste Eric, Jij was het die Roeland destijds naar de Proefdierkundecursus stuurde en er later voor zorgde dat ook hij in Oxford terecht kon. Hoe anders was het gelopen zonder jouw bemoeienis?

Ik verkeer in de stellige overtuiging dat het nog nooit zo terecht is geweest dat de familie van een promovendus wordt genoemd in een dankwoord. Zoals in huize Koning gebruikelijk, is de totstandkoming van dit proefschrift met recht een *team effort* te noemen.

Lieve Els, wat was er van dit boekje (of welk ander product dat ik ooit heb afgeleverd dan ook) terechtgekomen zonder jouw creatieve inspanningen, zowel op tekstueel als op illustratief gebied? De prachtige cover en figuren van jouw hand zijn zonder enige twijfel de meest gewaardeerde onderdelen, en terecht. Ik ben er onnoemelijk blij mee. Duizendmaal dank!

Lieve papa, Stelling nummer 12 is slechts één van jouw vele levenslessen die ik koester. Woorden schieten tekort om uit te drukken hoezeer ik je waardeer en dankbaar ben voor alles dat je voor me doet en hebt gedaan. Dankzij jou ziet de lay-out van dit boekje er gelikt uit. Je bent een ronduit fantastisch mens en zo sterk dat ik zeker weet dat jij elke storm kunt doorstaan.

Lieve mama, Hoewel jij zelf steevast ontkent dat je ook maar iets aan mijn onderzoek hebt bijgedragen, denk ik daar anders over. Bovendien ben jij als de ultieme patiënten-dokter mijn grote voorbeeld. Recent nam jouw en daarmee ook ons leven een onverwachte wending. De manier waarop jij hiermee omgaat typeert jou als de krachtige persoon die je bent. Ik ben trots op je!

Dit promotieonderzoek heeft mij veel gebracht, maar het belangrijkste is toch zeker dat ik mijn grote liefde Roeland heb leren kennen. Lieve Roel, bij de Proefdierkundecursus, *of all places*, betoverde jij mij met jouw spitsvondige uitspraken en improvisatietalent. Je mag dan geen ster zijn in het fixeren van proefdieren of het lokaliseren van het woord 'hondenbrokken' in te corrigeren teksten, toch ben je sindsdien mijn steun en toeverlaat. Je bent dan ook een warm en tevreden mens. Samen staan wij bekend als '*the happy couple*' en dat is niet voor niets. Dat ik al die tijd zo'n heerlijk ongecompliceerde relatie had, is misschien wel de factor die mij in staat heeft gesteld dit project tot een goed einde te brengen. Ik zie uit naar het post-promotie tijdperk dat voor ons ligt.

About the author

Anne Maria Koning was born in Hengelo, the Netherlands, on the 4th of June in 1987. Growing up she learned from her father that anything is interesting, as long as you dive into the matter. She received her Atheneum degree at the Bataafse Kamp in Hengelo in 2006. Soon afterwards she started Medical School at the University of Groningen. During the first year she became interested in research and started off attending elements of the Junior Scientific Masterclass (JSM) programme. In the course of her studies her interest in science grew and she spent more time learning about and doing research. In 2011 she was accepted for the JSM MD/PhD programme. This allowed her to combine her clerkships with the research that ultimately led to this thesis. During this time she was supervised by prof. Harry van Goor, prof. Henri Leuvenink, and prof. Martin Feelisch. As part of her PhD Anne performed experiments at the Target Discovery Institute, Oxford, UK (under the supervision of prof. Benedikt Kessler and prof. Rutger Ploeg) and the Clinical and Experimental Sciences Department of the University of Southampton, Southampton, UK (under the supervision of her third promotor, prof. Martin Feelisch).

For her medical internships Anne was stationed at the University Medical Center Groningen and hospitals in Enschede and Deventer. She completed her final internship in the field that interests her most: elderly medicine. During her studies she took an active part in teaching and held positions in several local and national education and research committees. Currently, Anne is working at the Deventer hospital as a resident in Clinical Geriatrics.

