

SAMENVATTING

Chronische longontsteking veroorzaakt door *Pseudomonas aeruginosa* is een belangrijke factor in het ziektebeeld bij mensen met mucoviscidose (muco). Hoewel *P. aeruginosa* tijdens langdurige kolonisatie veel klassieke virulentiefactoren onderdrukt, blijft de ontsteking aanhouden, wat suggereert dat ook andere, nog niet geïdentificeerde bacteriële mediators hierbij betrokken zijn.

Het belangrijkste doel van dit proefschrift was het ophelderen van de inflammatoire rol van zowel bekende virulentiefactoren als nieuwe eiwitmediators die door *P. aeruginosa* tot expressie worden gebracht tijdens chronische muco-longinfecties. Hiervoor werden fysiologisch relevante groeiomstandigheden en modelsystemen gebruikt die de *in vivo* muco-longomgeving nabootsen, om *P. aeruginosa*-fenotypes en eiwitexpressieprofielen te bevorderen die kenmerkend zijn voor chronische infecties.

Op basis hiervan bespreekt **Hoofdstuk III** de experimentele omstandigheden die het meest accuraat de infectiedynamiek en de invloed van de micro-omgeving weerspiegelen die *P. aeruginosa* in de muco-long ondervindt. Dit hoofdstuk geeft een overzicht van diverse *in vitro*, *ex vivo* en *in vivo*-diermodellen van muco-longinfectie die zijn geëvalueerd op hun *in vivo*-achtige prestaties met behulp van (transcript)omics-gebaseerde methodes. Tevens wordt het huidige tekort aan validatiestrategieën op basis van het proteoom en metaboom toegelicht, en worden toekomstige richtingen geschetst voor het verbeteren van deze modelsystemen.

Hoofdstuk IV beschrijft experimenteel onderzoek gericht op het verkrijgen van nieuwe inzichten in door *P. aeruginosa* veroorzaakte longontsteking onder omstandigheden die de muco-long *in vivo* nabootsen. Veertien *P. aeruginosa*-isolaten afkomstig van twee mucopatiënten werden gekweekt in synthetisch CF-sputummedium 2, en de capaciteit van de resulterende celvrije supernatanten om inflammatie op te wekken in de gastheer werd beoordeeld met behulp van een organotypisch driedimensionaal (3D) longepitheelcelmodel.

Deel 1 van Hoofdstuk IV onderzoekt de bijdrage van *P. aeruginosa*-proteasen aan longontsteking bij muco. Isolaten van de twee patiënten vertoonden een aanzienlijk verschil in proteolytische activiteit, waarbij isolaten van één patiënt over het algemeen een hoge proteolytische en elastolytische activiteit vertoonden, terwijl die van de andere patiënt minimale activiteit lieten zien. Celvrije supernatanten van isolaten met proteolytische activiteit degradeerden cytokines en verminderden cytokine-afgifte in het 3D-model. Vergelijkende proteoomanalyse van celvrije supernatanten van isolaten met en zonder proteolytische activiteit identificeerde elastase B

(LasB) als het meest differentieel tot expressie gebrachte protease. Met behulp van *P. aeruginosa* *lasB*-knock-outmutanten werd aangetoond dat LasB meerdere belangrijke inflammatoire mediators degradeert, waarmee zijn immunomodulerende rol onder de geteste experimentele condities werd bevestigd. Daarnaast werden andere proteasen geïdentificeerd die mogelijk in samenwerking met LasB bijdragen aan het omzeilen van het immuunsysteem.

Deel 2 van Hoofdstuk IV richt zich op het ontdekken van eerder ongekende pro-inflammatoire mediators die chronische ontsteking in stand houden, zelfs wanneer klassieke virulentiefactoren zijn onderdrukt. Isolaten verschilden aanzienlijk in hun vermogen om IL-8-afgifte te induceren, waarbij een subgroep van isolaten een sterke pro-inflammatoire respons veroorzaakte ondanks lage productie van bekende virulentiefactoren zoals proteasen, lipopolysaccharide of rhamnolipiden. De proteoomdataset uit **Deel 1** werd gebruikt om pro- en anti-inflammatoire isolaten te vergelijken, waarbij verschillende kandidaat-mediators werden geïdentificeerd die eerder niet met inflammatie waren geassocieerd. Onder deze mediators kwam de transcriptiefactor DksA naar voren als een mogelijke veroorzaker van persistente luchtweginflammatie. Analyse van bestaande datasets van *P. aeruginosa* genexpressie in sputum van mensen met muco bevestigde consistente en robuuste *in vivo*-expressie van *dksA*, en het vermogen van DksA om ontsteking te induceren werd verder aangetoond door de gastheerontstekingsrespons te beoordelen die werden opgewekt door een *P. aeruginosa dksA*-knock-outmutant in het 3D-longmodel.

Gezamenlijk geven deze bevindingen meer inzicht in de manier waarop *P. aeruginosa* de immuniteit van de gastheer moduleert tijdens chronische infectie bij mensen met muco. Dit werk benadrukt zowel proteolytische activiteit als eerder ongekende mediators als belangrijke factoren in het persistente inflammatoire milieu dat kenmerkend is voor de muco-long, en biedt een basis voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën.