

University of Groningen

## Host-pneumococcal interactions - from the lung to the brain

Seinen, Jolien

DOI:  
[10.33612/diss.126438736](https://doi.org/10.33612/diss.126438736)

**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:*  
2020

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

*Citation for published version (APA):*  
Seinen, J. (2020). *Host-pneumococcal interactions - from the lung to the brain*. University of Groningen.  
<https://doi.org/10.33612/diss.126438736>

### 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.

# Chapter 7

**Nederlandse samenvatting**

**Biography**

**List of publications**

**Acknowledgements – Dankwoord**

## Nederlandse samenvatting

Ernstig zieke patiënten die niet zelf kunnen ademen zijn afhankelijk van mechanische beademing, zoals vaak wordt toegepast op de intensive care (IC) afdelingen van ziekenhuizen. Deze patiënten hebben echter een verhoogd risico op het krijgen van een beademingsgerelateerde longontsteking (pneumonie), een ernstige infectie van de longen. Dit heeft te maken met het feit dat de in de luchtpijp geplaatste beademingsbuis, kan leiden tot het lekken van vloeistoffen vanuit de mondholte naar de longen. Daarnaast belemmert de beademingsbuis het natuurlijke opschoon-mechanisme van de longen en kan de patiënt niet hoesten [1, 2]. Potentieel schadelijke bacteriën kunnen vervolgens in de onderste delen van de longen terecht komen. Wanneer deze bacteriën zich hier gaan nestelen, kunnen ze vervolgens het longweefsel infecteren. In ernstige gevallen kan het zo zijn dat de ziekteverwekkers zich verder verspreiden van de ontstoken longen naar de bloedbaan, wat kan resulteren in een ernstige bloedvergiftiging (sepsis) [3-6]. Daarnaast kunnen de bacteriën ook de barrière tussen de bloedbaan en de hersenen passeren, wat uiteindelijk resulteert in een hersenvliesontsteking (meningitis) [7, 8]. De algemene inleiding van dit proefschrift (**Hoofdstuk 1**) beschrijft de opbouw van het luchtwegstelsel, de aldaar aanwezige micro-organismen (het microbioom), de voor- en nadelen van mechanische beademing en de daaraan gerelateerde gezondheidsrisico's voor patiënten.

De pneumokok *Streptococcus pneumoniae* is de belangrijkste veroorzaker van longontstekingen die hun oorsprong vinden in de samenleving [9, 10]. Hoewel pneumokokkenvaccins over het algemeen goede bescherming bieden tegen longontsteking veroorzaakt door de *S. pneumoniae* bacterie [11, 12], kunnen ze mensen niet tegen andere ziekteverwekkers beschermen die ook longontstekingen veroorzaken. Dit is vooral een risico voor kwetsbare en zwakke patiënten in het ziekenhuis. Preventieve antimicrobiële behandelingen worden derhalve toegepast om het risico op het ontwikkelen van longontsteking en andere infecties te verlagen [13]. Mocht een infectie desondanks optreden, dan kan deze doorgaans bestreden worden met verschillende andere antibiotica. Een voorwaarde hiervoor is wel dat de betreffende ziekteverwekker niet resistent is geworden tegen de toegediende antibiotica. Dergelijke resistentie is helaas een steeds vaker voorkomende complicatie door het onnodige of verkeerde gebruik van antibiotica [14, 15]. Het feit dat lang niet iedereen een longontsteking krijgt, zelfs niet bij dragerschap van bacteriën zoals *S. pneumoniae*, hangt samen met het feit dat de slijmlaag die de luchtwegen bedekt, in combinatie met het immuunsysteem, de mens effectief beschermt tegen ziekteverwekkers [16-19]. In het geval van ziekenhuisopnames kan deze natuurlijke bescherming ondersteund worden door de preventieve toediening van antimicrobiële middelen. Ondanks het feit dat we sinds lange tijd weten dat de luchtwegen in het algemeen goed beschermd zijn tegen ziekteverwekkers, weten we verrassend genoeg nog erg weinig over de verschillende antimicrobiële factoren die de mens produceert en hoe deze kunnen samenwerken met de preventief of therapeutisch toegediende antibiotica. Dit

kennistekort is nog groter in de context van mechanische beademing van patiënten. Het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift, was daarom voornamelijk gericht op de mate waarin de longen van beademde patiënten de groei van micro-organismen kunnen remmen. Hierbij werd de aandacht met name gericht op de factoren die de groei van pneumokokken remmen. Voor het onderzoeken van dergelijke antimicrobiële factoren werd gebruik gemaakt van sputum, het slijm dat zich ophoopt in de longen van beademde IC-patiënten.

Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** was gericht op het analyseren van de potentiële antimicrobiële activiteit in sputum van beademde IC-patiënten. Om dergelijke analyses te kunnen doen, moesten eerst enkele technische hindernissen overwonnen worden die te maken hadden met de chemische en fysische eigenschappen van sputum. Het voornaamste doel was om het sputum zo natuurlijk mogelijk te houden. Het toevoegen van chemicaliën of het verdunnen van sputum was daarom geen optie voor de eerste experimenten. Een andere limiterende factor voor het werken met een biologische vloeistof zoals sputum, is dat de beschikbare hoeveelheden betrekkelijk gering zijn. Met wat creatieve aanpassingen van bestaande protocollen en een beetje doorzettingsvermogen was het echter toch mogelijk om een zogenaamde 'sputum spotting assay' op te zetten voor het beoordelen van de antimicrobiële activiteit, om de concentratie van het veelgebruikte antibioticum cefotaxime in het sputum te meten en om het microbioom van het sputum te analyseren.

De resultaten van de sputum spotting assay laten zien dat er een grote mate aan variatie is in de antimicrobiële activiteit van het verzamelde sputum van verschillende beademde IC-patiënten. De daaropvolgende analyses waren daarom gericht op het achterhalen van de mogelijke bronnen van de gemeten antimicrobiële activiteit. De eerste benadering omvatte het bepalen van potentieel verhoogde concentraties van het antibioticum cefotaxime en de mogelijke productie van antimicrobiële peptides door het microbioom. De resultaten hiervan werden gerelateerd aan de klinische metadata van de geïncludeerde patiënten. De meeste patiënten bleken behandeld te zijn met antibiotica, cefotaxime in het bijzonder. Desondanks kon het gebruik van dit antibioticum slechts ten dele de waargenomen antimicrobiële activiteit verklaren. Daarom werd een mogelijke bijdrage van bacteriën aan de waargenomen antimicrobiële activiteit van bepaalde sputa onderzocht. Bacteriën kunnen namelijk in staat zijn tot het produceren van antimicrobiële peptides. Dit lijkt echter onwaarschijnlijk voor de onderzochte sputa op grond van een zogenaamde 16S rRNA sequentieanalyse, waarmee de samenstelling van het sputum microbioom onderzocht werd. De resultaten suggereerden veeleer dat de antimicrobiële activiteit, zoals gemeten in een substantieel aantal sputa, toegeschreven moet worden aan peptides of eiwitten geproduceerd door de humane gastheer. Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3** was daarom gericht op het aantonen van de aanwezigheid van dergelijke humane antimicrobiële peptides en eiwitten. Hiertoe werden alle eiwitten (het sputum proteoom) en antilichamen in een representatieve subset van de verzamelde sputa onderzocht. Om dit te kunnen doen werden de slijmerige

sputummonsters mechanisch gefragmenteerd en vervolgens onderworpen aan een massaspectrometrische analyse van de eiwitsamenstelling en een flow-cytometrische *Luminex* analyse van de aanwezige antilichamen. Hieruit bleek dat er inderdaad substantiële verschillen zijn in de eiwitsamenstelling van sputa met of zonder antimicrobiële activiteit. Dit was ook het geval voor de aanwezigheid van *S. pneumoniae*-specifieke antilichamen. Een nadere analyse wees tevens uit dat *S. pneumoniae*-remmende sputa met cefotaxime-spiegels onder de minimaal-inhiberende concentratie rijk waren aan eiwitten die gerelateerd zijn aan het aangeboren immuunsysteem. Omgekeerd bleek dat zowel sputa die de groei van *S. pneumoniae* remden, maar relatief hoge concentraties van cefotaxime bevatten, en de niet-remmende sputa rijk waren aan eiwitten die betrokken zijn bij ontstekingsprocessen, met name eiwitten die gerelateerd zijn aan het zogenaamde neutrofiel-elastase. De antilichaam-analyses lieten verhoogde spiegels zien van antilichamen die specifiek zijn voor 18 van de 55 geteste *S. pneumoniae* antigenen in sputa die de groei van deze ziekteverwekker remden. In overeenstemming met de veronderstelling dat de gastheer substantieel bijdroeg aan de antimicrobiële activiteit van bepaalde sputa, lieten de gecombineerde analyses zien dat drie groepen sputum monsters te onderscheiden zijn in plaats van twee. Daarbij is het van belang dat de *S. pneumoniae*-remmende samples in twee groepen opgedeeld kunnen worden. De antimicrobiële activiteit van de ene groep kan verklaard worden op grond van verdedigingsmechanismen van het aangeboren immuunsysteem, terwijl de antimicrobiële activiteit van de andere groep verklaard kan worden door de gecombineerde aanwezigheid van cefotaxime en anti-*S. pneumoniae* antilichamen. Dit betekent dat verhoogde spiegels van antimicrobiële gastheereiwitten, *S. pneumoniae*-specifieke antilichamen en antibiotica bijdragen aan de waargenomen antimicrobiële activiteit van *S. pneumoniae*-remmende sputa. Hoewel dit op zichzelf niet zo verrassend is, was het wel onverwacht dat sommige sputa totaal geen antimicrobiële activiteit vertoonden, terwijl sputa met antimicrobiële activiteit verdeeld konden worden in twee verschillende groepen gebaseerd op hun eiwitsamenstelling.

Een belangrijke vraag was of de antimicrobiële activiteit van sputum voordelig zou kunnen zijn voor mechanisch beademde IC-patiënten. Intuïtief zou men verwachten dat dit het geval is. De gecombineerde resultaten zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** lieten echter een omgekeerd verband zien tussen de mate van antimicrobiële activiteit en het ziekteverloop van de patiënt. Anderzijds lieten de statistische analyses zien dat dit schijnbare verband samenhangt met de ernst van de ziekte, zoals aangeduid met de zogenaamde APACHE IV en SAPS II scores. Hogere APACHE IV en SAPS II scores konden gerelateerd worden aan de pneumokokkengroei-remmende effecten van het eerste sputum monster. Op basis hiervan kan verondersteld worden, dat patiënten met hoge APACHE IV en SAPS II scores wellicht ook te maken hebben met sterkere ontstekingsreacties, die op hun beurt resulteren in hogere spiegels van antimicrobiële stoffen in de respectievelijke sputa op het moment van monsterafname. Hoewel dit een aannemelijke verklaring is, was het helaas niet mogelijk om de eiwitsamenstelling van de sputa te correleren aan het ziekteverloop van de patiënt.

Dit was een consequentie van het relatief kleine aantal sputum monsters en de selectie van bepaalde sputa met of zonder antimicrobiële activiteit voor de eiwit analyses.

Waar het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** en **Hoofdstuk 3** gericht was op de 'gastheerkant' van gastheer-pneumokokken interacties, was het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 4** gericht op het analyseren van de 'pneumokokkenkant' van deze interactie. Choline-bindende eiwitten (CBPs) vormen een klasse van eiwitten die gebonden zijn aan het celoppervlak van de *S. pneumoniae* bacterie. De studies beschreven in **Hoofdstuk 4** waren met name gericht op de structurele organisatie van het relatief onbekende choline-bindende eiwit L (CbpL) en het beantwoorden van de vraag of dit eiwit bijdraagt aan de manier waarop pneumokokken ziekte veroorzaken. Wat CBPs gemeen hebben, is een module-achtige structuur, waarvan in elk geval één module bindt aan het celwandbestanddeel choline. De resultaten lieten zien dat CbpL een multimodulair eiwit is, met een zogenaamd Excalibur deel dat  $\text{Ca}^{2+}$ -bindt, een choline-bindende module en een Ltp\_Lipoproteïne component. CbpL is het enige CBP waarbij het choline-bindende deel tussen de Excalibur en Ltp\_Lipoproteïne domeinen gelokaliseerd is. Een belangrijke waarneming was dat CbpL relevant is voor de interactie tussen *S. pneumoniae* en gastheercomponenten, waardoor het in een muis-infectiemodel niet alleen bijdraagt aan de verplaatsing van de bacterie van de mond naar de longen en de bloedbaan, maar ook aan het ontstaan van longontsteking. Samengevat gaven deze analyses een beter inzicht in de complexe biologische functies van het CbpL eiwit. Een goed begrip van de bijdrage van eiwitten zoals CbpL aan de processen die *S. pneumoniae* in staat stellen om ziekte te verwekken, is van groot belang in de zoektocht naar nieuwe potentiële vaccinkandidaten en nieuwe behandelingsstrategieën.

Wanneer *S. pneumoniae* eenmaal in de bloedbaan terecht is gekomen, kan deze bacterie ook de barrière tussen de bloedbaan en de hersenen oversteken, de hersenen binnendringen en meningitis veroorzaken. Meningitis is een erg gevaarlijke ziekte met hoge ziekte- en sterftcijfers en serieuze gevolgen voor patiënten die deze ziekte overleven [20]. Het is daarom belangrijk om effectievere methodes voor vroege diagnose, maar vooral ook effectievere preventie-strategieën en behandelmethodes te ontwikkelen. **Hoofdstuk 5** was daarom hoofdzakelijk gericht op het verkrijgen van een goed overzicht van de mogelijke interacties tussen *S. pneumoniae* en de bloed-hersenbarrière, die leiden tot de ontwikkeling van meningitis. Daarnaast werden ook mogelijke innovatieve interventies om meningitis te voorkomen en te behandelen voorgesteld. Een aantal verschillende receptoren, zoals de *platelet-activating factor receptor* (PAFr), de *laminin receptor*, de *polymeric immunoglobulin receptor* (pIgR) en de *platelet endothelial adhesion molecule-1 receptor* (PECAM-1) blijken betrokken te zijn bij de binding van pneumokokken en hun daaropvolgende opname en translocatie over de bloed-hersenbarrière. Door het definiëren van de routes en de structuren die de pneumokok gebruikt om zich aan deze barrière te binden, werd het duidelijk dat het ook mogelijk zou moeten zijn om deze binding te voorkomen. Dit inzicht zou kunnen

bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe strategieën om meningitis, veroorzaakt door pneumokokken, te voorkomen of te behandelen. Recentelijk is inderdaad aangetoond dat antilichamen die specifiek binden aan de plgR en PECAM-1 receptoren wellicht voor dit doel gebruikt kunnen worden, aangezien het blokkeren van deze receptoren in muizen bescherming bood tegen het binnendringen van pneumokokken in de hersenen [21, 22].

## Toekomstperspectieven

Samengevat vestigt het onderzoek beschreven in dit proefschrift de aandacht op een aantal sleutelementen in de interacties tussen ziekteverwekkers (met name *S. pneumoniae*) en de humane gastheer. De meeste aandacht ging hierbij uit naar de lagere luchtwegen van mechanisch beademde patiënten, waarbij routinematig verkregen sputummonsters gebruikt werden om de aanwezigheid en het belang van antimicrobiële stoffen, afkomstig van antibiotica-therapie of door de humane gastheer zelf geproduceerd, te bepalen. Hoewel het misschien niet direct evident is, zouden de verkregen resultaten van betekenis kunnen zijn voor (beademde) patiënten. In de eerste plaats laten de resultaten zien dat het analyseren van sputum, dat normaal gesproken wordt weggegooid, inzicht kan geven in de diverse antimicrobiële activiteiten in de longen. Deze informatie kan wellicht in de toekomst meegenomen worden in de behandeling en/of het voorkomen van luchtweginfecties. De geïdentificeerde eiwitten en antilichamen kunnen wellicht benut worden als merkers voor de gezondheid en de ontstekingsstatus van de longen. Omdat het aantal monsters dat gebruikt werd in de onderhavige verkennende studies te klein was voor harde conclusies, zou toekomstig onderzoek zich moeten richten op een grotere en wellicht ook meer gedefinieerde groep patiënten. Hierbij zou het dan belangrijk zijn om meerdere sputummonsters af te nemen op specifieke tijdsintervallen, zodat ook relevante correlaties met de overige patiëntgegevens wellicht gemakkelijker te achterhalen zijn. Daarnaast zouden de geïdentificeerde antimicrobiële eiwitten en peptiden wellicht benut kunnen worden voor de ontwikkeling van innovatieve therapieën voor de bestrijding van luchtweginfecties. Zulke innovatieve antimicrobiële stoffen zullen misschien niet alleen effectief zijn tegen *S. pneumoniae*, maar ook tegen andere belangrijke Gram-positieve veroorzakers van luchtweginfecties, zoals *Staphylococcus aureus*. Daarnaast zouden ze misschien zelfs wel toegepast kunnen worden op Gram-negatieve ziekteverwekkers, zoals *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* of *Pseudomonas aeruginosa*, die de gezondheid van de longen ernstig kunnen ondermijnen. Hetzelfde geldt voor bepaalde antilichamen die de effectiviteit van antibiotica in het longmilieu mogelijk kunnen versterken. De studies beschreven in dit proefschrift kunnen ook als startpunt dienen voor de identificatie van aangrijpingspunten op het celoppervlak van bacteriën, waartegen deze antilichamen zich eventueel richten, zoals geïllustreerd aan de hand van het *S. pneumoniae* CbpL eiwit. Dergelijke studies kunnen eenvoudig worden uitgebreid naar diverse eerdergenoemde verwekkers van luchtweginfecties. Een ander

interessant aspect dat het waard is om verder te onderzoeken, betreft een analyse van de farmacologische eigenschappen van antibiotica in de longen, zoals cefotaxime. Daarnaast zou het van belang zijn om te onderzoeken hoe de preventieve toediening van antibiotica op de lange termijn bijdraagt aan de ontwikkeling van bacteriële antibioticaresistentie in de luchtwegen van beademde patiënten. Voor al deze toekomstige studies zou het slijmerige restmateriaal sputum kunnen dienen als een waardevolle bron van informatie die ons kan helpen bij het ontrafelen van de complexe interacties tussen de humane gastheer, een breed scala aan antimicrobiële middelen van farmaceutische, microbiële of humane oorsprong en de microbiota in de lagere luchtwegen.



## Referenties

- 1 Tobin, M. and Manthous, C. (2017) Mechanical Ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 196, P3-P4
- 2 Pham, T., et al. (2017) Mechanical Ventilation: State of the Art. *Mayo Clin Proc* 92, 1382-1400
- 3 Berube, B.J., et al. (2016) *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Curr Genet* 62, 109-113
- 4 Berube, B.J. and Bubeck Wardenburg, J. (2013) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 5, 1140-1166
- 5 Seillie, E.S. and Bubeck Wardenburg, J. (2017) *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Semin Cell Dev Biol* 72, 101-116
- 6 Weiser, J.N., et al. (2018) *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* 16, 355-367
- 7 Iovino, F., et al. (2016) How Does *Streptococcus pneumoniae* Invade the Brain? *Trends Microbiol* 24, 307-315
- 8 Le Guennec, L., et al. (2020) Strategies used by bacterial pathogens to cross the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* 22, e13132
- 9 Anand, N. and Kollef, M.H. (2009) The alphabet soup of pneumonia: CAP, HAP, HCAP, NHAP, and VAP. *Semin Respir Crit Care Med* 30, 3-9
- 10 Cilloniz, C., et al. (2016) Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. *Int J Mol Sci* 17, 2120
- 11 Bernal, A.C., et al. (2016) Pneumococcal Vaccination Strategies. An Update and Perspective. *Ann Am Thorac Soc* 13, 933-944
- 12 van Werkhoven, C.H. and Huijts, S.M. (2018) Vaccines to Prevent Pneumococcal Community-Acquired Pneumonia. *Clin Chest Med* 39, 733-752
- 13 de Smet, A.M., et al. (2009) Decontamination of the digestive tract and oropharynx in ICU patients. *N Engl J Med* 360, 20-31
- 14 European Centre for Disease Prevention and Control (2019) Antimicrobial consumption in the EU/EEA - Annual Epidemiological Report for 2018. ECDC
- 15 European Centre for Disease Prevention and Control (2019) Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. ECDC
- 16 Huffnagle, G.B., et al. (2017) The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol* 10, 299-306
- 17 Bennett, W.D., et al. (1990) Cough-enhanced mucus clearance in the normal lung. *J Appl Physiol* (1985) 69, 1670-1675
- 18 Bennett, W.D., et al. (2013) Multisite comparison of mucociliary and cough clearance measures using standardized methods. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 26, 157-164
- 19 Lloyd, C.M. and Marsland, B.J. (2017) Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity* 46, 549-561
- 20 G. B. D. Meningitis Collaborators (2018) Global, regional, and national burden of meningitis, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 17, 1061-1082
- 21 Iovino, F., et al. (2017) plgR and PECAM-1 bind to pneumococcal adhesins RrgA and PspC mediating bacterial brain invasion. *J Exp Med* 214, 1619-1630
- 22 Iovino, F., et al. (2018) Receptor Blockade: A Novel Approach to Protect the Brain From Pneumococcal Invasion. *J Infect Dis* 218, 476-484

## Biography

Jolien Seinen was born on January 7<sup>th</sup>, 1989 in Heerenveen, the Netherlands. After finishing high school in 2007, she studied Biomedical Sciences at the University of Groningen. The bachelor studies included an internship at the Department of Medical Microbiology - Molecular Bacteriology of the University Medical Center Groningen (UMCG), which ignited her interest in infectious diseases. She then continued with her master in Biomedical Sciences at the University of Groningen from 2010-2012. A first research internship was performed at the Department of Medical Microbiology - Molecular Bacteriology (UMCG) under the supervision of Dr. Eleni Tsompanidou and Prof. Jan Maarten van Dijk. Here she investigated the colony spreading phenomenon of *Staphylococcus aureus*. She expanded her practical skills and gained clinically relevant expertise during a second research internship at the Department of Biomedical Engineering and the Department of Orthopedic Surgery (UMCG). Under the supervision of Dr. Daniëlle Neut and Prof. Sjoerd K. Bulstra she investigated the possibility of the yeast *Candida albicans* acting as a Trojan horse for bacteria from the nasopharynx, leading to hematogenous prosthetic joint infections. After her graduation she started working as a technical assistant at the Department of Medical Microbiology - Clinical Bacteriology (UMCG), where she was first introduced to the biological material 'sputum'. In 2014 she started her doctoral research on the dissection of antimicrobial activities of sputa collected from mechanically ventilated Intensive Care Unit patients. This research was performed in the context of a Dutch - German research collaboration and, accordingly, it was performed at the Department of Medical Microbiology - Molecular Bacteriology (UMCG) under the supervision of Prof. Jan Maarten van Dijk, at the Department of Critical Care (UMCG), under the supervision of Dr. Willem Dieperink and Prof. Anne Marie G. A. de Smet and at the Department of Molecular Genetics and Infection Biology of the University of Greifswald under the supervision of Prof. Sven Hammerschmidt. On June 8<sup>th</sup>, 2020 she obtained a double PhD degree from the Universities of Groningen and Greifswald following the defense of the present thesis.

## List of publications

**Seinen, J.**, Engelke, R., Abdullah, M.R., Voß, F., Michalik, S., Dhople, V.M., Dieperink, W., de Smet, A.M.G.A., Völker, U., van Dijl, J.M., Schmidt, F., and Hammerschmidt, S. Sputum proteome signatures of mechanically ventilated Intensive Care Unit patients distinguish samples with or without antimicrobial activity. *Submitted*

**Seinen, J.**, Dieperink, W., Mekonnen, S.A., Lisotto, P., Harmsen, H.J.M., Hiemstra, B., Ott, A., Schultz, D., Lalk, M., Oswald, S., Hammerschmidt, S., de Smet, A.M.G.A., and van Dijl, J.M. (2019) Heterogeneous antimicrobial activity in broncho-alveolar aspirates from mechanically ventilated intensive care unit patients. *Virulence* 10, 879-891

Gutiérrez-Fernández, J., Saleh, M., Alcorlo, M., Gómez-Mejía, A., Pantoja-Uceda, D., Treviño, M.A., Voß, F., Abdullah, M.R., Galán-Bartual, S., **Seinen, J.**, Sánchez-Murcia, P.A., Gago, F., Bruix, M., Hammerschmidt, S., and Hermoso, J.A. (2016) Modular Architecture and Unique Teichoic Acid Recognition Features of Choline-Binding Protein L (CbpL) Contributing to Pneumococcal Pathogenesis. *Sci Rep* 6, 38094

Iovino, F., **Seinen, J.**, Henriques-Normark, B., and van Dijl, J.M. (2016) How Does *Streptococcus pneumoniae* Invade the Brain? *Trends Microbiol* 24, 307-315

Tsompanidou, E., Denham, E.L., Sibbald, M.J., Yang, X.M., **Seinen, J.**, Friedrich, A.W., Buist, G., and van Dijl, J.M. (2012) The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 7, e44646

## Acknowledgements – Dankwoord

This thesis has been established with the help of many colleagues and the support of friends and family. I would like to thank the following people in particular:

Mijn promotor Prof. J.M. van Dijl: Beste Jan Maarten, onze samenwerking is eigenlijk begonnen tijdens een soort snuffelstage van 5 weken in het laatste jaar van mijn bacheloropleiding. Ook tijdens de twee stages van de masteropleiding was je betrokken bij mijn onderzoek. Na mijn afstuderen kwam ik terecht bij de klinische bacteriologie, maar we kwamen elkaar nog regelmatig tegen in de gangen van het UMCG. Op een dag zei je “Goed dat ik je zie, ik denk dat ik het perfecte promotieproject voor je heb!”. Ik werd enthousiast en kwam wederom weer bij je in het lab werken, nu voor het eerste deel van mijn promotietraject. Ik wil je bedanken voor je positieve blik op nagenoeg alles en de manier waarop je mij bij elke tegenslag toch weer wist te motiveren. Daarnaast wil ik je bedanken voor de “Skype achter de deur”, waarmee het schrijven van artikelen en dit proefschrift beduidend meer vaart heeft gekregen en alles nog mooier werd.

My supervisor Prof. S. Hammerschmidt: Dear Prof. Hammerschmidt, we first met at the recruitment symposium for the Research Training Group (RTG) 1870, a project you initiated. Our first conversation was very pleasant, and I applied for one of your projects. I would like to thank you for the opportunities you provided within this RTG, and for the experience of going abroad and working in different laboratories. I appreciate your interest in my “bench to bedside”-related research project, even when it turned out we could not combine it with the initial project. Thank you for all the stimulating discussions and your support at the various stages of my PhD.

Mijn promotor Prof. A.M.G.A. de Smet: Beste Anne Marie, ik wil je bedanken voor alle mogelijkheden die je me hebt geboden, onze wetenschappelijke discussies en je klinische blik op het geheel. Ik waardeer je manier van doorpakken en de directheid waarmee je mij feedback hebt gegeven. Je uitspraak “promoveren gaat ook over het verhogen van je stress tolerantie” en het moment waarop je mij voor kerst een autorijles cadeau gaf, zal ik nooit vergeten.

Mijn co-promotor Dr. W. Dieperink: Beste Willem, zonder sputum samples zou dit proefschrift niet zijn huidige vorm hebben gekregen, dus ik wil je graag bedanken voor het opzetten van de BacRes sputum studie op de intensive care. Ik heb veel van je geleerd over het doen van klinisch onderzoek en ik waardeer onze discussies over de analyses die ik vervolgens in het lab op de sputum samples heb losgelaten. Het feit dat je bij één van de RTG-meetings een beademingsinstallatie kwam demonstreren, is typerend voor je enthousiaste betrokkenheid bij het project. Bedankt daarvoor.



The assessment committee: Thank you Prof. M. Schmidt, Prof. P. Heeringa, Prof. D. Becher and Prof. P. F. Zipfel for your time to read and examine my PhD thesis.

De Intensive Care volwassenen afdeling: Ik wil graag iedereen bedanken die betrokken is geweest bij de BacRes studie, waaronder de (research) verpleegkundigen voor het verzamelen van data en samples. Hildegard, bedankt voor het opzetten van de studie en je interesse in het onderzoek. Albèrt, bedankt voor het samenstellen van de enorme datasets.

The Department of Medical Microbiology - Molecular Bacteriology (MolBac): I would like to thank my MolBac colleagues for the stimulating scientific environment, the fun we had also outside of the lab and the friendships that have developed. Sjouke, my bachelor internship with you triggered my interest in scientific research. Eleni and Jolanda, my conversations with you were the last push for me to step into this PhD trajectory. Rense and Dennis, in a research lab like MolBac many people come and go, but you have remained consistently. Thank you for your interest, support and "gezelligheid". Francisco, you were the one who helped me overcome my fear for talking in English. Thank you for your positivity, your help with all my questions and sharing your beloved cookies with me. Solomon, it has always been nice for me to share with you the experience of starting the sandwich PhD in Groningen and continuing in Greifswald. Thank you for all your help with my projects and our nice conversations. Andrea, Suruchi, Tim and Bimal, you all have such warm personalities and I would like to thank you for the nice conversations and get-togethers outside of the lab. My student Arnout, it was fun supervising you and I learned a lot from it. Hermie, Carien, Paola and Rita, thank you for the opportunity, guidance and help with the 16S analyses. Girbe, Corinna, Mehdi, Janine, Marco, Dillon, Marleen, Marjolein, Lisanne, Stefano, Xin, Margarita, Yaremit, Rocío, Gaby, Marines, Mafalda, Elisa, Marina, Nana Ama, Ikram, Sierd, Rudi and Giorgio, thank you for our conversations and contributing to the good vibes in the working group.

The Department of Molecular Genetics and Infection Biology (AG SHA): I would also like to thank my colleagues of the AG SHA for the scientific discussions, support and again the friendships that have developed. Thomas and Sylvia, also thank you for your help with practical things outside of the lab. Susann, Anke, Kristine, Karsta, Peggy and Birgit, I appreciate your administrative or technical support and our enjoyable small talk in German. Mohammed, Sajida and Niamatullah, thank you for the warm welcome to your office. I always enjoyed our non-scientific conversations a lot. Patience, Max, Fabian, Stephanie, Surabhi, Sebastian, Nicolas, Richael, Murtadha and Kristin, sharing an office with that many people can be challenging, but we managed. I enjoyed the conversations, movie nights and other social activities. Franziska, Ulrike, Nathalie and Alejandro, I always appreciate our talks or calls about both work and private life, thank you for your advices. Nikolai and Dr. Burchhardt, thank you for your suggestions for improvement of experimental set-up and data presentation.

The Research Training Group 1870: The RTG was a collaboration between several Departments in both Germany and the Netherlands. Together, we were working on different aspects related to bacterial respiratory infections. Our regular meetings together have helped me personally with a smooth transition from working in Groningen to working in Greifswald. I would like to thank everyone for the many nice discussions and suggestions for my research. Dear Prof. W. van Wamel en M. Tavakol, dear Willem and Mehri, thank you for the opportunity to do experiments with the calscreeener, I learned a lot from it. Sylvia and Susann, already mentioned before, but also thank you for the organization of these meetings and the coordination of many other activities within the RTG. Dear Anica and Alex, I appreciate our friendship very much. You have helped me a lot with many private matters and I enjoyed our talks about both science and personal life. Dear Laura, we first met on our way to the RTG recruitment symposium. I admire your enthusiasm for science, and I would like to thank you for the endless conversations we had about so many aspects in (PhD) life.

Co-authors: Dear co-authors of the (soon to be) published papers in this thesis, thank you very much for our fruitful collaboration. I am grateful for the opportunity to work in your lab and/or learn from your expertise. Our discussions were always very helpful.

Douwe Oppewal van [www.oppewal.nl](http://www.oppewal.nl): Bedankt voor het bewaren van de rust bij het opmaken van mijn proefschrift. Met jouw hulp werd een simpel proefschrift manuscript ineens een echt proefschrift. Ronald Dob: bedankt voor het aanleveren van de CT-afbeelding van de longen, welke ik vervolgens vrij heb mogen gebruiken en die daarom nu ook op de omslag staat.

Secretariaat MMB, het klinische bacteriologie lab en de beveiliging: Ik wil graag de dames van het secretariaat bedanken voor hun administratieve ondersteuning. Ank, het is altijd gezellig om even bij te kletsen en bedankt voor het uit handen nemen van het versturen van de proefschriften. Ik wil ook graag de mensen van de klinische bacteriologie benoemen, van mediabereiding tot het beantwoorden van mijn vragen en het inzetten van testen, jullie zijn altijd bereid om te helpen. (Onder andere) Careen, Peter, Bas, Petra, Gini, Guido, Iris, Hanny, Zadrach en Bert: bedankt. Daarnaast heb ik de telefoontjes van de beveiliging van het UMCG, tijdens experimenten in de avond, altijd zeer gewaardeerd "alles nog goed, hoe lang nog? Over een uurtje weer?".

Mijn vrienden: Ik wil mijn vrienden graag bedanken voor alle steun en interesse in mijn project. Onze goede gesprekken, van dichtbij of ver weg, hebben me vaak genoeg weer energie gegeven om verder te gaan. Linda, altijd fijn om alles met jou te kunnen bespreken. Jouw "niet haken, maar beuken"-motto hebben me op zoveel verschillende momenten geholpen. Bij jou hoef ik de schijn niet op te houden want je prikt er toch wel doorheen. Diewu en Erwin, ik waardeer het dat jullie altijd achter me staan en mij laten inzien trots

te zijn op hetgeen ik heb bereikt. Ditmer en Miriam, bedankt voor jullie gezellige bezoek in Greifswald en de stok achter de deur in de laatste fase van mijn promotieonderzoek. Dorien, ik heb het altijd heel stoer gevonden dat je in het buitenland ging studeren, iets wat ik "echt niet ging doen" (...). Het voelt iedere keer vertrouwd als we weer bijpraten. Edwin en Susana, wat hebben we toch altijd veel te bespreken. Gelukkig komt dat niet alleen maar door de proefschrift-hulplijn. Femke, heerlijk hoe we altijd kunnen lachen om onze eigen gekkigheid. Ik waardeer hoe ontspannen onze gesprekken zijn. Marindy, ik vind het leuk dat we na onze master stages nog altijd contact hebben. Nicolette, van tv-programma's tot het doen van promotieonderzoek en babypraat, fijn hoe alles altijd besproken kan worden. Nynke, wat vind ik het mooi dat we sinds de basisschool nog steeds vriendinnen zijn. Suzanne, jij hebt altijd een bepaalde rust over je en daar zou ik nog veel van kunnen leren. Gidiony, ik waardeer de ambitie die je hebt en hoe je altijd voor me klaarstaat. Mirjam, het klikte meteen bij onze eerste ontmoeting bij de PhD introductie en daar ben ik nu nog blij om. Helga, Iwan, het is altijd gezellig als we weer bij praten.

Mijn familie: Van Nederland tot aan Australië, een ieder van jullie heeft altijd interesse getoond en daar wil ik jullie voor bedanken. Ivo, ik waardeer het dat je altijd voor me klaar staat als er wat moet gebeuren. Ik ben blij met jou als broer en met Maaike als schoonzusje. Papa en mama, heitie en memmie, jullie verdienen een ereplaats. Jullie steunen me in alles en hebben zoveel voor mij gedaan. Van het verhuizen naar Greifswald, het heen en weer rijden naar Leer of het sturen van de enorme hoeveelheid post, maar vooral ook het luisterende oor en het vertrouwen in mij - dit heeft mij altijd zoveel goed gedaan en daar wil ik jullie heel erg voor bedanken.

Thank you very much - Heel erg bedankt.

Jolien Seinen, 2020