

University of Groningen

Conditions for *Faecalibacterium prausnitzii* colonization, survival and host-microbe interactions in the human host

Bravo Ruiseco Sanchez, Gaby

DOI:
[10.33612/diss.236915644](https://doi.org/10.33612/diss.236915644)

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:
2022

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

Citation for published version (APA):
Bravo Ruiseco Sanchez, G. (2022). *Conditions for Faecalibacterium prausnitzii* colonization, survival and host-microbe interactions in the human host. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.236915644>

Copyright

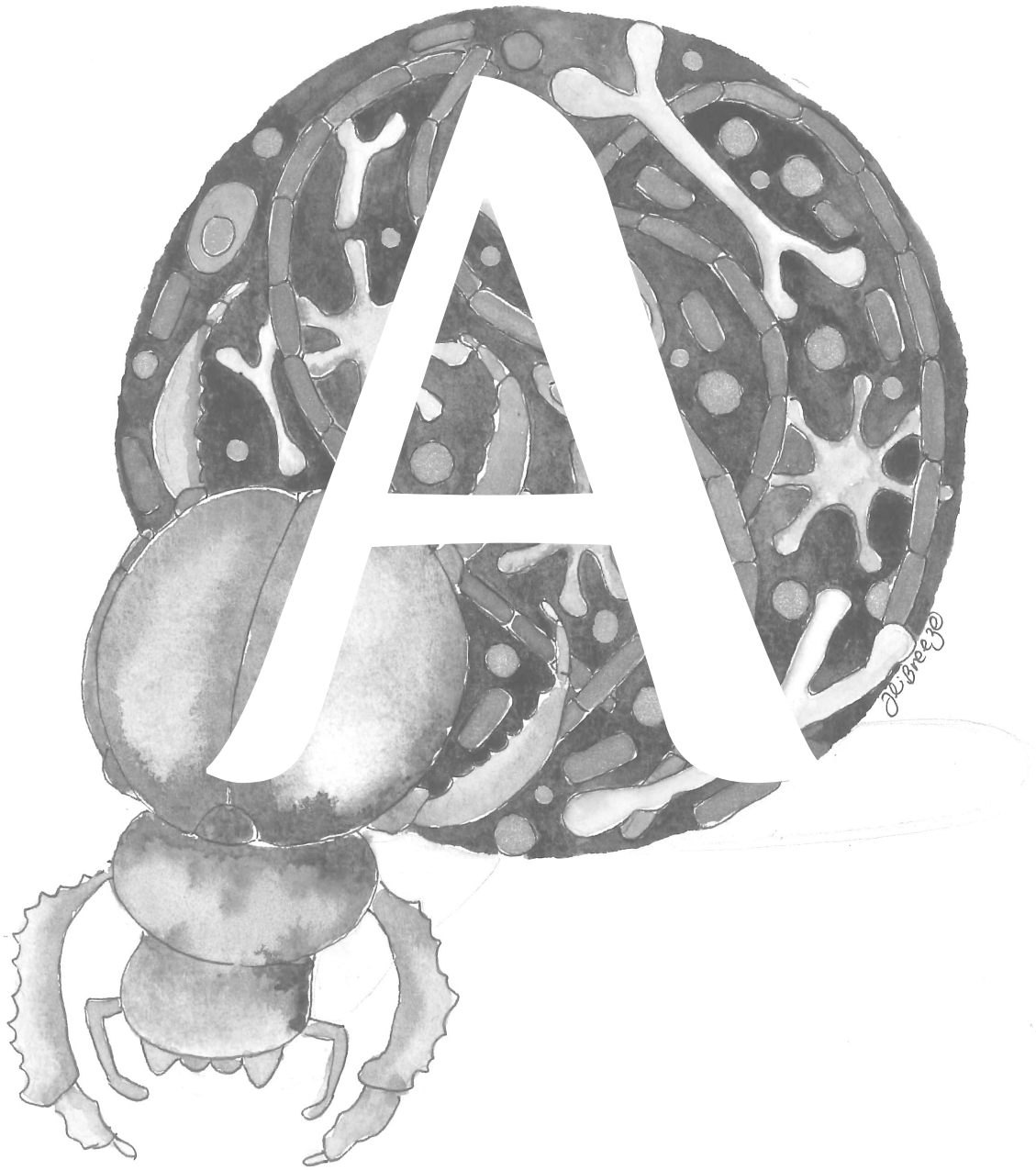
Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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 en conclusie

Een gebalanceerde samenstelling van micro-organismen in de menselijke darm, de zogenaamde microbiota, waarborgt de juiste gastheer-microbe interacties die de sleutel zijn voor een gezonde darm. Deze interacties beïnvloeden ook onze algehele gezondheid, omdat ze ook systemische effecten hebben of zelfs ons neurale systeem kunnen beïnvloeden [1]. Een van de belangrijkste bacteriële metaboliëten achter dit gezondheidseffect is butyraat. Dit korteketenvetzuur is een energiebron voor de epitheelcellen, kan genexpressie reguleren, heeft immuun modulerende eigenschappen en kan daarnaast ook ontstekingsprocessen moduleren [2,3]. Het in dit proefschrift beschreven promotieonderzoek maakte gebruik van de veelvoorkomende en gezondheid-bevorderende darmbacterie *Faecalibacterium prausnitzii* als een modelorganisme om gastheer-microbe interacties te bestuderen en om de mechanismen te ontleden waarmee deze obligaat anaerobe bacterie, waarvoor zuurstof toxisch is, kan overleven in en mogelijk ook buiten de menselijke darm. Deze bacterie is één van de meest voorkomende darmbacteriën in de microbiota van gezonde individuen (rond 5% van alle darmbacteriën) en is bij zieke personen juist vaak verminderd aanwezig [4]. Deze studies werden uitgevoerd met het doel om de overleving van *F. prausnitzii* en andere butyraat-producerende bacteriën in de gastheer in de toekomst te ondersteunen, hetzij door ze te beschermen onder ontstekingsomstandigheden, hetzij door de kolonisatie van een baby te stimuleren of in scenario's van onbalans, een zogenaamde dysbiose, te (her)introduceren. In deze samenvatting worden de belangrijkste bevindingen en conclusies weergegeven alsmede suggesties voor vervolgonderzoek en de implicaties van dit onderzoek voor toekomstige therapeutische interventies.

Dit proefschrift is onderverdeeld in **twee delen**. Studies beschreven in het **eerste deel** waren gericht op het begrijpen van beide zijden, de menselijke darmepitheelcellen en de darmbacteriën, van de gastheer-microbe interacties met een focus op de anaerobe microbiota. Hiertoe werd het **HoxBan** *in vitro* co-kweekmodel toegepast [5], omdat het gelijktijdige analyses mogelijk maakt van de communicatie tussen zuurstofafhankelijke menselijke cellen (**H**umaan **o**xygen) aan de ene kant en anaerobe micro-organismen (**B**acterie **a**naeroob) aan de andere kant.

F. prausnitzii stimuleert de productie van *IL18* in darmepitheelcellen

De experimenten beschreven in **Hoofdstuk 2** startten met de bevinding dat er in een cohort van patiënten met de inflammatoire darmziekte (IBD) een positieve correlatie bestaat tussen de expressie van het cytokine *IL18* in het darmweefsel en de hoeveelheid *F. prausnitzii* in de ontlasting van deze patiënten. Vervolgexperimenten met het HoxBan systeem suggereren dat *IL18*-expressie wordt gereguleerd door een transcriptionele modulatie van de hypoxie-induceerbare factor 1- α (HIF-1 α), wat wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van *F. prausnitzii*. Dit kwam overeen met resultaten van eerdere dierstudies, waarbij bacteriële kolonisatie van de darm gecorreleerd bleek te zijn met een verhoogde expressie van *IL18* [6,7]. De productie van dit cytokine zou een beschermend effect kunnen hebben op het darm-immunologische milieu, door een vermindering van T-helper 17-cel-differentiatie en een stimulering van Foxp3 + regulerende T-cellen (Tregs) [8]

Welke bacteriële bioactieve stof hiervoor verantwoordelijk zou kunnen zijn is nog niet duidelijk: butyraat is een van de belangrijkste stoffen die door *F. prausnitzii* worden geproduceerd en eerder onderzoek liet inderdaad een butyraat-gemedieerde HIF-1 α -activering zien [9], maar het kan ook nog een andere stof zijn, zoals eiwitten en peptiden die de bacterie uitscheidt.

Appendices

Aangezien goedaardige butyraatproducenten, zoals *F. prausnitzii* en *Eubacterium rectale*, obligeert anaeroob groeien, zijn de pogingen om ze als probiotica te gebruiken een serieuze uitdaging gebleken. Daarom is het wellicht eenvoudiger om juist de bioactieve stoffen, geproduceerd door dergelijke bacteriën, te gebruiken. Momenteel worden proteoom-analyses uitgevoerd op basis van de HoxBan-experimenten beschreven in **Hoofdstuk 2** om de bacteriële eiwitten te identificeren die wellicht de interacties kunnen verklaren die waargenomen zijn tussen Caco2-cellen en *F. prausnitzii*.

HoxBan-feces: Een nieuwe manier om wederzijdse interacties tussen darmcellen en darmbacteriën te bestuderen

In **Hoofdstuk 3** is een nieuw *in vitro* model ontwikkeld op basis van het HoxBan model, waar ditmaal niet alleen maar met *F. prausnitzii* als modelbacterie is gewerkt, maar met complexe microbiota, zoals feces, als entmateriaal. Dit was een belangrijke stap voorwaarts voor het leren begrijpen van de gastheer-bacteriële interacties in de darm in hun volle complexiteit. Het HoxBan-feces model werd gevoed met de voedingsvezel inuline of het lichaams-eigen mucus. De resultaten na 18 uur co-kweken van darmcellen en darmbacteriën waren verbluffend: ze lieten vol gegroeide buizen met een grote biodiversiteit aan bacteriekolonies zien en gezonde levende darmcellen zonder ontstekingsverschijnselen. Dit systeem werkt omdat het voldoet aan een drietal basisregels die de hoekstenen vormen voor de microbiële ecologie [10], namelijk: (i) Concurrentie om voedingsstoffen: omdat het gebruikte YCFA-medium zeer voedzaam is, werd een laag PBS-agar onder de kweekmedia geïntroduceerd, waardoor een diffusiegradiënt van voedingsstoffen wordt gegenereerd die bacteriële concurrentie zal veroorzaken. (ii) Cross-feeding: het gebruik van complexe polymeren als koolstofbronnen in de bacteriële media stelt een grens aan de groei van snelgroeiende bacteriën, omdat ze afhankelijk worden van de werking van de langzaam groeiende vezelafbrekers. (iii) Ecologische niche: de verticaal gelaagde structuur van het nieuwe HoxBan-model bevordert de vorming van een zuurstofgradiënt, die de groei van zowel facultatief aerobe als anaerobe micro-organismen mogelijk maakt. In deze opstelling werd de translocatie van aerobe bacteriën naar het compartiment met menselijke darmcellen voorkomen door de toevoeging van een extra steriele mucus-laag, vergelijkbaar met de situatie in een normale (gezonde) darm.

In dit nieuwe model bleef de persoon-specifieke bacteriële samenstelling behouden, ondanks dat het wel leek te selecteren op bifidobacteriën. Daarom kan worden geconcludeerd dat dit nieuwe *in vitro* model ons in staat stelt om de effecten van bepaalde bacteriële profielen, zoals een dysbiotische microbiota of een specifiek type microbiota, op de levensvatbaarheid en ontstekingsstatus van darmepitheelcellen te bestuderen. De veelzijdigheid van dit HoxBan-systeem stelt ons in staat om in de toekomst verdere verbeteringen aan te brengen met speciale mogelijkheden voor het compartiment dat de menselijke epitheelcellen bevat. Bijvoorbeeld, (i) in de nabije toekomst kunnen primaire menselijke cellijnen of zelfs organoïden gebruikt worden om een betere benadering van de bacteriële effecten op gezonde of zieke menselijke cellen te verkrijgen. (ii) Het systeem zou ook immuun-cellen kunnen bevatten om de communicatie tussen het immuunsysteem en de darmbacteriën te begrijpen. (iii) Het systeem zou synthetische bacteriële gemeenschappen kunnen herbergen, ontworpen om de effecten van combinaties van bepaalde bacteriesoorten op menselijke cellen te bestuderen.

Het HoxBan-feces systeem kan beschouwd worden als een modulair model waarmee een breed scala aan verschillende onderzoeksvragen kan worden beantwoord. Ten slotte kunnen de effecten van bepaalde interventies in het model worden getest om aanwijzingen te verkrijgen voor klinisch relevantie, zoals het behandelen van ziekten zoals IBD.

Het **tweede deel** van dit proefschrift richt zich op de studie van de verschillende overlevingsmechanismen van *F. prausnitzii*. Een dieper begrip van deze basismechanismen is nodig, vooral wanneer faecalibacteriën opnieuw in de darm van de gastheer moeten worden geïntroduceerd bijvoorbeeld als een probioticum, of wanneer dysbiotische microbiota moet worden verbeterd tot een gezonde darmmicrobiota.

Flesvoeding kan een hindernis zijn voor de groei van *F. prausnitzii* en kolonisatie van de darmen van een baby.

De microbiële kolonisatie van de darm van een pasgeboren baby gaat volgens een stapsgewijze opeenvolging van verschillende soorten. Het begint met facultatief aerobe microben, gevolgd door facultatief anaeroben en tenslotte door strikt anaëroben. Uiteindelijk zullen in de microbiota van volwassenen anaerobe bacteriesoorten de andere micro-organismen getalsmatig ruim overtreffen [11]. De manier van bevallen van een baby en de voeding daarna zijn doorslaggevende factoren bij de ontwikkeling van de darmmicrobiota van het kind. Moedermelk is een belangrijke factor in dit proces, omdat het speciale suikers bevat die niet kunnen worden verteerd door menselijke enzymen. Deze speciale suikers, of humane melk-oligosachariden (HMO), bevorderen de groei van bifidobacteriën, die zo kenmerkend zijn voor de microbiota van een zuigeling. Daarentegen is de microbiota van zuigelingen die flesvoeding krijgen minder rijk aan bifidobacterie-soorten dan zuigelingen die moedermelk krijgen [12]. Eerder onderzoek schreef dit verschil toe aan het gebrek aan HMO's in flesvoeding [13] maar andere factoren kunnen ook van invloed zijn op de waargenomen verschillen tussen de microbiota van borst-gevoede en fles-gevoede kinderen.

Hoofdstuk 4 van dit proefschrift beschrijft studies die gericht waren op het verkrijgen van een beter begrip van de microbiële kolonisatie van de darmen van kinderen. Dit fenomeen werd echter benaderd vanuit een perspectief dat zelden wordt gezien als factor in de literatuur, namelijk vanuit de mogelijke rol van vetten. Vet is een van de belangrijkste voedingsstoffen in moedermelk en het is goed voor 50% van de energiebehoefte van een kind. Momenteel is het gebruikelijk dat de producenten van zuigelingenvoeding de koemelktriglyceriden vervangen door plantaardige oliën om zo de vereiste voedingsniveaus te bereiken [14]. Het gebruik van deze vetten in zuigelingenvoeding kan echter na vertering ook leiden tot de vorming van zepen. Met name het vrijgekomen vetzuur palmitaat kan precipiteren (klontjes vormen) met calcium tot de zeep calciumpalmitaat.

De laboratoriumexperimenten beschreven in **hoofdstuk 4** laten zien dat dit in de darm geproduceerde calciumpalmitaat de groei van sommige nuttige bacteriën zoals *Bifidobacterium* en *Faecalibacterium* kan remmen, hoewel de invloed van deze zeep op de groei van de verschillende geteste stammen van beide geslachten varieert. Daarnaast werd aangetoond dat acetaatproducenten, zoals *Bifidobacterium* en *Bacteroides*, kunnen dienen als cross feeders bij het handhaven van *F. prausnitzii*, die voor groei sterk afhankelijk is van de beschikbaarheid van acetaat [15,16].

De vertraagde kolonisatie van de darm door nuttige microben, zoals *F. prausnitzii*, of afwijkende veranderingen in de darmmicrobiota die optreden in de kindertijd kunnen levenslange effecten hebben. Dit idee wordt onderstreept door het feit dat volwassenen die in hun kindertijd borstvoeding kregen een aparte groep vormen in een populatie cohort, uitsluitend op basis van de samenstelling van hun darmmicrobiota [17]. Bovendien kan de juiste bacteriële kolonisatie van de darm van een baby verregaande immunologische implicaties hebben. Dit effect op het immuunsysteem werd bevestigd door de correlaties gevonden in verschillende studies die flesvoeding koppelden aan een verhoogde kans op ziekten, zoals astma, coeliakie en allergieën [18,19]. Dergelijke pathologische effecten kunnen wellicht verzacht of voorkomen worden door verbeterde flesvoeding, bijvoorbeeld

Appendices

door de toevoeging van vetten die bij de spijsvertering in mindere mate tot calciumpalmitaatvorming leiden en door de toevoeging van HMO's aan de babyvoeding. Vanuit een ecologisch perspectief zou het belangrijk zijn om te begrijpen of de bacteriesoorten die verlaagd aanwezig bij fles-gevoede baby's, daadwerkelijk gevoelig zijn voor calciumzepen, of dat de afname van bepaalde bacterie-populaties wordt bepaald door interacties binnen de darmmicrobiota. Dit zou belangrijke informatie kunnen opleveren over de interbacteriële interacties die het bacteriële successieproces tijdens de vroege stadia in het leven van de mens bepalen.

Selenium is belangrijk voor *F. prausnitzii*

De samenstelling van het dieet van een individu is een van de belangrijkste factoren die de samenstelling van de darmmicrobiota bepalen [20–22]. Voor belangrijke voedingsstoffen zoals voedingsvezels, vlees of vetten zijn de effecten tamelijk duidelijk. Een toename van vezels in het dieet zal bijvoorbeeld worden vertaald in een verhoogde productie van korteketen vetzuren, terwijl een toename van de vetconsumptie het tegenovergestelde effect zal veroorzaken, wat op zijn beurt leidt tot een lagere bacteriële diversiteit in de darm [21]. Voor micronutriënten daarentegen zijn de effecten op de microbiota nog niet zo duidelijk vastgesteld. Een voorbeeld hiervan is selenium (Se), dat wordt erkend als een belangrijk voedingsbestanddeel voor onze gezondheid vanwege de ontstekingsremmende en antioxiderende effecten. Belangrijk is dat hogere Se-concentraties in het bloed in verband zijn gebracht met lagere sterftcijfers door kanker en hart- en vaatziekten [23]. Niettemin waren effecten van Se op darm-microbiota tot nu toe alleen bij dieren bestudeerd [24,25]. De studies gepresenteerd in **hoofdstuk 5** van dit proefschrift tonen aan dat lage Se-niveaus in het bloed van gezonde vrijwilligers gecorreleerd is met een verlaging van de bacteriële diversiteit in de darm. Een van de meest opvallende bevindingen was dat vrijwilligers met lage Se-bloedspiegels een lagere hoeveelheid *F. prausnitzii* bacteriën in hun feces hadden ten opzichte van vrijwilligers met normale of hoge Se-bloedspiegels. Dit idee werd geverifieerd in een vervolgstudie om te achterhalen of *F. prausnitzii* daadwerkelijk Se kan gebruiken om beter te groeien. De resultaten laten zien dat *F. prausnitzii* inderdaad beter kan groeien in aanwezigheid van Se in de vorm van natriumseleniet. Voor dit effect zijn twee verklaringen te geven. Ten eerste kan dit erop wijzen dat seleniet het vermogen van de bacteriën om oxidatieve stress te bestrijden verbeterd [26]. Ten tweede zou *F. prausnitzii* natriumseleniet kunnen gebruiken als terminale elektronenacceptor in een proces dat dissimilatoire metaalreductie wordt genoemd. Dit proces zou de bacteriën kunnen helpen om meer energie op te wekken en tegelijkertijd hun omgeving te reduceren [27,28]. Bovendien tonen de studies in hoofdstuk 5 aan dat het selenietreductiemechanisme geconserveerd is bij de verschillende onderzochte *Faecalibacterium*-stammen. Genoomanalyses lieten zien dat *F. prausnitzii* drie reductase genen heeft die mogelijk gebruikt kunnen worden voor selenietreductie. Voor toekomstige studies zal het van belang zijn om te testen of deze enzymen inderdaad een seleniet-reducerende activiteit hebben, bijvoorbeeld bij heterologe expressie in een andere gastheerbacterie. Bovendien zou deze informatie, samen met informatie verkregen uit bacteriële fermentaties met complexe populaties in de aanwezigheid van verschillende Se-concentraties, nieuwe inzichten kunnen verschaffen in de reacties van verschillende bacteriesoorten op Se-suppletie en hoe dit van invloed zou kunnen zijn op de darmmicrobiota als geheel. Het HoxBan-feces systeem zou het perfecte model zijn om dergelijke fermentaties uit te voeren en om te analyseren hoe Se de overleving van verschillende microben in de nabijheid van de Caco2-cellen beïnvloedt van waaruit zuurstof in het anaerobe compartiment diffundeert.

Overlevingsstrategieën van *F. prausnitzii*.

Het is tot op heden niet helemaal duidelijk hoe de anaerobe bacteriesoorten die onze darm koloniseren hun niche kunnen bereiken bij pasgeboren baby's. Voor sommige zuurstof-tolerante bacteriesoorten, zoals bifidobacteriën, is een verticale overdracht van moeder op kind plausibel [29]. De oorsprong van strikt anaerobe bacteriën, die de darm in latere stadia van de vroege kindertijd koloniseren, is echter onbekend. Tot nu toe is er geen bewijs dat deze bacteriën kunnen overleven buiten onze darm, zoals dat wel het geval is voor darmpathogenen als *Shigella* en *Salmonella* [30]. De belangrijkste factor buiten het lichaam zal ongetwijfeld de blootstelling aan zuurstof zijn, maar daarnaast moeten strikt anaerobe bacteriën buiten de menselijke darm nog andere mogelijke uitdagingen doorstaan, zoals daar zijn: (i) Bij ontlasting kunnen de bacteriën enige tijd in een batchcultuurachtige toestand doorbrengen mits uitdroging wordt voorkomen. Dit scenario kan worden nagebootst door een langdurige batchteelt gedurende meerdere dagen. (ii) De bacteriën kunnen te maken krijgen met een gebrek aan voedingsstoffen door verdunning van hun omgeving in een waterige omgeving of door diarree van de gastheer. Deze toestand kan nagebootst worden door kweken in voedingsarme media.

Dienovereenkomstig werden deze groeiomstandigheden getest in de studies beschreven in **Hoofdstuk 6**. De resultaten tonen aan dat het mogelijk is om een lange stationaire fase te bereiken, waarbij groei van de *F. prausnitzii*-stam A2-165 optreedt met dode cellen als voedselbron, zoals blijkt uit een toename van het aantal bacteriën die nog levensvatbaar waren na 5 dagen overleving in de kweekfles. Dit fenomeen is eerder beschreven voor *Escherichia coli* [31], maar voor *F. prausnitzii* is dit de allereerste beschrijving van een dergelijk proces. Deze observatie toont verder aan dat de bacteriën bestand zijn tegen hun secundaire metaboliëten en een lage zuurgraad na de eerste groeifase [32,33]. Deze strategie zou de bacteriën in staat kunnen stellen om relatief lange tijd buiten het menselijk lichaam te overleven [31].

De resultaten laten verder zien dat de *F. prausnitzii* stam HTF-F in staat is te overleven in een voedselarm medium door te groeien met een lage metabole activiteit. Een soortgelijk mechanisme is eerder beschreven voor *Bacillus subtilis* [34]. In de HTF-F stam blijkt deze toestand gekoppeld aan de vorming van bolletjes in de bacterie die niet door een membraan afgebakend zijn en dit proces lijkt de bacteriële overleving in een omgeving met een laag natriumgehalte mogelijk te maken. Dit effect bleek stam-specifiek en het lijkt geassocieerd te zijn met een ingewikkelde cytoplasmatische compartimentering. Aangezien de vorming van deze bolletjes in stam HTF-F afhankelijk was van de natriumconcentratie van het groeimedium, kan gespeculeerd worden dat *F. prausnitzii* mogelijkheid een natrium-gedreven energiemetabolisme bezit. Een dergelijke natrium-gedreven energieregeneratie is beschreven voor sommige ziekteverwekkers, zoals *Klebsiella pneumoniae* en *Neisseria gonorrhoeae* [35]. Alhoewel de genen voor een volledige natriumcyclus werden gevonden in beide onderzochte *F. prausnitzii*-stammen wacht de daadwerkelijke betrokkenheid van de gecodeerde eiwitten bij natrium-gemedieerde energieregeneratie nog op een experimentele bevestiging.

De bevindingen beschreven in **Hoofdstuk 6** werpen een nieuw licht op de overleving van *F. prausnitzii* in een omgeving die aanleiding geeft tot lange stationaire groeistadia, waardoor de bacteriën in een overlevingsstand kunnen komen en daadwerkelijk levensvatbaar blijven totdat kolonisatie van een volgende gastheer mogelijk is. Beide overlevingsmechanismen die in dit hoofdstuk worden beschreven kunnen echter ook voor de productie van *F. prausnitzii* als “next generation” probiotica toegepast worden. Toekomstige experimenten zouden zich in dit opzicht kunnen richten op de analyse van de gen-regulatie die ten grondslag ligt aan de verschillende overlevingsmechanismen en bovendien zouden ze tot doel moeten hebben het

Appendices

veronderstelde natrium-gestuurde metabolisme van *F. prausnitzii* nader te analyseren. De informatie die uit dergelijke studies verkregen wordt kan vervolgens toegepast worden voor de productie van probiotica. Ook zouden de resultaten ons begrip van de darm-kolonisatie door strikt anaerobe bacteriën verbeteren. Dit laatste is nog steeds een groot hiaat in ons begrip van de totstandkoming van de darmmicrobiota van de mens.

Concluderende opmerkingen

In het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift werd de strikt anaerobe en butyraat-producerende bacterie *F. prausnitzii* gebruikt als model voor anaerobe bacteriën met vergelijkbare metabole kenmerken. De reden hiervoor was dat *F. prausnitzii* één van de meest voorkomende bacteriën in de darm van gezonde mensen is, en dat deze bacterie bij zieke personen juist vaak verminderd aanwezig is [4]. Het onderzoek aan deze bacterie leverde meerdere nieuwe inzichten op over de ecologie van strikt anaerobe bacteriën in relatie tot de gastheer.

Hoofdstuk 2 illustreert hoe *F. prausnitzii* via de activatie van *IL18* de menselijke cellulaire reacties op ontstekingsstimuli kan moduleren.

In **Hoofdstuk 3** wordt een verbeterde toolbox beschreven om gastheer-bacterie interacties te analyseren via het nieuw ontwikkelde HoxBan-feces model.

Hoofdstukken 4 en 5 beschrijven hoe voeding de samenstelling van de darmmicrobiota van zuigelingen kan bepalen, hetzij door de vorming van zepen ten gevolge van flesvoeding, hetzij door een tekort aan micronutriënten zoals selenium. Beide condities zullen leiden tot een dysbiotische toestand die ziekte kan veroorzaken, ook op latere leeftijd. **Hoofdstuk 4** gaat verder in op synergistische effecten van het fenomeen cross-feeding, onder andere van *F. prausnitzii* met mogelijke acetaatproducenten, zoals bifidobacteriën en *Bacteroides* soorten. Met name deze interacties tussen bacteriën vormen de basis van complexe ecologische interacties in de darmmicrobiota.

Ten slotte worden in **Hoofdstuk 6** mogelijke overlevingsmechanismen beschreven, zoals inclusie-vorming en cryptische groei, die door darmbacteriën kunnen worden gebruikt om te overleven buiten de darm.

Het beschreven onderzoek heeft verschillende doorbraken in het *F. prausnitzii*-onderzoek opgeleverd, onder andere door twee nieuwe fysiologische eigenschappen te beschrijven. De eerste is het vermogen van deze bacterie om natriumseleniet te reduceren tot anorganisch selenium, hetgeen een belangrijke eigenschap lijkt te zijn die terug te vinden is bij verschillende *Faecalibacterium*-stammen. Het tweede kenmerk is de productie van inclusies, die de bacterie mogelijk kunnen helpen om te overleven onder nadelige omstandigheden, zoals gebleken is in het geval van de *F. prausnitzii*-stam HTF-F. Deze bevindingen onderstrepen ook de noodzaak om de menselijke darmmicrobiota en haar grote diversiteit aan bacteriestammen onder verschillende *in vitro* omstandigheden nader te bestuderen. Het blijkt namelijk dat er voor de bacteriën vele manieren zijn om chemische of fysieke stresssituaties te overleven en dat er een grote verscheidenheid is aan metabole en fysieke aanpassingen die we tot op heden nog niet kennen.

Ten slotte is het beschreven HoxBan-feces systeem een *in vitro* modelsysteem dat studies mogelijk maakt naar de interacties tussen menselijke cellen in een zuurstofrijke omgeving en bacteriën in een anaerobe omgeving. Dit systeem weerspiegelt de volledige complexiteit van de darmmicrobiota en kan daarom een completer beeld geven van de microbiële processen die bijdragen aan de gezondheid en ziekte van de menselijke gastheer. Bovendien brengt het HoxBan-feces systeem ons dichterbij studies over de complete holobiont: de mens als geheel inclusief zijn micro-organismen, waarbij *in vitro* de interacties van menselijke cellen en de microbiota van een individu kunnen worden nagebootst.

Appendices

Bibliografie

1. Runge, S.; Rosshart, S.P. The Mammalian Metaorganism: A Holistic View on How Microbes of All Kingdoms and Niches Shape Local and Systemic Immunity. *Frontiers in Immunology* **2021**, *12*, 2628, doi:10.3389/FIMMU.2021.702378/BIBTEX.
2. Yip, W.; Hughes, M.R.; Li, Y.; Cait, A.; Hirst, M.; Mohn, W.W.; McNagny, K.M. Butyrate Shapes Immune Cell Fate and Function in Allergic Asthma. *Frontiers in Immunology* **2021**, *12*, 628453, doi:10.3389/FIMMU.2021.628453.
3. Li, G.; Lin, J.; Zhang, C.; Gao, H.; Lu, H.; Gao, X.; Zhu, R.; Li, Z.; Li, M.; Liu, Z. Microbiota Metabolite Butyrate Constrains Neutrophil Functions and Ameliorates Mucosal Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gut Microbes* **2021**, *13*, doi:10.1080/19490976.2021.1968257.
4. Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L.; Lakhdari, O.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Gratadoux, J.J.; Blugeon, S.; Bridonneau, C.; Furet, J.P.; Corthier, G.; et al. *Faecalibacterium prausnitzii* Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 16731–16736, doi:10.1073/PNAS.0804812105.
5. Sadabad, M.S.; von Martels, J.Z.H.; Khan, M.T.; Blokzijl, T.; Paglia, G.; Dijkstra, G.; Harmsen, H.J.M.; Faber, K.N. A Simple Coculture System Shows Mutualism between Anaerobic *Faecalibacteria* and Epithelial Caco-2 Cells. *Scientific Reports* **2015**, *5*, doi:10.1038/srep17906.
6. Levy, M.; Thaïss, C.A.; Zeevi, D.; Dohnalová, L.; Zilberman-Schapira, G.; Mahdi, J.A.; David, E.; Savidor, A.; Korem, T.; Herzig, Y.; et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **2015**, *163*, 1428–1443, doi:10.1016/J.CELL.2015.10.048.
7. Singh, N.; Gurav, A.; Sivaprakasam, S.; Brady, E.; Padia, R.; Shi, H.; Thangaraju, M.; Prasad, P.D.; Manicassamy, S.; Munn, D.H.; et al. Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis. *Immunity* **2014**, *40*, 128–139, doi:10.1016/J.IMMUNI.2013.12.007.
8. Novick, D.; Kim, S.; Kaplanski, G.; Dinarello, C.A. Interleukin-18, More than a Th1 Cytokine. *Seminars in Immunology* **2013**, *25*, 439–448, doi:10.1016/J.SMIM.2013.10.014.
9. Kelly, C.J.; Zheng, L.; Campbell, E.L.; Saedi, B.; Scholz, C.C.; Bayless, A.J.; Wilson, K.E.; Glover, L.E.; Kominsky, D.J.; Magnuson, A.; et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host & Microbe* **2015**, *17*, 662–671, doi:10.1016/J.CHOM.2015.03.005.
10. Konopka, A. What Is Microbial Community Ecology? *The ISME Journal 2009 3:11* **2009**, *3*, 1223–1230, doi:10.1038/ismej.2009.88.
11. Derrien, M.; Alvarez, A.S.; de Vos, W.M. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* **2019**, *27*, 997–1010, doi:10.1016/J.TIM.2019.08.001.
12. Harmsen, H.J.M.; Wildeboer-Veloo, A.C.M.; Raangs, G.C.; Wagendorp, A.A.; Klijn, N.; Bindels, J.G.; Welling, G.W. Analysis of Intestinal Flora Development in Breast-Fed and Formula-Fed Infants by Using Molecular Identification and Detection Methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2000**, *30*, 61–67, doi:10.1097/00005176-200001000-00019.
13. Sekerel, B.E.; Bingol, G.; Cokugras, F.C.; Cokugras, H.; Kansu, A.; Ozen, H.; Tamay, Z. An Expert Panel Statement on the Beneficial Effects of Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in Early Life and Potential Utility of HMO-Supplemented Infant Formula in Cow's Milk Protein Allergy. *Journal of Asthma and Allergy* **2021**, *14*, 1147, doi:10.2147/JAA.S323734.
14. Ahern, G.J.; Hennessy, A.A.; Anthony Ryan, C.; Paul Ross, R.; Stanton, C. Advances in Infant Formula Science. **2019**, *10*, 75–102, doi:10.1146/ANNUREV-FOOD-081318-104308.

15. Rios-Covian, D.; Gueimonde, M.; Duncan, S.H.; Flint, H.J.; de Los Reyes-Gavilan, C.G. Enhanced Butyrate Formation by Cross-Feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium Adolescentis*. *FEMS Microbiology Letters* **2015**, *362*, 176, doi:10.1093/FEMSLE/FNV176.
16. Wrzosek, L.; Miquel, S.; Noordine, M.L.; Bouet, S.; Chevalier-Curt, M.J.; Robert, V.; Philippe, C.; Bridonneau, C.; Cherbuy, C.; Robbe-Masselot, C.; et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* Influence the Production of Mucus Glycans and the Development of Goblet Cells in the Colonic Epithelium of a Gnotobiotic Model Rodent. *BMC Biology* **2013**, *11*, 1–13, doi:10.1186/1741-7007-11-61/FIGURES/6.
17. Ding, T.; Schloss, P.D. Dynamics and Associations of Microbial Community Types across the Human Body. *Nature* **2014**, *509*, 357–360, doi:10.1038/nature13178.
18. Munblit, D.; Verhasselt, V. Allergy Prevention by Breastfeeding: Possible Mechanisms and Evidence from Human Cohorts. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **2016**, *16*, 427–433, doi:10.1097/ACI.0000000000000303.
19. Vieira Borba, V.; Sharif, K.; Shoenfeld, Y. Breastfeeding and Autoimmunity: Programming Health from the Beginning. *American Journal of Reproductive Immunology* **2018**, *79*, e12778, doi:10.1111/AJL.12778.
20. Weng, Y.J.; Gan, H.Y.; Li, X.; Huang, Y.; Li, Z.C.; Deng, H.M.; Chen, S.Z.; Zhou, Y.; Wang, L.S.; Han, Y.P.; et al. Correlation of Diet, Microbiota and Metabolite Networks in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Digestive Diseases* **2019**, *20*, 447–459, doi:10.1111/1751-2980.12795.
21. Wilson, A.S.; Koller, K.R.; Ramaboli, M.C.; Nesengani, L.T.; Ocvirk, S.; Chen, C.; Flanagan, C.A.; Sapp, F.R.; Merritt, Z.T.; Bhatti, F.; et al. Diet and the Human Gut Microbiome: An International Review. *Digestive Diseases and Sciences* **2020**, *65*, 723–740, doi:10.1007/S10620-020-06112-W/FIGURES/2.
22. Leshem, A.; Segal, E.; Elinav, E. The Gut Microbiome and Individual-Specific Responses to Diet. *mSystems* **2020**, *5*, doi:10.1128/MSYSTEMS.00665-20/ASSET/6F3E164E-6F6B-4385-9797-C2D5EC1B77BC.
23. Ferreira, R.L.U.; Sena-Evangelista, K.C.M.; de Azevedo, E.P.; Pinheiro, F.I.; Cobucci, R.N.; Pedrosa, L.F.C. Selenium in Human Health and Gut Microflora: Bioavailability of Selenocompounds and Relationship With Diseases. *Frontiers in Nutrition* **2021**, *8*, 292, doi:10.3389/FNUT.2021.685317/BIBTEX.
24. Kasaikina, M. v.; Kravtsova, M.A.; Lee, B.C.; Seravalli, J.; Peterson, D.A.; Walter, J.; Legge, R.; Benson, A.K.; Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. Dietary Selenium Affects Host Selenoproteome Expression by Influencing the Gut Microbiota. *The FASEB Journal* **2011**, *25*, 2492–2499, doi:10.1096/fj.11-181990.
25. Gangadoo, S.; Dinev, I.; Chapman, J.; Hughes, R.J.; Van, T.T.H.; Moore, R.J.; Stanley, D. Selenium Nanoparticles in Poultry Feed Modify Gut Microbiota and Increase Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2018**, *102*, 1455–1466, doi:10.1007/s00253-017-8688-4.
26. Stock, T.; Rother, M. Selenoproteins in Archaea and Gram-Positive Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2009**, *1790*, 1520–1532, doi:10.1016/J.BBAGEN.2009.03.022.
27. Richter, K.; Schicklberger, M.; Gescher, J. Dissimilatory Reduction of Extracellular Electron Acceptors in Anaerobic Respiration. *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, *78*, 913–921, doi:10.1128/AEM.06803-11/ASSET/70B59504-940C-4DDA-9EEA-5C35FD68AB11.
28. Stolz, J.F.; Oremland, R.S. Bacterial Respiration of Arsenic and Selenium. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, *23*, 615–627, doi:10.1111/J.1574-6976.1999.TB00416.X.

Appendices

29. Kumar, H.; Collado, M.C.; Wopereis, H.; Salminen, S.; Knol, J.; Roeselers, G. The Bifidogenic Effect Revisited—Ecology and Health Perspectives of Bifidobacterial Colonization in Early Life. *Microorganisms* **2020**, *Vol. 8, Page 1855* **2020**, *8*, 1855, doi:10.3390/MICROORGANISMS8121855.
30. Moran, N.A.; Plague, G.R. Genomic Changes Following Host Restriction in Bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development* **2004**, *14*, 627–633, doi:10.1016/J.GDE.2004.09.003.
31. Navarro Llorens, J.M.; Tormo, A.; Martínez-García, E. Stationary Phase in Gram-Negative Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **2010**, *34*, 476–495, doi:10.1111/J.1574-6976.2010.00213.X.
32. Duncan, S.H.; Hold, G.L.; Harmsen, H.J.M.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. Growth Requirements and Fermentation Products of *Fusobacterium Prausnitzii*, and a Proposal to Reclassify It as *Faecalibacterium Prausnitzii* Gen. Nov., Comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2002**, *52*, 2141–2146, doi:https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2141.
33. Postgate, J.R.; Hunter, J.R. The Survival of Starved Bacteria. *J Gen Microbiol* **1962**, *29*, 233–263, doi:10.1099/00221287-29-2-233.
34. Gray, D.A.; Dugar, G.; Gamba, P.; Strahl, H.; Jonker, M.J.; Hamoen, L.W. Extreme Slow Growth as Alternative Strategy to Survive Deep Starvation in Bacteria. *Nature Communications* **2019** *10:1* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41467-019-08719-8.
35. Häse, C.C.; Fedorova, N.D.; Galperin, M.Y.; Dibrov, P.A. Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens: Evidence from Cross-Genome Comparisons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2001**, *65*, 353–370, doi:10.1128/MMBR.65.3.353-370.2001/FORMAT/EPUB.

About the author

Gabriela Bravo Ruiseco Sanchez was born and raised in Tlahuac, Mexico City.



Always interested in biological sciences, studied a bachelor's degree in Bio-pharmaceutical chemistry at the Universidad Autonoma Metropolitana unidad Xochimilco. Since then she was interested in probiotics and beneficial bacteria therefore followed a research internship under the supervision of Dr. Rina Gonzalez Cervantes studying *Bifidobacterium* species.

After working for some years in the pharmaceutical industry and the administrative part of academia, she resumed her career in science.

During her master's degree in Experimental Biology at the Universidad Autonoma Metropolitana unidad Iztapalapa, she specialized in how the gut microbiota changes with the progression of Alzheimer's disease. Under the supervision of Dr. Gustavo Pacheco Lopez and Dr Hugo Ramirez Saad.

Later she moved to The Netherlands where joined the functional microbiome group (FUNMIC) at the University Medical Center Groningen to pursue her PhD under the supervision of Dr. Hermie Harmsen. During her studies, she tried to better understand the strict anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* and the interaction of anaerobic bacteria with the human host. Her research resulted in this thesis.

Appendices

Acknowledgements

I started all this journey afraid....

I move to a different country and I wondered. How would the people be? And I found an extended family from all around the world.

I started a position in a top research institute, and I wondered. Would the competence be relentless? And I found a supportive supervising team and colleagues always willing to help.

Then I became a mother and I wondered. Would I be able to balance motherhood and work? And I was not, but my son has an always-carrying father there for him when mom is not enough.

Therefore I am not afraid anymore, I am just deeply grateful for all the good things that happened to me in Groningen

I will like to thank all the people who supported me throughout this journey.

First of all, to Hermie Harmsen, who believed in me and has been an incredibly supportive supervisor and a like-minded scientific soul, we had perhaps too much fun, but I enjoyed every bit of it and learned a lot. Thank you!

My deepest gratitude to my supervising team: Jan Maarten van Dijl, Klaas Nico Faber and Girbe Buist. Thank you for all your patience and guidance. I always found your doors open and you all run the extra mile to give me a bit of your knowledge not only about research but also about life. Jan Maarten, thank you for all your attempts to keep me focused on one topic at a time. I will work hard to have your stamina, and get the work done. Klaas Nico, I always enjoyed our meetings, your positive energy and assertiveness when analyzing data are something I would like to develop. Girbe, I admire the way you feel about science and teaching, your enthusiasm for any research topic always came together with a waterfall of possibilities that leave me numb, sometimes for days. From all of you, I take a bit that will like to culture in myself to become a better person.

I will like to make a special mention to my mentors in the research group MOLBAC/FUNMIC, who without expecting anything back, guided me through the lab and help me to settle in Groningen. Dear Carin, Mehdi and Paco I am forever in debt to your kindness.

In the lab as in life, little can be done alone. Therefore I will like to thank my collaborators from the HDL lab Ali, Rapha, Tjaso, Diane and Daniela. Thank you for all the nice work and chats. I enjoyed so much to work on all the HoxBan projects together with you.

In the same way, I have a lot to thank to the people at the UMCG Microscopy and Imaging center, where the team was always warm, and Jeroen Kuipers guided me through the electron microscopy techniques while Ben Giepmans helped me to see my research from a different perspective. Thank you for all the humour and nice hours behind the microscope.

I will like to thank as well to all the members of the MOLBAC group, especially Sjouke and Jolanda for your guidance. I enjoyed sharing your achievements at the meetings and loved singing at the lab with some of you. I will not mention you one by one but, hope to see you in the eyes soon and I hope we can remember all the nice moments together.

I loved our overfeeders nights I think the most epic ones were at Xin's and Marco's place. Thank you guys for all the fun together, the food and the poker.

As for the medical microbiology lab, which was the headquarters of my research. It was a pleasure to work together with Peter, and Guido. You were always ready to help and you made my time at the lab enjoyable with your chats and nice music.

Since I am a lab person, I feel the lab deeply and will miss you all.

To my friends and colleagues from the FUNMIC group, thank you for all the work, all the fun and the endless hours of laughter. For sure Jan Maarten would remember that loud laughs on Friday afternoons. I think we had the best office of all, everyone cared for each other and despite our differences, we were able to build up a friendship. Lu, you and I spend some time alone at the office and feel you deep into my heart, love to cook and eat with you as much as I enjoy working together. Paula, we couldn't be more different, but I love your strength, determination and black humor as much as I love your quiche. Rita, is very easy to talk to you, thank you for listening and being there with the right words. Eleni thank you for guiding me through the lab and the collaborations with Winlove, as well as for the parenting tips and all the nice chats. Lisa, your support at the lab was very much needed. To the newest members Arezo, Ivone and Pablo, was great to meet and work with you, I hope you succeed in your quest for the PhD.

I will also like to thank my students, I learned so much from you!! Thank you for all the laughs and I am sorry for the pranks (No sorry). I enjoyed working with all of you, each one help me to bend and push my research topics and my own way to perceive the world. I keep the deepness of Ben, the openness of Quincy, the motivation of Simon, the mindfulness of Juliet, the sass from Kim, the resilience of Sonia, the precision of Niels and the scientific commitment from Antonia. I wish you all the best in your life.

Outside of work, I found an extra family who surrounded me with love and wonderful food.

First of all Opa Douwe, thank you for your constant care and love for my family without your help, this journey would have been quite different. You guided us as newcomers to the Dutch ways and introduced us to beautiful scenarios in the polder. It was my luckiest day when I booked that Airbnb at the City Oasis.

Tía Marcela, muchas gracias por tu cariño y tu ayuda. No puedo agradecerte lo suficiente todos los momentos que has estado ahí para nosotros así como todo el amor que le das a Román.

Mis muy queridos amigos mexicanos, platicar con ustedes me hace sentir en casa, no se diga las comilonas que han sido el centro de nuestras reuniones. Con ustedes extraño menos y vivo más.

Paco y Alicia, muchas gracias por abrimos la puerta de su hogar y ser tan sinceros siempre, gracias por la comidas e innumerables fiestas.

Mawi y David colarnos a la apertura de Cielito fue una bendición, nos encontramos con un par de personas de corazón alegre y sincero que están siempre que se les necesita, tanto para la fiesta cómo para ayudar jalan parejo.

Liz y Chuy, gracias por su cariño y por estar siempre al pendiente de cómo estamos. Junto con Iris y Venus nuestros viajes con Wire eran geniales. Gracias por su ayuda y por sus tips sobre crianza.

Appendices

Lucia y Erik que genial ha sido coincidir en esta vida nómada, ojalá tengamos la oportunidad de convivir nuevamente, gracias por compartir su felicidad y amor por la vida.

Querida Pamela, ha sido un placer trabajar contigo y me encanta también echar el chal, gracias por escucharme y por tu apoyo.

Encontrar a Rocío y a Yare en el lab fue un regalo del destino, gracias a ustedes nunca faltaron los cafés y el buen chisme. Gracias por su amistad sincera y todo el cariño.

To my paranympths who have suffered my baby brain and would help me throughout all this finishing process, thank you so much.

Niels, we have known each other for quite some time now, It has been really nice to see you grow as a scientist and I am happy to say that you have all the tools to achieve your goals. I have nagged you so much with my chats, sorry for that. In the darkest moments, you kept me straight when I was becoming a bitter person. Thank you for using the Dutch directness with me and sharing your nice sense of humor. Will miss our chats a lot.

Dear Lei, thank you for all our chats and for your friendship. Culturally Chinese and Mexicans are closer than they may look. With you, I have always felt so comfortable chatting, so much, that we can spend hours complaining about nothing. I love your humor and sass. I admire your hard work and kindness when teaching.

Querida Charo, aunque nos conocemos de poco, hicimos click de inmediato. Tienes un gran corazón y eres una de las personas más brillantes que conozco. Muchas gracias por apoyarme con esta tarea y compartir chismes y comida rica con migo. Espero que pronto tengamos chance de cocinar juntas y te pueda enseñar a preparar la sopa que tanto te gusta. Spoiler alert... cuándo tú la prepares nunca sabe igual.

Estar a la distancia de la familia ha resultado un tanto difícil, pero la tecnología facilita las cosas un poco. Sin importar cuán lejos este siempre me he sentido cobijada por el amor de mi familia. Muchas gracias Caro y Jany por los chismes y por su cariño a mi mamá. No tengo como pagarles el verla contenta y me siento tranquila sabiendo que se tienen para quererse y pelear. Cristi, siempre has estado ahí para mí cuando he necesitado consejo y apoyo, muchas gracias por tu cariño incondicional. Pablo, nuestra relación es la misma aquí o allá, no paramos de pelear y compartir memes, aunque extraño abrazarte, se que siempre andas por ahí cerca para decirme mis verdades y compartir curiosidades. Muchas gracias por escucharme y decirme lo que piensas sin pelos en la lengua. Mami, no tengo como agradecerle tanto en esta vida, ahora que me he convertido en madre entiendo tantas cosas, mi cariño por ti nunca va a llegar a ser tan grande como el tuyo por mí, así que dejo el tema zanjado para siempre. Si, tú me quieres más. Hablar contigo tiene un poder mágico, me ayuda a poner mis ideas en orden y calmarme para poder tomar decisiones, esto también es cierto para temas científicos. Me encanta también tu nueva etapa académica, porque ahora nos podemos quejar juntas de que relajó es escribir la tesis y del coraje que da leer al autor que no te gusta. Muchas gracias por ser mi compañera y por estar siempre ahí para mí. Gracias a ustedes nunca me he sentido sola, inclusive a la distancia.

He tenido un compañero de viaje que ha estado ahí para mí a cada paso del camino, su apoyo ha sido total y me ha ayudado a crecer. Muchas gracias Oliver por convertirte en padre conmigo

Aknowledgements

y por ayudarme a lograr mis metas. Estoy segura de que juntos haremos de ese muchacho nuestro más grande logro.

Román, desde que llegaste te has convertido en el motor de mi existencia. Espero que encuentres tu lugar en este mundo maravilloso, así como yo lo encontré. Mi más grande deseo para ti es que puedas seguir tus sueños, no tengas miedo de a dónde te puedan llevar. Te amo por siempre y sin importar nada.

I think the saying my mom tells me often holds true, “You will always find what you are looking for, just wait and open your eyes” so, I will keep my eyes open for the next nice things to come.