



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

The role of the intestinal microbiota in pneumonia and sepsis

Lankelma, J.M.

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Lankelma, J. M. (2017). The role of the intestinal microbiota in pneumonia and sepsis

General rights

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

Disclaimer/Complaints regulations

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

14. Addendum

Nederlandse samenvatting

Inleiding

De darmflora wordt vaak gezien als iets vies en onwenselijks; ook wetenschappers en de meeste dokters hebben er tot voor kort weinig aandacht aan besteed. De laatste jaren is dat echter veranderd: er zijn nieuwe technieken ontwikkeld, waardoor opeens veel meer bacteriën kunnen worden gevonden. Kweken, de klassieke onderzoeksmethode, werkt namelijk helemaal niet voor de meeste bacteriën, onder andere doordat deze niet tegen zuurstof kunnen. Door de nieuwe technieken is dus een hele nieuwe wereld opengedaan. Niet alleen in de darmen, maar ook op de huid, in de luchtwegen en urinewegen zitten hele ecosystemen van micro-organismen (bacteriën, virussen en schimmels) die samen de **microbiota** worden genoemd. Een verrassende ontdekking was dat mensen in feite bestaan uit evenveel bacterie-cellen als mens-cellen. Het aantal bacterie-genen in een mens is zelfs groter als het aantal menselijke genen.

Mensen zijn in hun hele ontstaansgeschiedenis samen met al deze micro-organismen ontwikkeld (geëvolueerd). Dat is niet toevallig gebeurd: wij hebben deze bacteriën nodig voor bijvoorbeeld het omzetten van voedingsstoffen in onze voeding en de productie van vitamines. Het vermoeden bestaat nu dat darmbacteriën nog veel meer goede dingen voor ons doen. Een recent onderzoek heeft laten zien dat een ernstige darminfectie met de bacterie *Clostridium difficile* heel effectief behandeld kan worden door de patiënt een gezonde darmflora terug te geven door een poep- of **fecestransplantatie**. De “gezonde” bacteriën bestrijden dan de infectie in de darm. Een al langer bestaand idee is de “hygiënehypothese”. Deze stelt dat de toename aan allergieën, eczeem en astma te maken heeft met het feit dat mensen veel schoner zijn gaan leven.

In dit proefschrift hebben wij onderzoek naar gedaan naar een idee dat daar een beetje op lijkt. Door experimenten met muizen is het idee ontstaan dat de darmflora in zijn normale, gezonde toestand het aangeboren afweersysteem een beetje prikkelt of “scherp houdt”. Het aangeboren afweersysteem speelt een belangrijke rol in de eerste fase van een ontsteking door bacteriën. Patiënten in het ziekenhuis, vooral degenen op de **Intensive Care (IC)**, krijgen veel **antibiotica** en andere therapieën die de darmflora kunnen aantasten (denk aan bestraling, chemotherapie en sondevoeding). Als het stimulerende effect van de darmflora op het afweersysteem daardoor wegvalt, zou dat dus kunnen betekenen dat de patiënten vatbaarder worden voor infecties.

Longontsteking (**pneumonie**) is één van de meest voorkomende infectieziekten en bovendien de op twee na belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd. Vaak wordt longontsteking veroorzaakt door de bacterie *Streptococcus pneumoniae*, ook wel bekend als de pneumococ. Als het afweersysteem het niet wint van de bacteriën in de long, kan de infectie zich door het hele lichaam verspreiden. Vaak ontstaat dan een ziektebeeld dat we **sepsis** noemen, wat onder andere koorts, een snelle hartslag en snelle ademhaling

inhoudt. Men denkt dat dit ziektebeeld wordt veroorzaakt door een ontregeling van het afweersysteem. Patiënten met dit ziektebeeld komen vaak op de IC terecht en worden met veel antibiotica behandeld.

Tot slot wordt in dit proefschrift ook onderzoek naar de ziekte **melioïdose** gepresenteerd. Deze ziekte wordt veroorzaakt door de bacterie *Burkholderia pseudomallei* en komt vooral voor in Zuid-oost Azië en Australië. Ook hierbij krijgen mensen vaak longontsteking en sepsis. 10 tot 40% van de patiënten overlijdt hieraan. Bovendien is de bacterie voor maar weinig antibiotica gevoelig en er is geen vaccin beschikbaar. Mede daardoor staat de bacterie op een lijst met mogelijke bioterroristische wapens.

Het doel van dit proefschrift was om te onderzoeken of darmflora-verstoring door antibiotica een effect heeft op het aangeboren afweersysteem, vooral tijdens longontsteking en sepsis. Onze hypothese was dat het aangeboren afweersysteem minder goed zou reageren na darmflora-verstoring door antibiotica. Zowel in muizen als in mensen hebben we geprobeerd te onderzoeken of deze stelling klopt.

Resultaten

Het eerste deel van dit proefschrift bestaat uit de studies die we met gezonde vrijwilligers hebben gedaan. In de eerste studie (**hoofdstuk 3**) onderzochten we of darmflora-aantasting door antibiotica een effect heeft op het aangeboren afweersysteem. De gezonde vrijwilligers slikten gedurende zeven dagen een brede antibioticakuur tegen allerlei soorten bacteriën, zoals ook patiënten op de Intensive Care antibiotica krijgen. Daarvóór, één dag na en zes weken na de kuur namen we bloed af, waarmee we vervolgens in het laboratorium het afweersysteem op allerlei manieren testten. De meeste afweerfuncties veranderden niet na de kuur (bijvoorbeeld: bacteriën werden nog even goed opgeruimd (gefagocyteerd)). Wat we wel zagen, was dat bepaalde cellen in het bloed minder sterk reageerden op lipopolysaccharide (**LPS**). LPS is een onderdeelje van de wand van sommige bacteriën en is een belangrijk signaal voor het menselijke afweersysteem. Zes weken na de kuur was de reactie weer hersteld, wat samenviel met het herstel van de darmflora.

In het lichaam kunnen cellen heel anders werken dan in een testsituatie op het lab, bijvoorbeeld omdat ze in het lichaam een interactie hebben met andere soorten cellen. Daarom testten we in de tweede studie (**hoofdstuk 4**) of onze bevindingen ook in het lichaam van gezonde vrijwilligers klopten. Door een heel klein beetje LPS in de bloedbaan te injecteren, reageert het immuunsysteem gedurende een paar uur alsof er een bacterie aanwezig is (**endotoxemie**). De vrijwilligers krijgen kortdurend koorts en koude rillingen, en in het bloed kunnen allerlei stofjes worden gemeten die aangeven hoe het afweersysteem reageert. Alles wat we onderzochten was echter gelijk tussen controle proefpersonen en degenen die zeven dagen antibiotica hadden geslikt van tevoren. Het zou dus goed kunnen dat bijvoorbeeld andere celtypes in het lichaam compenseren voor de cellen die in de eerste studie slechter op LPS reageerden na de antibioticakuur.

Het is lastig om in IC-patiënten te onderzoeken wat het effect van de darmflora is op het afweersysteem, omdat zij allerlei soorten medicijnen krijgen en vaak aan verschillende (combinaties van) ziektes lijden. Er is echter überhaupt heel weinig bekend over de toestand van de darmflora van IC-patiënten. Daarom hebben we in **hoofdstuk 6** met behulp van bacterie-DNA technieken (**sequencing**) gekeken naar de darmflora-samenstelling van 34 IC-patiënten in het AMC. We zagen zeer grote verschillen met gezonde personen en ook tussen IC-patiënten onderling. Veel nuttige bacteriën waren verdwenen en daarvoor in de plaats waren vaak één of een paar overheersende bacteriën verschenen. Je zou dit kunnen vergelijken met een omgeploegde akker, waar de plantjes die het sterkst zijn het meest zullen gaan groeien.

In **hoofdstuk 5** hebben we gekeken naar de korte- en lange-termijn effecten op de darmflora van de antibioticakuur die we in de eerste en tweede studie hadden gegeven. Hoewel de darmflora sterk verstoord was (gemeten op één dag na de kuur), leek de darmflora na zes weken al behoorlijk hersteld.

Het tweede deel van dit proefschrift bestaat uit muizenstudies. Omdat mensen allemaal anders zijn, is dit de enige manier om op een betrouwbare, gecontroleerde manier de afweer tegen longontsteking en sepsis te onderzoeken. We gaven een deel van de muizen een brede antibioticakuur in hun drinkwater, alvorens ze een longontsteking te geven. Zo konden we onderzoeken of darmflora-aantasting door antibiotica invloed heeft op het beloop van de longontsteking. In **hoofdstuk 7** laten we zien dat muizen die antibiotica hebben gehad zieker zijn dan controlemuizen als zij een longontsteking met pneumococci hebben. Dat leek te komen doordat bepaalde cellen in de longen (**alveolaire macrofagen**) minder effectief de bacteriën opruimden (**fagocyteerden**). Als de darmflora van de antibiotisch behandelde muizen hersteld werd met behulp van keutels van controle muizen, deden ze het weer bijna even goed als de controle muizen.

In **hoofdstuk 8** gebruikten we vervolgens een model waarin geen bacterie, maar bacterieel LPS wordt gebruikt om ontsteking in de longen op te wekken. In tegenstelling tot een longontsteking met sepsis, wordt hiermee maar één “pathway” binnen het immuunsysteem onderzocht. Van LPS is namelijk precies bekend hoe het de immunrespons opwekt (namelijk via Toll like receptor-4). Ook in dit model zagen we dat antibiotisch behandelde muizen iets anders reageerden dan controle muizen.

Tot slot gebruikten we in **hoofdstuk 9** de bacterie *Burkholderia pseudomallei*, de verwekker van melioidose. Dit is een heel ander soort bacterie dan de pneumococci, dus hiermee konden we goed onderzoeken of het effect van darmflora-aantasting ook in een iets andere setting aanwezig was. Ook in het melioidose-model vonden we dat antibiotisch voorbehandelde muizen het slechter deden dan controlemuizen. Dit was vooral op de korte termijn (binnen 24 uur); na drie dagen was er geen verschil meer tussen de controle- en antibiotisch behandelde muizen. Ook zagen we weer dat alveolaire macrofagen in de longen de bacteriën minder goed fagocyteerden.

Ook in **hoofdstuk 10** onderzochten we muizen met melioidose. Hier bleken muizen die een bepaalde receptor missen (Toll like receptor-5) anders op de ziekte te reageren dan controle muizen. Recent onderzoek heeft echter laten zien dat muizen een andere darmflora hebben als ze van een ander bedrijf worden gekocht (wat hier het geval was). En aangezien we vermoedden dat de darmflora een effect heeft op de afweer, zou dat dus de verschillen tussen de groepen kunnen verklaren. Daarom gaven we vervolgens de beide groepen antibiotica van te voren, om hun darmflora's min of meer gelijk te maken, en inderdaad: de verschillen verdwenen. Het effect dat we zagen in de muizen zonder Toll-like receptor 5 kwam dus waarschijnlijk niet doordat de muizen dit eiwit misten, maar doordat ze een andere darmflora hadden.

Het **laatste hoofdstuk** gaat niet over de darmflora, maar over het ontwikkelen van een vaccin voor melioidose. De bacterie, *B. pseudomallei*, kan mogelijk gebruikt worden voor bioterrorisme, omdat hij voor weinig antibiotica gevoelig is, mensen er erg ziek van worden en vaak doodgaan, en de bacterie makkelijk via de lucht verspreid kan worden. In dit hoofdstuk laten wij zien dat een DNA vaccin tegen een eiwit van *B. pseudomallei* mogelijk een goede kandidaat is om verder te testen. DNA vaccins zijn een relatief nieuwe techniek, waarbij niet het bacterie-eiwit wordt toegediend, maar een stukje DNA dat codeert voor dat eiwit. Daardoor maken sommige menselijke cellen dus het bacterie-eiwit en kan het lichaam afweer daartegen opbouwen. Bijzonder was dat vaccinatie via de neus veel beter werkte dan via de huid, mogelijk doordat de bacteriën vervolgens ook via de neus binnenkomen.

Conclusie en discussie

Alles samenvattend lijkt het er dus op dat darmflora-aantasting door antibiotica inderdaad een effect heeft op het aangeboren afweersysteem. Zoals bij ieder wetenschappelijk onderzoek zijn er een aantal zaken die men in het achterhoofd moet houden bij het interpreteren van de resultaten. Strikt genomen hebben we geen oorzakelijk verband aangetoond, alleen een associatie. Het effect omdraaien door het teruggeven van gezonde darmflora (feces-transplantatie) aan antibiotisch behandelde individuen, zoals we in de muizen hebben gedaan, zou een eerste stap hierin zijn. Iets anders wat een rol zou kunnen spelen, is een direct effect van de antibiotica op de afweercellen. Dat is niet heel waarschijnlijk, maar kunnen we niet uitsluiten. Verder zijn ook de luchtwegen niet vrij van bacteriën. Deze luchtweg-flora zou ook nog een rol kunnen spelen, als de antibiotica hier ook effect op zouden hebben. Dit is echter moeilijk te onderzoeken, omdat de hoeveelheid bacteriën in de luchtwegen erg laag is. Tot slot kunnen ook virussen en schimmels een belangrijke rol spelen in de darmflora, als bacteriën door antibiotica worden uitgeroeid. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen in hoeverre onze bevindingen belangrijk zijn voor (Intensive Care-) patiënten. Het onderzoek naar de darmflora staat nog in de kinderschoenen, maar de eerste successen zijn al geboekt met feces-transplantatie voor ernstige *Clostridium difficile* infectie. Het ultieme doel zou zijn om een aantal "goede" bacteriën te vinden die verantwoordelijk zijn voor de positieve effecten en die vervolgens in een pilletje aan patiënten met bijvoorbeeld longontsteking en sepsis te kunnen geven.

List of contributors

Academic Medical Center, Amsterdam

Center for Experimental and Molecular Medicine

R. de Beer	E. Birnie	D. de Boer
D.R. Cranendonk	J. Ersoz	B. W. Haak
A.J. Hoogendijk	J. W. Hovius	H.K. de Jong
G.C. Koh	M.H.P. van Lieshout	T. van der Poll
T.J. Schuijt	B.P. Scicluna	F. de Sousa e Melo
J.J.A. Trentelman	A.F. de Vos	L.A. van Vught
A. Wagemakers	T.A.F. Weehuizen	W.J. Wiersinga

Department of Pathology

J.J.T.H. Roelofs

Laboratory of Genetic Metabolic Diseases

R.H.L. Houtkooper

Department of Intensive Care

M. J. Schultz

Department of Internal Medicine

M. Nieuwdorp A. D. Bins

VU University Medical Center, Amsterdam

Department of Medical Microbiology and Infection Control

A.E. Budding

Wageningen University, Wageningen

Laboratory of Microbiology

C. Belzer W.M. de Vos

List of publications

Rapid DNA vaccination against *Burkholderia pseudomallei* flagellin by tattoo or intranasal application. **Lankelma JM***, Wagemakers A*, Birnie E, Haak BW, Trentelman JJA, Weehuizen TAF, Ersöz J, Roelofs JJTH, Hovius JW‡, Wiersinga WJ‡, Bins AD‡. *Virulence*, 2017 (Accepted)

Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study. **Lankelma JM**, van Vught LA, Belzer C, Schultz MJ, van der Poll T, de Vos WM, Wiersinga WJ. *Intensive Care Med*. 2017 Jan;43(1):59-68.

Therapeutic Administration of a Monoclonal Anti-IL-1 β Antibody Protects Against Experimental Melioidosis. Weehuizen TA, **Lankelma JM**, De Jong HK, De Boer OJ, Roelofs JJ, Day NP, Gram H, De Vos AF, Wiersinga WJ. *Shock*. 2016 Nov;46(5):566-574.

Antibiotic-Induced Gut Microbiota Disruption Decreases TNF- α Release by Mononuclear Cells in Healthy Adults. **Lankelma JM**, Belzer C, Hoogendijk AJ, de Vos AF, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016 Aug 4;7(8):e186. doi: 10.1038/ctg.2016.43.

Antibiotic-induced gut microbiota disruption during human endotoxemia: a randomised controlled study. **Lankelma JM**, Cranendonk DR, Belzer C, de Vos AF, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ. *Gut*. 2016 Jun 15. pii: gutjnl-2016-312132. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312132. [Epub ahead of print]

Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM)-2 Impairs Host Defense in Experimental Melioidosis. Weehuizen TA, Hommes TJ, **Lankelma JM**, de Jong HK, Roelofs JJ, de Vos AF, Colonna M, van der Poll T, Wiersinga WJ. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jun 2;10(6):e0004747. doi: 10.1371/journal.pntd.0004747. eCollection 2016 Jun.

The gut microbiota plays a protective role in the host defense against pneumococcal pneumonia. Schuijt TJ, **Lankelma JM**, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJ, de Boer JD, Hoogendijk AJ, de Beer R, de Vos A, Belzer C, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ. *Gut*. 2016 Apr;65(4):575-83. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309728. Epub 2015 Oct 28.

The gut microbiota in internal medicine: implications for health and disease. **Lankelma JM**, Nieuwdorp M, de Vos WM, Wiersinga WJ. *Neth J Med*. 2015 Feb;73(2):61-8.

[The gut microbiota in sickness and health]. **Lankelma JM**, Nieuwdorp M, de Vos WM, Wiersinga WJ. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2014;157:A5901.

Cathepsin L, target in cancer treatment? **Lankelma JM**, Voorend DM, Barwari T, Koetsveld J, Van der Spek AH, De Porto AP, Van Rooijen G, Van Noorden CJ. *Life Sci*. 2010 Feb 13;86(7-8):225-33. doi: 10.1016/j.lfs.2009.11.016. Epub 2009 Nov 30. Review.

Portfolio

Courses	Year	Workload (ECTS)
Basic laboratory safety	2012	0.4
Basic course legislation and organization (BROK)	2012	0.9
The AMC World of Science	2012	0.7
Laboratory animals (art. 9)	2012	3.9
Practical biostatistics	2013	1.1
BD FACS cursus, Erembodegem	2013	0.4
Educational skills training	2013	0.2
Advanced immunology	2014	2.9
DNA technology	2015	1.0
Seminars, workshops and masterclasses		
Masterclass by Eric Pamer	2013	0.2
Masterclass by Bruno Loos	2013	0.2
Masterclass by Nigel Mackman	2014	0.2
Masterclass by Martin Blaser	2014	0.2
Masterclass by Sharon Peacock	2014	0.2
Monthly department seminars (CEMMinar)	2012- 2016	1.0
Monthly Journal Club	2012- 2016	1.0
Ruysch lectures	2012- 2013	0.2
Infectious diseases symposium	2014	0.2
Oral presentation		
ISF Awardee Lecture, Protective role of the gut microbiota in pneumonia derived sepsis, ECCMID, Barcelona	2014	0.5
The gut microbiota as potential modulator of systemic innate immunity during melioidosis, European Melioidosis Congress, Cambridge University	2015	0.5
Poster presentation		
Protective role of the intestinal microbiota in the host defense against <i>Streptococcus pneumoniae</i> pneumonia, ICI, Milaan	2013	0.5
Gut microbiota depletion by broad spectrum antibiotics influences systemic innate immune responses in human volunteers, ECCMID, Barcelona	2014	0.5
Protective role of the gut microbiota in pneumonia derived sepsis, ECCMID, Barcelona	2014	0.5
The gut microbiota modulates systemic innate immune responses in sepsis: a translational approach, Keystone, Colorado	2015	0.5
Gut microbiota disruption by broad spectrum antibiotics does not affect innate immune responses during endotoxemia in healthy volunteers, Toll, Marbella	2015	0.5
The intestinal microbiota as a potential modulator of systemic innate	2015	0.5

immunity during experimental pneumonia, Toll, Marbella

(Inter)national conferences

International Congress of Immunology (ICI), Milaan	2013	1.25
Microbiota management in de klinische praktijk, KNMG Domus Medica, Utrecht	2013	0.25
European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Barcelona	2014	1.25
Gut Microbiota Modulation of Host Physiology: The Search for Mechanism, Keystone, Colorado	2015	1
European Melioidosis Congress, Cambridge	2015	0.75
Toll, Marbella	2015	1

Other

Retreat CEMM, Grolloo	2013	1
Retreat CEMM & Nijmegen, Mennorode	2014, 2015	2

Lecturing

WDH/NWU Duodagen, Huisartsen nascholing, Zuwe Hofpoort ziekenhuis, Woerden	2015	0.2
--	------	-----

Tutoring, mentoring

Back to the Future, WON/APROVE	2013	0.2
Rokus van den Dool, Master internship	2014	2
Bachelorthesis tutorgroup	2014, 2015	1
WON manifestation jury	2014	0.2
Mastertoets commissie	2014	0.2

Awards and prizes

ISF annual sepsis award, ECCMID, Barcelona	2014	
Third prize NVVM poster, ECCMID, Barcelona	2014	
Travel grant, ECCMID, Barcelona	2014	
Spinoza grant, Keystone	2015	

About the author



Jacqueline Lankelma (Amstelveen, 1987) graduated from the Keizer Karel College in 2005 and started studying Medicine at the Academic Medical Center in Amsterdam. She enrolled in the Honours programme, where her scientific career started with the writing of a Cathepsin L review under the inspiring leadership of prof. Ron van Noorden. During her two final internships at the Internal Medicine department of the Flevoziekenhuis and Intensive Care Unit of the AMC she took care of many patients with severe infectious diseases and/or sepsis. Tom van der Poll's laboratory offered the perfect opportunity to combine basic research into these diseases with great colleagues (including Cathepsin L writers Alexander and Joris). She was lucky enough to be offered a job by Joost Wiersinga on a translational project about the intestinal microbiota, the result of which is presented in this PhD thesis. Research into Joost's favourite bacterium *Burkholderia pseudomallei*, the cause of melioidosis in South-East Asia and Australia, added a tropical flavor to her PhD project. As these four years spent in the lab had been very interesting and a lot of fun, she decided not to leave the world of infectious diseases and is currently continuing her career at the VU medical center, where she is being trained as a clinical microbiologist.

Dankwoord

Heel veel dank aan iedereen die het toekomt, in het bijzonder de volgende mensen:

Joost, voor het bedenken van het allerleukste PhD project dat ik me had kunnen wensen en voor het feit dat je mij deze fantastische kans hebt gegeven! Je bent een bijzonder positieve persoon, waar ik en vele anderen een voorbeeld aan kunnen nemen. Dank voor alles wat ik van je geleerd heb; het waren vier ontzettend leuke jaren. Wat ben ik blij dat ik destijds die AMC beurs niet heb gekregen en in plaats daarvan bij jou terecht ben gekomen!

Tom, voor het leiden van de leukste onderzoeksgroep van het AMC; ik kan alleen maar hopen in de rest van mijn carrière tussen net zulke leuke mensen terecht te komen. Heel veel dank dat je mij een poging voor een scholarship waard vond en me naar Joost doorgeschoven hebt ;) en voor alle goede adviezen door de jaren heen.

Katja en Tassili, Joosts Angels, die mij zo lief hebben opgevangen toen ik een beginnend PhD'tje was en van wie ik zo veel heb geleerd!

Alle Tommies, het was me een eer om één van jullie te zijn! Tijmen, Ahmed, Miriam, Anne Jan, Mischa, Lonneke, Maryse, Sacha, Dana, Daan, Arjan, Adam, Isabel, Dorith, Joris, Vanessa, Lauren, Jeroen vH, Luigi, Brendon, Merche, Jos, Jan Willem, Joppe, & Kees dank voor alle gezellige congressen, feestjes, borrels, etentjes en grappen. Alex W, wij blijven gezellig nog een paar jaar collega's! Emma en Bas, dank voor al het werk dat jullie nog voor de melioidose-stukken hebben verricht! Desiree, Chao, Michelle, Jeanine, Jack, Fahimeh, Hina, Xiuping, Anja, Ivan, Mariska, Natasja, Xanthe: maak er nog een mooie tijd van bij het CEMM! Voor je het weet is 't voorbij.. ;) Alex de Vos, dank voor al je goede raad; Joris Roelofs, voor alle meditatieve uurtjes coupes scoren.

Marieke en Joost, met jullie immer goede humeur, voor het bijstaan van vele generaties Tommies met de muizen waar ze eigenlijk geen kaas van hebben gegeten. En Marieke en Jazz, bench-hoek-buddies, alle uurtjes kletsen maakten stickeren tot leuk werk :)

Regina, Daniëlle, Hakima, Miranda, Sanne, Monique J, MoniQue en Heleen voor al jullie hulp in grote en kleine dingen!

Steven en Clara voor alle hulp en gastvrijheid (en Steven voor de humor) - de paar dagen die ik ooit naar Wageningen dacht te komen werden toch aardig wat weekjes!

Professor Van Noorden, voor het aanwakkeren van mijn enthousiasme voor de wetenschap.

Niels, Lianne, Michael, Ardine, Patricia en alle andere ARIA medewerkers voor de goede zorgen voor mijn muizen!

Alex(ander), al sinds cathepsine L mijn wetenschapsmaatje (meer dan 10 jaar!) en Duncan - Schmunkie – bedankt dat jullie mijn paranimfen willen zijn, maar vooral voor ALLES! Ik had me geen leukere collega's kunnen wensen.

Alle gezellige nieuwe collega's in het VUmc – de eerste paar maanden beloven veel goeds voor de komende jaren :)

Alle lieve vrienden die ik heb, in het AMC en daarbuiten, muzikaal en niet-muzikaal, jullie mogen hier natuurlijk niet ontbreken!!

Jeroen, bij wie ik nog heel lang in het krijt sta voor het aanleveren van de laatste proefpersoon, en in dezelfde zin natuurlijk Janneke, die ik de speciale eer heb zowel tot vrienden, collega's als familie te mogen rekenen :) Wat me bij alle Coumou's brengt, dank voor alle warmte de afgelopen jaren en die nog zullen komen.

Tot slot, mijn lieve familie, ik denk dat jullie de boodschap ook zonder woorden begrijpen. Zonder jullie was dit proefschrift er niet geweest, maar dat geldt eigenlijk voor alles :)

Mijn liefste Janne, wat een onbeschrijfelijk geluk om met jou te mogen eindigen. Nog 80 jaar!