



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Microbes in the inflamed gut

Koopman, N.

Publication date
2024

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Koopman, N. (2024). *Microbes in the inflamed gut*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

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: <https://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.



Appendices

Summary

Microbes in the inflamed gut

We live in close collaboration with over 10^{14} microbes in our gut. These gut microbiota interact with us via complex networks of signaling compounds, making them key to many aspects of health, including development and functioning of the immune system. Disturbances in the gut microbiota are associated with many diseases including inflammatory bowel disease.

Inflammatory bowel diseases are collectively chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract, including Crohn's disease and ulcerative colitis. Both diseases can occur at any age, and often have their onset during childhood. Both ulcerative colitis and Crohn's disease are characterized by reoccurring 'flares' of inflammation, known as active disease, alternating with periods of no observable inflammation or clinical symptoms, called remission. Inflammatory bowel disease likely does not have a single cause and is considered to be an immune mediated multifactorial disease. Currently, there is no cure and treatment strategies aim to reduce symptoms and induce and maintain remission. The need for new treatment strategies is high and for this a comprehensive, holistic view of the disease that considers the microbiome, immune response and metabolism of the patient is essential.

The overall aim of this thesis was to study the gut microbiome from a disease-driven perspective. In **part I**, entitled **"Interactions between microbiota and host in inflammatory bowel disease"**, multi-omics and sequencing techniques were used to explore the interaction network between microbes and hosts in inflammatory bowel disease.

In **chapter 2**, we included pediatric patients with Crohn's disease and divided them in two groups, being in remission or having active disease. We analyzed the microbiome, both fungi and bacteria, of fecal samples, performed proteomics on fecal samples and metabolomics on feces, plasma and urine. By integrating the 6 different datasets in a machine learning model, we gained insight in the differences between active disease and remission. The model revealed that the most important features in distinguishing active disease from remission comprised 40% bacteria, 22% fecal metabolites, 16% proteins, 12%

plasma metabolites, 6% fungi and 4% urine metabolites, with the fecal compartment being the most discriminative. The interactome identified *Ruminococcaceae* and *Faecalibacterium* as key players in the alterations between active disease and remission.

Furthermore, correlations between the microbiota and the proteome and metabolome were observed. The anti-fungal compound hydroxyphenyllactic acid in urine, which can be produced by gut bacteria, correlated with fecal fungi.

Lactoferrin, an inflammation associated protein with antimicrobial properties, showed a negative correlation with *Collinsella* species. *In vitro* experiments could not mimic this negative correlation, since lactoferrin seems to have positive effect on the yield of *Collinsella aerofaciens*.

Pathway analysis showed an association of altered purine metabolism with remission, independent of thiopurine use. Changes in purine metabolism were confirmed in a public single cell sequencing dataset from intestinal biopsies of pediatric patients with Crohn's disease and controls.

In **Chapter 3**, a similar approach was used to investigate differences between active disease and remission in pediatric ulcerative colitis. This cohort was smaller than the pediatric Crohn's disease cohort described in **Chapter 2**, we only included microbiomics and metabolomics datasets. Consistent with our findings in Crohn's disease, microbiomics showed that the abundances of *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families are different between the two patients groups and that *Streptococcus* species were significantly higher in abundance during active disease while the fungal composition was overall very different between all patients. Pathway analysis of all metabolomic datasets showed that purine metabolism was altered between active disease and remission in ulcerative colitis, which we also observed in Crohn's disease.

In addition, oxidative stress associated glutathione metabolism, and pantothenate and Coenzyme A metabolism were altered and urea cycle metabolites and TCA cycle metabolites were increased in urine in active disease. Interestingly, the largest differences in metabolites are in the urine compartment in pediatric ulcerative colitis which contrasts with our findings in pediatric Crohn's disease where metabolites in feces were the most different between active disease and remission. The non-invasive nature of urine collection could therefore make urine analysis a promising tool for distinguishing between active disease and remission in ulcerative colitis.

Serotonin is an example of a compound that connects the microbiome with the host, playing a role in both health and disease, including inflammatory bowel disease. **Chapter 4** reviews the role of serotonin in intestinal homeostasis. Approximately, 95% of the serotonin in the body is produced in the gut. Enterochromaffin cells in the epithelial layer of the gut are the main producers, but serotonin can also be synthesized by other cell types and bacterial species inhabiting the gut. Bacteria can modulate the availability of tryptophan from which serotonin is made and *vice versa* host serotonin metabolism affects microbiota composition and functioning. In the gut serotonin functions as neurotransmitter regulating the enteric nervous system, but is also able to regulate the activation of immune cells and is involved in epithelial integrity. In this chapter an inventory of immune and epithelial cells that respond to serotonin and the effects of this signaling on intestinal homeostasis and inflammation is presented.

Since altered intestinal serotonin signaling is a feature of inflammatory bowel disease this chapter discusses the mechanisms by which serotonin could affect inflammatory bowel disease, followed by a review of interventions that target intestinal serotonin signaling.

Part II of this thesis, titled "**Sporobiota in the gut in health and disease**" focuses on bacteria with a specific developmental characteristic; the ability to form endospores in a process called sporulation, and what their role is in inflammatory bowel disease. During sporulation a vegetative cell undergoes a developmental change to form a metabolically inactive and highly resistant endospore. The community of intestinal spore forming bacteria are called the sporobiota.

Chapter 5 reviews the role of the sporobiota in the gut. The sporobiota may constitute up to 50% of bacteria within the human gut, including pathogens and commensal members contributing to gut homeostasis. This chapter provides an overview of the sporulation processes, spore properties, and germination processes within the scope of the human gut. Spores allow for host to host transmission due to their ability to survive in hostile environments. This especially important for obligate anaerobic species, which will die under atmospheric oxygen. Within the gut, spore-forming bacteria are known to interact with the host's immune system, both in vegetative and spore form. Together with the resistant nature of the spore, these characteristics offer potential for spores' use as therapeutics. In the last part of this chapter, the therapeutic potential of spores as probiotics in gastro-intestinal disorders and the potential of spores as vaccine vehicles and drug delivery systems is discussed.

In **Chapter 6**, we investigated whether metagenomics analysis of fecal samples can be used to predict the potential of an individual's microbiota to sporulate based on the presence of sporobiota associated genes. This method was validated by enriching a fecal sample for spores with a culture-independent method and comparing its metagenome with that of the bulk sample. Next, we showed with a public available dataset that there is no difference in sporulation potential between inflammatory bowel disease patients and healthy controls. However, patients with Crohn's disease show a higher sporulation potential than patients with ulcerative colitis. With another public dataset we showed the effect of a fecal microbiota transplantation (FMT) on the sporulation potential of patients with Crohn's disease. This effect is not always the same and does not correlate with the efficacy of the FMT. The sporulation potential might provide an opportunity to identify clinical conditions in which spore formers play a role. In addition, it might be useful for the selection of successful donors for FMT studies or for preparation of spore products from fecal matter.

In **Chapter 7** we investigated a widely cited story on the origins of fecal transplantation of which the therapeutic effect was attributed to *Bacillus subtilis* spores. The story suggest that German soldiers in North Africa learnt from the Bedouins to use dromedary camel feces to treat dysentery during World War II. Extensive literature review failed to find independent evidence for the traditional use of camel feces to treat dysentery. With 16S sequence analysis we did not detect *B. subtilis* in feces from two different Egyptian dromedaries. Using a more sensitive culture based assay we could detect low amounts of *B. subtilis* spores in these fecal samples, with comparable concentrations to those present in human feces and soil. Therefore, it does not seem likely that this story is true and that dromedary feces is of any therapeutical benefit due to the presence of *B. subtilis* spores. This chapter shows that scientists need to be careful with which stories they cite.

Finally in **chapter 8**, the main findings and insights of the different studies in this thesis are discussed. Taken together, the findings presented in this thesis underscore the significant role that the microbiota, including the sporobiota, play in inflammatory bowel disease. This makes the microbiota, an interesting target for treatment. Insight in the metabolites and microbial molecules produced by inflammatory bowel disease associated microbes is crucial for developing microbiome-based therapeutic. Given the patient specific nature of inflammatory bowel disease manifestations, a personalized approach guiding would potentially enhance the effectiveness of therapeutic strategies.

Nederlandse samenvatting

Microben in de ontstoken darm

We hebben miljarden microben in onze darmen die invloed kunnen hebben op onze gezondheid. Deze darmmicroben communiceren met ons lichaam via allerlei signaalstoffen waardoor ze invloed kunnen hebben op verschillende aspecten van onze gezondheid zoals de ontwikkeling en werking van het immuunsysteem. Als er iets misgaat in deze samenwerking, kunnen we ziek worden en bijvoorbeeld een inflammatoire darmziekte ontwikkelen. Inflammatoire darmziekte is een verzamelterm voor chronische ontstekingsaandoeningen van het maagdarmkanaal, waaronder de ziekten van Crohn en colitis ulcerosa. Beide ziekten kunnen op elke leeftijd voorkomen en treffen ook vaak kinderen. Zowel colitis ulcerosa als de ziekte van Crohn worden gekenmerkt door terugkerende 'opvlammingen' van ontsteking, bekend als actieve ziekte, afgewisseld met perioden zonder waarneembare ontsteking, genaamd remissie. Inflammatoire darmziekte heeft geen duidelijke oorzaak, meerdere factoren kunnen bijdragen aan de ontsteking. Momenteel is er geen genezing en zijn de behandelingsstrategieën gericht op het verminderen van symptomen en het induceren en behouden van remissie. Nieuwe behandelmethoden zijn hard nodig, waarbij gekeken wordt naar alle factoren: de microben, het immuunsysteem en de stofwisseling van de patiënt.

Het algemene doel van dit proefschrift was om het darmmicrobioom vanuit het perspectief van ziekte te bestuderen. In **deel I**, getiteld "**Interacties tussen microbiota en gastheer bij inflammatoire darmziekte**", werden verschillende technieken gebruikt om het interactienetwerk tussen microben en gastheer bij inflammatoire darmziekte te verkennen.

In **hoofdstuk 2** keken we naar kinderen met de ziekte van Crohn in remissie en tijdens een actieve ziekte. We analyseerden hun poep, bloed en urine en ontdekten dat bepaalde bacteriën en stofwisselingsproducten verschillen tussen ziekte en remissie. Door alle datasets te samen te brengen in een machine learning-model kregen we inzicht in de verschillen tussen actieve ziekte en remissie. De belangrijkste verschillen vonden we in de poep, met bepaalde bacteriën die samenhangen met specifieke stofwisselingsproducten en eiwitten. Een groot deel van de stofwisselingsproducten die anders zijn tussen de twee patiëntengroepen horen bij het purine metabolisme. Deze verschillen waren niet te wijten

aan azathioprine medicatie. Met een openbare dataset lieten we zien dat het purine metabolisme ook anders is in darmbiopten van kinderen met de ziekte van Crohn ten opzichte van gezonde kinderen.

In **hoofdstuk 3** werd een vergelijkbare aanpak gebruikt om verschillen tussen actieve ziekte en remissie te onderzoeken bij kinderen met colitis ulcerosa. Ook hier was het purinemetabolisme anders tussen de patiënten met actieve ziekte en de patiënten in remissie. Daarnaast zien we ook verschillen in andere stofwisselingsproducten tussen actieve ziekte en remissie. Opvallend was dat bij colitis ulcerosa meer veranderingen in de urine te zien waren, terwijl bij de ziekte van Crohn de meeste veranderingen in de poep zaten.

In **Hoofdstuk 4** bespreken we de rol van serotonine in darm homeostase. Alhoewel serotonine vooral bekend is vanwege de rol in het zenuwstelsel is de darm belangrijker voor de productie van de stof. Ongeveer 95% van de serotonine in het lichaam wordt geproduceerd in de darm. In de darm werkt serotonine als een signaalstofje om het zenuwstelsel en het immuunsysteem te reguleren. Daarnaast is het van belang voor het in stand houden van de binnenkant van de darm. Veranderingen in serotonine in de darm is een kenmerk van inflammatoire darmziekte. Daarom worden in dit hoofdstuk de mechanismen besproken waarmee serotonine inflammatoire darmziekte zou kunnen beïnvloeden.

Deel II van dit proefschrift, getiteld "**Sporobiota in de darm in gezondheid en ziekte**", richt zich op bacteriën met een speciale eigenschap: het vermogen om endosporen te vormen in een proces dat sporulatie wordt genoemd. Tijdens sporulatie ondergaat een levende cel een verandering om een inactieve en zeer resistente endospore te vormen. Sporenvormende bacteriën worden samen de sporobiota genoemd.

Hoofdstuk 5 bespreekt de rol van de sporobiota in de darm. De sporobiota kan tot 50% van de bacteriën in de menselijke darm uitmaken. Sporenvormers kunnen zowel ziekte verwekkers als gezonde bacteriën zijn. Dit hoofdstuk geeft informatie over hoe een spore wordt gevormd en weer uitgroeit tot een normale cel in de darm. Sporen zijn makkelijk over te dragen omdat hun resistente vorm overleving in verschillende omgevingen mogelijk maakt. Dit is vooral belangrijk voor soorten die anders zouden sterven door zuurstof. Binnen de darm is bekend dat sporenvormende bacteriën interactie hebben met het immuunsysteem van de gastheer, zowel in normale vorm als in sporevorm. Samen met de resistente aard van de spore bieden deze kenmerken mogelijkheden voor het gebruik van sporen als therapeutisch middel.

In **hoofdstuk 6** onderzochten we of we op basis van DNA onderzoek, iets kunnen zeggen over de aanwezigheid van sporen in de darm. Hiervoor hebben we het sporulatiepotentieel geformuleerd. Deze methode werd gevalideerd door een poepmonster te verrijken voor sporen en dat vervolgens te vergelijken met het onbewerkte monster waarin alle cellen nog aanwezig zijn. Vervolgens toonden we aan dat er geen verschil is in sporulatiepotentieel was tussen gezonde mensen en patiënten met inflammatoire darmziekte. Ook keken we naar het effect van een poeptransplantatie op het sporulatiepotentieel. Het sporulatiepotentieel kan een mogelijkheid bieden om ziektes of condities te identificeren waarbij er weinig sporenvormers en sporen aanwezig zijn en die mogelijk baat hebben bij poeptransplantatie of sporen als medicatie.

In **hoofdstuk 7** onderzochten we een veel geciteerd verhaal over de oorsprong van poeptransplantatie, waarvan het therapeutische effect werd toegeschreven aan *Bacillus subtilis* sporen. Het verhaal suggereert dat tijdens de Tweede Wereld oorlog Duitse soldaten in Noord-Afrika van de Bedoeïenen leerden om dromedarispoep te gebruiken om zware diarree te behandelen. Uitgebreide literatuurstudie leverde geen onafhankelijk bewijs op voor dit verhaal. Met een gevoeliger op kweek gebaseerde test konden we lage hoeveelheden *Bacillus subtilis* sporen detecteren in de poep van Egyptische dromedarissen, met vergelijkbare concentraties als die in menselijke poep en in de grond aanwezig zijn. Daarom lijkt het onwaarschijnlijk dat dit verhaal waar is en dat dromedarispoep enige therapeutische waarde heeft door de aanwezigheid van *Bacillus subtilis* sporen.

Ten slotte werden in **hoofdstuk 8** de belangrijkste bevindingen en inzichten van de verschillende studies in dit proefschrift besproken. Samengevat benadrukken de bevindingen in dit proefschrift de belangrijke rol die microben spelen bij inflammatoire darmziekten. Dit maakt de microbiota een interessant aspect voor behandeling. Inzicht in de door microben geproduceerde stofjes is cruciaal voor de ontwikkeling van op het microbiom gebaseerde therapieën.

Author contributions

Chapter 2

Integrated multi-omics of feces, plasma and urine in pediatric Crohn's disease is able to detect and connect metabolites, proteins and microbes that differentiate between active disease and remission

Nienke Koopman^{1,2}, Yorrick Jaspers³, Pim T. van Leeuwen^{1,2}, Konstantinos Chronas⁴, Andrew Li Yim², Kay Diederer^{2,5}, Anje A. te Velde², Winfried Roseboom⁶, Angelika Kindermann⁵, Marc A. Benninga⁵, Gertjan Kramer⁶, Wouter J. de Jonge², Stanley Brul¹, Evgeni Levin⁴, Stephan Kemp³ & Jurgen Seppen²

NK and JS conceived the project and YJ, PTvL, SK provided input to the initial design of the study. KD, AK, AAtV and MB were responsible for sample collection and patient inclusion. NK, YJ, PTvL and JS performed experimental work. PTvL performed the ITS analysis. NK performed the 16S analysis. YJ and SK performed the metabolomic analysis. NK, WR and GK performed the proteomics analysis. KC and EL performed the multi-omics integration. ALY performed the single cell analysis. NK and JS wrote the original draft. WJdJ and SB critically assessed the project. All authors critically read and gave feedback to the initial version of the manuscript.

Chapter 3

Multi-compartment metabolomics and microbiomics reveals urine metabolome as most discriminative for disease activity in pediatric ulcerative colitis

Nienke Koopman^{1,2}, Yorrick Jaspers³, Pim T. van Leeuwen^{1,2}, Kay Diederer^{2,5}, Anje A. te Velde², Angelika Kindermann⁵, Marc A. Benninga⁵, Wouter J. de Jonge², Stanley Brul¹, Stephan Kemp³ & Jurgen Seppen²

NK and JS conceived the project. KD, AK, AAtV and MB were responsible for sample collection and patient inclusion. NK, YJ, PTvL and JS performed experimental work. PTvL performed the ITS analysis. NK performed the 16S analysis. YJ and SK performed the metabolomic analysis. NK made the figures and wrote the original draft. WJdJ and SB critically assessed the project. All authors critically read and gave feedback to the initial version of the manuscript.

Chapter 4

The multifaceted role of serotonin in intestinal homeostasis

Nienke Koopman^{1,2, #}, Drosos Katsavelis^{1, #}, Anne S. ten Hove², Stanley Brul¹, Wouter J. de Jonge² & Jurgen Seppen²

The first draft of this paper was conceived by NK, DK and JS. AS revised the draft and prepared the figures. SB and WdJ critically revised the draft to yield the final manuscript

Chapter 5

Mechanisms and applications of bacterial sporulation and germination in the intestine

Nienke Koopman^{1,2, #}, Lauren Remijas^{1, #}, Jurgen Seppen², Peter Setlow⁷ & Stanley Brul¹

The first draft of this paper was conceived by NK and LR and JS. PS and S.B. critically revised the draft to yield the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Chapter 6

Metagenomics derived sporulation potential to predict the presence of spores in the healthy and diseased gut

Nienke Koopman^{1,2}, Stanley Brul¹, Anna Heintz-Buschart⁸, Jurgen Seppen² & Meike Wortel¹

NK, MW and JS conceptualized the study. NK and JS optimized the spore enrichment protocol. NK collected and processed the samples. NK, AHB and MW were responsible for bioinformatics analysis. NK prepared the initial draft of the manuscript and AHB, SB, JS and MW were responsible for revising the manuscript. All authors have read and agreed to the final version of the chapter.

Chapter 7. History of fecal transplantation; camel feces contains limited amounts of *Bacillus subtilis* spores and likely has no traditional role in the treatment of dysentery

Nienke Koopman^{1,2}, Pim van Leeuwen^{1,2}, Stanley Brul¹ & Jurgen Seppen²

Conceptualization: Jurgen Seppen. Data curation: Nienke Koopman. Formal analysis: Jurgen Seppen. Investigation: Nienke Koopman, Pim van Leeuwen, Jurgen Seppen. Methodology: Nienke Koopman, Stanley Brul, Jurgen Seppen. Project administration: Jurgen Seppen. Resources: Pim van Leeuwen, Stanley Brul. Writing – original draft: Jurgen Seppen. Writing – review & editing: Nienke Koopman, Pim van Leeuwen, Stanley Brul.

Affiliations

1. Department of Molecular Biology and Microbial Food Safety, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2. Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research, Amsterdam UMC location University of Amsterdam, Amsterdam Gastroenterology Endocrinology Metabolism Amsterdam, The Netherlands
3. Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Department of Laboratory Medicine, Amsterdam UMC location University of Amsterdam, Amsterdam Gastroenterology Endocrinology Metabolism, Amsterdam, The Netherlands
4. Horaizon BV, Delft, The Netherlands
5. Department of Pediatric Gastroenterology and Nutrition location University of Amsterdam, Amsterdam Gastroenterology Endocrinology Metabolism Amsterdam UMC, Amsterdam, The Netherlands
6. Laboratory for Mass Spectrometry of Biomolecules, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
7. Department of Molecular Biology and Biophysics, UConn Health, 263 Farmington Avenue, Farmington, CT 06030-3305, USA; setlow@uchc.edu
8. Department of Biosystems Data Analysis, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

These authors contributed equally

List of publications

In this thesis

Koopman N, Remijas L, Seppen J, Setlow P, Brul S. Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6). doi:10.3390/ijms23063405

Koopman N, van Leeuwen P, Brul S, Seppen J. History of fecal transplantation; camel feces contains limited amounts of *Bacillus subtilis* spores and likely has no traditional role in the treatment of dysentery. *PLoS One.* 2022;17(8):e0272607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272607>.

Koopman N, Katsavelis D, Hove AS ten, Brul S, Jonge WJ de, Seppen J. The Multifaceted Role of Serotonin in Intestinal Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17). doi:10.3390/ijms22179487

Koopman N, Jaspers J, van Leeuwen PT, Chronas K, Yim AL, Diederens K, ter Velde AA, Roseboom W, Kindermann A, Benninga MA, Kramer G, de Jonge WJ, Brul S, Levin E, Kemp S and Seppen J. Integrated multi-omics of feces, plasma and urine in pediatric Crohn's disease is able to detect and connect metabolites, proteins and microbes that differentiate between active disease and remission. *Under revision 2024*

Other

Koopman N, Molinaro A, Nieuwdorp M, Holleboom AG. Review article : can bugs be drugs? The potential of probiotics and prebiotics as treatment for non - alcoholic fatty liver disease. 2019;(May):1-12. doi:10.1111/apt.15416

Word of thanks

Dit proefschrift was er niet geweest zonder de hulp en support van een heleboel mensen. Ik wil graag iedereen bedanken die heeft bijgedragen aan dit proefschrift of mij op een andere manier hebben gesteund door de afgelopen jaren. Een aantal mensen wil ik in het bijzonder bedanken.

Mijn promotieteam: **prof. dr. Stanley Brul**, **prof dr. Wouter de Jonge**, **dr. Jurgen Seppen** en **dr. Meike Wortel**. **Stanley**, heel veel dank dat je aan mij dacht toen er nog geen juiste kandidaat was gevonden voor de PhD+ positie in jouw groep. Nog geen dag terug van stage in het buitenland en ik mocht langskomen om te solliciteren. Ik heb je optimisme en de vrijheid die je me gaf enorm gewaardeerd. Hoe jij mensen met elkaar verbindt en projecten tot stand brengt is inspirerend. **Jurgen**, bedankt voor je hulp met zo'n beetje alles. Of het nou om de inhoud ging of dat er poep gesmeerd moest worden, jij was altijd bereid om mij met alle aspecten van het onderzoek doen te helpen. Ook heb ik van je geleerd dan wetenschap ook best leuk mag zijn, met ons kamelenpoep verhaal als resultaat. Onze meetings, of deze nou online, op het Tytgat of op het Science park plaatsvonden, het was altijd gezellig. **Meike**, het was even zoeken naar een project waarin onze beide interesses samen kwamen maar denk dat het uiteindelijk goed gelukt is. Heel veel dank ook dat je mijn progressie in de gaten hield en mij stimuleerde om naar congressen te gaan en dat ik altijd bij je binnen kon lopen. **Wouter**, soms was het lastig om je op de hoogte te houden omdat het meeste van mijn werk op het science park plaats vond maar daardoor kon jij juist vaak een frisse kijk op de zaken geven. Veel dank voor je vertrouwen in mij.

Leden van mijn promotiecommissie, **prof. dr. S. El Aidy**, **prof. dr. M. Nieuwdorp**, **dr. rer. nat. A.U.S. Heintz Buschart**, **dr. J.E. van Limbergen**, **prof. dr. H. Smidt**, **prof. dr. ir. R. Kort** en **dr. T.G.J. de Meij** hartelijk dank voor het lezen en beoordelen van mijn proefschrift en jullie aanwezigheid bij mijn promotie.

Twee hoofdstukken in dit proefschrift zouden er niet geweest zijn zonder **de patiëntjes en hun ouders**. Dank voor het vertrouwen in de wetenschap, zonder jullie was dit onderzoek niet mogelijk geweest. **Anje**, **Marc** en **Kai**, dank voor het opzetten van de DIKI studie en het includeren van deze patiëntjes waardoor ik meteen aan de slag kon.

Mijn paranimfen, **Raymond**, een maandje na jou begonnen daardoor onze hele PhD journey kunnen delen. We made it! Dank voor al je hulp, oog voor goede figuren, microscopie skills, droge humor, gezelligheid, optimisme en nog veel meer. Ik had je af en toe echt nodig hoor. **Selin**, in de afgelopen jaren was je m'n student, buurvrouw, collega maar vooral lieve vriendin. Jij en je lieve familie staan altijd voor mij klaar, heel veel dank daarvoor. Ben trots op hoe je hebt doorgepakkt en je plekje hebt gevonden bij de NVWA.

Het MBMFS lab zou niet draaien zonder een aantal mensen. **Belinda**, labmoeder, dank voor al jouw steun en support of het nou in de vorm van kaartjes, een luisterend oor of de organiseren van het lab was. Jij staat altijd voor iedereen klaar. **Dennis**, dank voor alle bestellingen en het verwisselen van tientallen gasflessen als we het zelf niet goed in de gaten hielden. Zonder jou was het allang in de soep gelopen. **Richard**, dank voor het delen van al jouw inzichten, of het nou over wetenschap, onderwijs of algemene zaken ging. **Marco**, thanks a lot for being a listening ear and going on much needed breaks with me. I will miss our coffee moments!

Pim, mijn schimmel counterpart in het IBD microbiom onderzoek. Dank voor alles wat jij op je hebt genomen, van anaerobe lab hoofd zijn, lactoferrin proefjes tot karaoke avondjes organiseren. Soms duurden dingen wat langer maar uiteindelijk kwam het er wel. Dank voor je aanstekelijke gezelligheid. **Lisa**, we have had our phases of true crime shows, yoga classes and plant obsessions in which we went all out in the garden center. But more than that I appreciate all the conversations we had about life and everything that comes with it. Thank you for all the sharing and caring. You are doing great, almost there! **Longjiao**, amazing spore lady. Thank you for helping me out with the *Bacillus* spores. **Vera**, dank voor je kalmte en gezelligheid op kantoor. Fijn om af en toe met iemand te kunnen sparren over microbiom analyses en literatuur. Ben benieuwd wat er uit jouw onderzoek gaat komen! **Luyuan**, especially in the later hours we ended up talking. You are such a sweet and hardworking lady! **Wenxi, Shiqi, Xinyu and Taichi**, I'm happy that I could share most of my PhD journey with you. Thanks for teaching about Chinese culture and sharing fruits, other great food, and tea with me. **Niels**, toch nog even kantoorgenootjes aan het eind van onze PhDs. Heerlijk om af en toe echt even lekker samen te kunnen klagen. Succes met de laatste loodjes, je bent er nu echt bijna. **Yangwei**, happy that we could share anaerobic culture struggles. Thank you for your enthusiasm. **Xiaoyi**, thank you for your positive vibes in the office. I can imagine it was not always easy being surrounded by us loud dutchies. **Virginia and Markus**, you joined the office at the end of my PhD journey,

thank you for bringing in some new energy! Happy to see the continuation of microbiome research is in good hands with you guys. And all the other amazing coworkers within the MBMFS group over the past 5 years: **Benno, Hans, Jeroen, Gertien, Jan, Jianbo, Juan, Sacha, Yan, Zhiwei, Xiaowei, Yixuan, Tania, Tineke, Sam, Arend, Bhagyashree, Wishwas, Yuanqing, Yuliia, Sija, Eloise, Alphonse, Isabel** and **Abimbola**, thank you for sharing your wisdom, all the chats we had and all the 'gezelligheid'. I'm grateful I could share my PhD journey (partly) with you.

Everyone at Tytgat, thank you so much for all the input, your collective knowledge and great questions during the Tuesday morning meetings. Also great thanks to everyone that helped me to find my way in the lab over there.

Without all the people that helped me with the technical aspects of doing research, I would have been lost. **Yorrick** en **Stephan**, dank voor het delen van jullie metabolomics expertise. Ik vond de online COVID theekransjes die we met Jurgen en Pim hadden en waarin we naast het onderzoek ook nog heel veel andere dingen bespraken altijd erg gezellig! **Gertjan** en **Winfried**, dank voor jullie hulp met de proteomics. Het was fijn dat ik altijd bij jullie binnen kon lopen. **Roel**, dank dat ik altijd bij je kon aankloppen wanneer ik weer eens vastliep in R of je bioinformatica wijsheid ergens anders voor nodig had. **Anna**, thank you for your help in translating my 'sporulation potential' ideas to actual bioinformatic steps.

I had the pleasure to supervise and work together with great students! **Fleur, Yannick, Eliana, Daan, Ellie, Marlot, Drosos, Georgios** and **Lauren** thank you for your hard work and contributions to my projects. I've learned from all of you.

Naast onderzoek doen heb ik mij ook mogen ontplooien als docent en heb ik mijn basis kwalificatie onderwijs kunnen halen, dank voor allen hierbij betrokken. **Frank, Pim, Ringo, Babette, Nicholas, Bas** en **Margarita** het organiseren en geven van "Challenges" was een feestje met jullie!

Next to all already mentioned above, many others made my years at science park so much fun **Reinofke, Joost, Judith, Daniek, Lea, Angelika, Lisa, Biwen, Alberto, Loles, Jurian, Tjalling, Laureen, Mara, Felipe, Vincent, Emy, Sandra, Sebastian** and **Tanne**, thank you for all the drinks we had (and with some of you organized as PhD council), all the karaoke evenings, chats in the hallway, lunches at Neo, coffees (thanks to **Tony!**) and everything else!

YTT team 23/24, Sunflowers, and others from the **yoga community in Amsterdam**. Thank you all for your support, soothing energy, and positive vibes. You all were of enormous support the past year.

Immanuel, ik ben je dankbaar voor te veel om op te noemen maar boven alles voor dat wij elkaar altijd zijn blijven steunen om voor onze doelen te gaan! Zonder jou was ik er misschien wel nooit aan begonnen.

Sharon en **Kyu**, het boekje is eindelijk af en jullie kunnen eindelijk mijn onderzoek lezen! Heel veel dank voor alle liefde, interesse en support die ik van jullie heb mogen ontvangen.

Chickies, ik realiseer me steeds meer hoe bijzonder het is dat we al zo lang vriendinnen zijn! **Tu**, zo fijn om iemand in de buurt te hebben om van gedachten te kunnen wisselen over van alles en nog wat of gewoon een biertje mee te kunnen drinken. Dank voor je betrokkenheid, altijd goede adviezen en gezelligheid! **Rianne**, ik waardeer je enthousiasme en betrokkenheid enorm. Onze wandelingetjes door Amsterdam (met taartjes tussendoor) komen altijd op het goede moment, dank daarvoor! We gaan er vast nog heel veel maken samen de komende tijd. **Margo**, samen naar Amsterdam voor onze studies en ook nog eens beide een PhD, ben erg dankbaar dat we veel hebben kunnen delen en onwijs trots dat je de stap naar Amerika hebt gezet. Ik ga je nu echt niet meer achterna hoor. **Melanie**, soms spreken we elkaar veel en soms wat minder maar ik kan altijd bij je terecht. Heel veel dank daarvoor, ik heb erg genoten van onze erg lange voice messages over en weer het afgelopen jaar en hoop dat we nog vaak avondjes 'op tijd naar huis gaan'. **Cheyenne**, we zien elkaar weinig maar als ik je zie is het altijd gezellig en als vanouds, heerlijk hoe jij altijd jezelf bent. Dank voor je positiviteit en gezelligheid. **Valerie**, hardwerkende vrouw. Jij bent het voorbeeld van als je iets wilt dan kom je er wel. Dank voor je interesse en gezelligheid.

Apoorv, most of this thesis was already finished when we met. You made sure that the period of finishing up was also filled with happy memories for which I'm very grateful. Many more memories to make!

Annemarie, lief zusje, ook al ben je jonger dan ik, jij bent een grote inspiratie om altijd voor je doelen en dromen te gaan. Ben trots op je!

Lieve **papa & mama**, heel veel dank dat jullie mij altijd hebben gestimuleerd om te doen wat ik leuk vind en om mijn eigen pad te volgen. Bij jullie kan ik altijd tot rust komen om er vervolgens weer tegen aan te kunnen. Dankjulliewel voor alles!

About the Author

Nienke Koopman, born in Hoogeveen on a sunny May 1st, 1994, grew up amidst a bunch of animals and the natural beauty of Drenthe alongside her younger sister. Her early fascination with nature led her to pursue a degree in Biology after completing her pre-university education at the Roelof van Echten College. This journey took her to the city of Amsterdam, where she experienced an active student life.

Nienke's academic curiosity was particularly piqued by the molecular intricacies of biology. A minor in Food, Intestinal Homeostasis, and Disease at Wageningen University solidified her passion for exploring biology within a human context. She advanced her studies at the University of Amsterdam, earning a master's degree in biomedical sciences with a focus on Biochemistry and Metabolic Diseases. She performed research internships at the Amsterdam UMC and the Sahlgrenska Hospital in Gothenburg, Sweden which sparked her interest in gut microbiome research. She also pursued a major in Science in Society at VU University, broadening her scientific perspective.

In 2019, Nienke embarked on her PhD+ program, a collaborative effort between the Swammerdam Institute for Life Sciences and the Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research at Amsterdam UMC under the supervision of prof. dr. S. Brul, prof. dr. W. J. de Jonge, dr. J. Seppen and dr. M.T. Wortel. She not only delved into research but also developed her teaching skills, earning her University Teaching Qualification.

Beyond her professional pursuits, Nienke is an avid yogi, often found on the mat practicing herself or teaching others. After completing her thesis, she embraced the opportunity to travel to India. She is eager to seek for new challenges in which she can contribute to a healthier future.

