

University of Groningen

A proteogenomic view on antibiotic resistance in pathogenic *Enterobacter* species

Nepal, Suruchi

DOI:
[10.33612/diss.103413360](https://doi.org/10.33612/diss.103413360)

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:
2019

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

Citation for published version (APA):

Nepal, S. (2019). *A proteogenomic view on antibiotic resistance in pathogenic Enterobacter species*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.103413360>

Copyright

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

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 7

Nederlandse samenvatting
Acknowledgements

Nederlandse samenvatting en toekomstperspectieven

Bacteriën die tot het zogenaamde *Enterobacter cloacae* complex behoren zijn wijdverspreid in de natuur. Dit komt door hun vermogen om zich effectief aan verschillende omstandigheden en ecologische niches aan te passen die kunnen variëren van de bodem tot het menselijke lichaam (Maria Lina Mezzatesta, 2018). In ziekenhuizen worden regelmatig ziekmakende varianten van *E. cloacae* aangetroffen die soms zeer resistent tegen antibiotica kunnen zijn (Streit, Jones, Sader, & Fritsche, 2004)(Kubota et al., 2018). Dit proefschrift beschrijft bijvoorbeeld een extreem antibioticumresistent *Enterobacter roggenkampii* isolaat, behorend tot het *E. cloacae* complex, dat ongevoelig is voor zogenaamde carbapenems. Dit is een zorgwekkende bevinding, omdat carbapenems bijzonder effectieve antibiotica zijn die slechts daar ingezet dienen te worden waar andere antibiotica falen. Het hoofddoel van het hier beschreven onderzoek was te begrijpen hoe deze carbapenem-resistentie zich heeft kunnen ontwikkelen, over welke antibioticumresistentiemechanismen de geïsoleerde *Enterobacter roggenkampii* bacterie beschikt en hoe antibioticumresistentie onder bacteriën van het *E. cloacae* complex zich mogelijk in de toekomst zal ontwikkelen.

Vanuit klinisch oogpunt hebben vragen hoe een infectie zich in de patiënt manifesteert en hoe deze infectie het beste bestreden kan worden altijd de hoogste prioriteit. Hiertoe is het noodzakelijk om de ziekteveroorzakende bacterie te identificeren en te achterhalen voor welke antibiotica hij (nog) gevoelig is. De *E. cloacae* isolaten die in dit proefschrift zijn beschreven werden geïsoleerd uit patiënten die opgenomen waren in het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG). Het bepalen van het antibioticumresistentieprofiel van deze bacteriën was daarom in eerste instantie belangrijker dan het achterhalen tot welke bacteriesoort ze precies behoren. Hiertoe werden de hier beschreven bacteriën allereerst geïsoleerd door ze in het diagnostisch laboratorium te kweken. Vervolgens werd het antibioticumresistentieprofiel van de gekweekte bacteriën bepaald en werden ze met behulp van een geavanceerde techniek, de zogenaamde 'matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry' (MALDI-TOF MS) geïdentificeerd. Uit deze analyses bleek, dat de beschreven isolaten allemaal tot het '*E. cloacae* complex' behoorden, dat één van

de isolaten uit een neonaat resistent was tegen carbapenems en dat de overige isolaten uit patiënten met botinfecties nog gevoelig waren voor de meeste antibiotica. De isolatie van '*E. cloacae* bacteriën' uit patiënten met botinfecties was opmerkelijk omdat, ten tijde van hun isolatie, botinfecties veroorzaakt door dergelijke bacteriën een betrekkelijk zeldzaam verschijnsel waren. Voor een adequate behandeling van de desbetreffende patiënten was deze informatie voldoende. Voor een goed begrip van de biologische principes die ten grondslag lagen aan de waargenomen carbapenemresistentie of het klinische gedrag van de geïsoleerde bacteriën was daarentegen meer diepgaand onderzoek nodig.

Om echt te kunnen begrijpen hoe bacteriën resistent worden tegen antibiotica en verschillende niches in ons lichaam veroveren is het van belang om hun moleculaire opbouw goed te kennen, met name met betrekking tot hun erfelijke informatie, het genoom, en hun totale eiwitsamenstelling, het proteoom. Dit is een enorm ambitieus doel, dat momenteel slechts ten dele bereikt kan worden. Een belangrijke beperking voor ons goede begrip van het ziekmakende gedrag van micro-organismen is, dat ze eigenlijk alleen in detail bestudeerd kunnen worden na hun isolatie uit de patiënt, met andere woorden: buiten het menselijke lichaam. Het meest haalbare alternatief is de bestudering van ziekteverwekkers door de samenstelling van hun genoom in detail te karakteriseren. Hieruit kan vervolgens hun mogelijke gedrag in de patiënt afgeleid worden. De technieken om bacteriegenomen goed te bestuderen zijn in de afgelopen vier jaar enorm verbeterd en van deze ontwikkelingen is dankbaar gebruik gemaakt in het hier beschreven promotie-onderzoek. Ten tijde van de studies die samengevat zijn in **hoofdstuk 2** was het nét mogelijk geworden om snel en voor een redelijke prijs genomanalyses uit te voeren. De technieken waren echter nog niet geperfectioneerd en zo zaten er letterlijk gaten in de verkregen DNA-sequentie-informatie. Deze kennishiaten konden tegen het einde van de hier beschreven studies grotendeels gedicht worden dankzij zogenaamde derde-generatie nano-pore-gebaseerde sequentieanalyse-technieken. Gaandeweg werd het steeds beter mogelijk om een accurate genoomsequentie te verkrijgen door het samenvoegen van korte, kwalitatief hoogwaardige DNA-sequenties met veel langere DNA-sequenties die weliswaar niet perfect waren, maar die wel hielpen om de korte sequenties in de juiste volgorde te plaatsen. Dergelijke

hybride DNA-sequentie-assemblage-technieken leveren nu in korte tijd zeer accurate genomsequenties op en ze zijn met name nuttig voor de opheldering van delen van het bacteriële genoom, waarin veel herhaling van DNA-sequenties voorkomt (Antipov, Korobeynikov, McLean, & Pevzner, 2016). De hybride DNA-sequentie-assemblage is daarom op dit moment het beste startpunt voor gedetailleerde vervolgstudies die kunnen variëren van genomannotatie, ofwel het identificeren van alle genen die een genoom bevat, tot de gedetailleerde vergelijking van verschillende bacteriële genomen en de interpretatie van massaspectrometrische data om de totale eiwitsamenstelling van bacteriën zowel kwalitatief als kwantitatief op te helderen.

Zoals beschreven in **hoofdstuk 2** maakte de hybride genomassemblage van een carbapenem-resistent bacterie-isolaat, behorend tot het *E. cloacae* complex, het mogelijk om de evolutionaire gebeurtenissen te reconstrueren die, via ‘horizontale genoverdracht’ tussen bacteriën, tot deze resistentie hebben geleid. Een bijzondere vondst was de identificatie van een mobiel genoomeiland, dat reeds onder voorouders van de huidige enterobacteriën was verspreid, voordat de bacteriesoorten die tegenwoordig tot het *E. cloacae* complex behoren zich hieruit ontwikkelden. Uiteindelijk is dit mobiele genoomeiland een platform geworden, waarin zich zeer uiteenlopende resistentiegenen hebben genesteld. Hiertoe behoren genen die coderen voor de zogenaamde AmpC-type cephalosporinases, waarvan er zich één, MIR17 genaamd, verder heeft ontwikkeld tot een carbapenemase dat carbapenems afbreekt (hoofdstuk 2). Deze originele waarnemingen hebben verschillende belangrijke implicaties. In de eerste plaats werd duidelijk, dat genoomelementen die als onderdeel van het kerngenoom van een bacteriesoort worden beschouwd wel degelijk mobiele genomische elementen kunnen zijn. Dit fenomeen wordt vaak over het hoofd gezien bij genomanalyses. De waarnemingen beschreven in hoofdstuk 2 laten heel duidelijk zien, dat het belangrijk is om over de soortgrenzen heen te kijken wanneer men onderscheid wil maken tussen kerngenomen en variabele genomdelen. In de tweede plaats vestigen de waarnemingen beschreven in hoofdstuk 2 de aandacht op het feit, dat dergelijke oude mobiele genoomeilanden ‘hotspots’ voor de ophoping van resistentiegenen kunnen zijn, zoals bijvoorbeeld de *ampC*-type cephalosporinase-genen. In de derde plaats is gebleken, dat niet

alle cephalosporinases van het AmpC-type gelijk zijn, aangezien sommige, zoals MIR17, ook carbapenemase activiteit kunnen vertonen. Deze waarneming heeft inmiddels een toepassing gevonden in de diagnostische routine in het UMCG, waarbij platen met cloxacilline gebruikt worden om mogelijke carbapenemase activiteit van cephalosporinases zichtbaar te maken. Tenslotte heeft de hybride genoomassemblage het mogelijk gemaakt om het proteoom van het carbapenem-resistente *E. roggenkampii* isolaat in detail te analyseren. Hierbij werd aangetoond, dat de MIR17 carbapenemase in grote hoeveelheden wordt aangemaakt.

Een groot voordeel van een kwalitatief hoogwaardige genoomsequentie, zoals verkregen door de hybride genoomassemblage, is dat gedetailleerde genoomvergelijkingen van nauw verwante *Enterobacter* soorten mogelijk worden. Door een dergelijke fylogenetische analyse uit te voeren werd duidelijk, dat het carbapenem-resistente studie-isolaat uit hoofdstuk 2 feitelijk een *E. roggenkampii* isolaat is.

De kwalitatieve proteoomanalyse, zoals beschreven in hoofdstuk 2, geeft een goed overzicht over de eiwitsamenstelling van de bacteriële cel, maar een dergelijke analyse geeft geen dynamische informatie over de reacties van een bacterie op bepaalde stresscondities, zoals de aanwezigheid van een antibioticum. Toch is het belangrijk om te weten hoe een bacteriecel reageert op de aanwezigheid van een antibioticum, aangezien dit waardevolle inzichten verschaft over mogelijke aanpassingen van de bacterie aan de aanwezigheid van antibiotica. Dergelijke aanpassingen kunnen uiteindelijk gaan behoren tot het standaardrepertoire van een bacterie, hetgeen leidt tot intrinsieke antibioticumresistentie. Daarom werd bij de studies beschreven in **hoofdstuk 3** onderzocht hoe het carbapenem-resistente *E. roggenkampii* isolaat reageert op de aanwezigheid van het carbapenem-antibioticum imipenem. Ook voor deze analyses was de beschikbaarheid van de hybride genoomsequentie van grote toegevoegde waarde, aangezien hiermee een additionele set van 400 eiwitten geïdentificeerd kon worden die eerder op grond van de incomplete sequentie over het hoofd gezien was. Zoals eigenlijk al werd voorspeld bij aanvang van het onderzoek, gaven de kwantitatieve proteoomanalyses een goed beeld van de veranderingen die de aanwezigheid van sub-inhibitoire imipenem

concentraties teweeg brengen in de bacterie. Hierbij is het van belang te weten dat carbapenems, zoals imipenem, met name de bacteriële celwandsynthese remmen door de activiteit van de betrokken penicilline-bindende eiwitten te blokkeren. Dienovereenkomstig helpen de waargenomen aanpassingen de bacterie allereerst om de verspilling van cellulaire bouwstenen voor de, door het imipenem afgeremde, celwandbiogenese te voorkomen. Bovendien helpen de waargenomen aanpassingen het mogelijke ontstaan van zeer schadelijke reactieve zuurstofvarianten tegen te gaan door de activiteit van de glycolyse en de citroenzuurcyclus te reduceren. De activiteit van deze metabole routes zou in principe verhoogd kunnen worden, doordat minder voedingsstoffen voor de celwandbiogenese nodig zijn en dit zou vervolgens tot verhoogde bacteriële respiratie kunnen leiden met het voor de bacterie ongewenste ontstaan van reactieve zuurstofvarianten als problematische consequentie. Naar nu is gebleken kan de bacterie dit voorkomen door zijn metabolisme te vertragen. De mogelijke vorming van zuurstofradicalen wordt mogelijk ook tegengegaan door de synthese van zogenaamde ijzer-zwavel clusters te verlagen en door een enzym voor de synthese van het antioxidant vitamine K te verhogen. Tezamen laten deze waarnemingen zien, dat bacteriën die al resistent zijn tegen carbapenems ook nog over meerdere alternatieve mogelijkheden beschikken om de voor deze bacteriën mogelijk fatale effecten van carbapenems tegen te gaan. De bevindingen beschreven in hoofdstuk 3 zijn in overeenstemming met resultaten van eerdere studies die de reacties van bacteriën op verwante β -lactam-antibiotica hebben beschreven en die lieten zien, dat deze antibiotica niet alleen de aanmaak van de bacteriële celwand remmen, maar dat ze ook leiden tot de excessieve vorming van reactieve zuurstofvarianten die bijdragen aan de antibiotische werking (Tomasz, 1979)(Kohanski, Dwyer, Hayete, Lawrence, & Collins, 2007)(Burke, 2018). Daarnaast heeft eerder onderzoek laten zien, dat het voorkomen van de vorming van reactieve zuurstofvarianten door een verlaagd metabolisme de vorming van zogenaamde bacteriële L-vormen mogelijk maakt, waarbij de bacteriën hun celwand verliezen (Kawai et al., 2019). Deze waarnemingen vestigen de aandacht op de centrale rol van metabole routes in de bacteriële levenscyclus en de mogelijkheid om het centrale koolstofmetabolisme met nieuwe antibiotica, die overigens nog ontwikkeld moeten worden, te dereguleren. Als het bijvoorbeeld mogelijk zou

zijn om met zo'n nieuw antibioticum de metabole activiteit van bacteriën in de aanwezigheid van imipenem te verhogen, ofwel te voorkomen dat de bacteriën hun metabolisme verlagen, dan zou het mogelijke gevolg kunnen zijn dat de bacteriën dermate hoge niveaus van reactieve zuurstofvarianten produceren, dat ze de bacteriedodende werking van het imipenem versterken. Dit effect zou mogelijk ook bereikt kunnen worden door de vorming van ijzer-zwavel clusters in de bacteriën te verhogen. In dit opzicht zou de bacteriële Fur-regulator een interessant doelwit voor nieuwe antibiotica kunnen zijn omdat, zoals beschreven in hoofdstuk 3, de vorming van ijzer-zwavel clusters in de aanwezigheid van imipenem verlaagd wordt door Fur-gemedieerde regulatie.

Hoewel de genomsequentie van het carbapenemresistente *E. roggenkampii* isolaat de detectie van het *ampC* gen mogelijk maakte, waren meer klassieke microbiologische technieken nodig om aan te tonen dat de MIR17 cephalosporinase ook een carbapenemase activiteit heeft. Deze bevinding kon niet op grond van de beschikbare genomsequentie voorspeld worden. Dit benadrukt het feit, dat de genomsequentie slechts de 'blauwdruk' van een levende bacterie en al zijn mogelijke activiteiten weergeeft. Zo zou op basis van alléén de genomsequentie niet voorspeld kunnen worden hoe de onderzochte *E. roggenkampii* bacterie reageert op de aanwezigheid van imipenem. Een andere waarneming die op grond van de genomsequentie niet voorspeld kon worden was dat deze *E. roggenkampii* bacterie gevoelig was voor aminoglycosiden, ondanks de aanwezigheid van het *aadA* gen, dat codeert voor aminoglycosideresistentie. Hoewel dit waarschijnlijk iets zegt over de evolutionaire geschiedenis van het onderzochte *E. roggenkampii* isolaat, laat het ook heel duidelijk zien dat het van groot belang blijft om genoomanalyses te combineren met functionele tests of proteoomanalyses om zichtbaar te maken waartoe de onderzochte bacteriën werkelijk in staat zijn. Mogelijk kunnen toekomstige benaderingen die gebaseerd zijn op 'machine learning' en kunstmatige intelligentie deze beperkingen van de huidige genoomanalyses wegnemen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de resultaten van een gecombineerde genomics en proteomics analyse die tot doel had om uit te zoeken in welke mate bacteriën van het *E. cloacae* complex die in de menselijke darm voorkomen verschillen van

verwante bacteriën die betrokken zijn bij botinfecties. In eerste instantie werden hiertoe de respectievelijke genomesequenties vergeleken. Hieruit bleek dat de onderzochte isolaten verschillende *Enterobacter*-soorten vertegenwoordigen. Isolaten uit de darm werden aldus geïdentificeerd als *E. roggkampii* en *E. hormaechei* subspecies *hoffmannii*, terwijl de botisolaten verschillende *E. hormaechei* subspecies vertegenwoordigden of de 'echte' *E. cloacae*. Op grond van alleen deze gegevens kon al geconcludeerd worden, dat de respectievelijke isolaten een verschillende evolutie hebben doorgemaakt die de voorkeur voor verschillende niches in het menselijke lichaam zou kunnen verklaren. De proteoomanalyses lieten vervolgens zien, dat de botisolaten meerdere eiwitten produceerden die gerelateerd zijn aan zogenaamde type III en type VI systemen voor eiwitsecretie. Dergelijke systemen spelen een belangrijke rol bij het vermogen van bacteriën om ziekte te verwekken en, in het geval van de type VI systemen, om andere micro-organismen die concurreren voor dezelfde niche uit te schakelen. Bij nadere inspectie van de respectievelijke genomesequenties bleek inderdaad, dat elk botisolaat de genen voor twee of drie type III plus twee of drie type VI eiwitsecretiesystemen bezit. Deze genen zijn allemaal geïntegreerd in de nabijheid van genen die coderen voor transfer RNAs, wat er meestal op duidt, dat ze verkregen zijn door horizontale genoverdracht tussen bacteriën. Het carbapenem-resistente *E. roggkampii* isolaat bleek daarentegen eiwitten tot overexpressie te brengen die gerelateerd zijn aan antibioticumresistentie en de resistentie tegen zware metalen. Tezamen laten de beschreven genom- en proteoomanalyses zien, dat de onderzochte bacteriën die allemaal behoren tot het *E. cloacae* complex zich op verschillende wijze optimaal hebben aangepast aan verschillende niches, waarin op verschillende eigenschappen geselecteerd wordt. In de context van deze evolutie hebben ze verschillende moleculaire functies verworven die hun reproductieve succes in deze niches hebben verhoogd.

Hoofdstuk 5 richt de aandacht op twee plasmides die coderen voor de zogenaamde OXA-427 carbapenemase. Deze plasmides werden respectievelijk in een *Klebsiella pneumoniae* isolaat en een bacterie behorend tot het *E. cloacae* complex geïdentificeerd. Beide plasmides bevatten de kernsequentie van zogenaamde IncA/C2 plasmides, maar in het *K. pneumoniae* isolaat is dit

plasmide gefuseerd met een ander plasmide van de IncFIB categorie, hetgeen resulteerde in een ‘megaplasmide’ van 321 kb. Dit megaplasmide omvat meerdere gebieden die coderen voor verschillende antibioticumresistenties. De aanwezigheid van meerdere resistentiegenen in één megaplasmide is zeer zorgwekkend, omdat dergelijke plasmides betrekkelijk eenvoudig overdraagbaar zijn naar andere bacteriën, die wellicht reeds resistent zijn tegen meerdere antibiotica. Het geïdentificeerde megaplasmide zou alzo een vehikel kunnen vormen voor het ontstaan van pan-resistente enterobacteriën die resistent zijn tegen alle beschikbare antibiotica.

Kort samengevat beschrijft dit proefschrift de identificatie en karakterisering van bacteriën die behoren tot het *E. cloacae* complex en die opmerkelijk waren met betrekking tot hun antibioticumresistentie of hun klinische manifestatie. In verreweg de meeste gevallen worden dergelijke waarnemingen alleen toegepast voor de behandeling van patiënten met infecties die door deze bacteriën veroorzaakt worden, terwijl de complexe mechanismes die ten grondslag liggen aan de waargenomen antibioticumresistentie of de infectie van bepaalde niches in het menselijke lichaam niet verder onderzocht worden. Dankzij de recente ontwikkeling van snelle ‘multi-omics’ technologieën en hun implementatie op het grensgebied van klinisch en fundamenteel wetenschappelijk onderzoek is het nu mogelijk geworden om een blik te werpen in het verleden, het heden en de toekomst van geïsoleerde ziekteverwekkers. Dit is een spannende ontwikkeling, omdat de nieuw verkregen inzichten uiteindelijk kunnen bijdragen aan de totstandkoming van betere strategieën en geneesmiddelen, waarmee men gevaarlijke infecties kan voorkomen of genezen.

Referenties

- Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J. S., & Pevzner, P. A. (2016). HybridSPAdes: An algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics*, *32*(7), 1009–1015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>
- Burke, T. P. (2018). The Unexpected Effects of the Combination of Antibiotics and Immunity. *Cell*, *172*(5), 891–893. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.003>
- Kawai, Y., Mercier, R., Mickiewicz, K., Serafini, A., Sório de Carvalho, L. P., & Errington, J. (2019). Crucial role for central carbon metabolism in the bacterial L-form switch and killing by β -lactam antibiotics. *Nature Microbiology*, *4*(October). <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0497-3>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). [cell.2007.06.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049)
- Kubota, H., Uwamino, Y., Matsui, M., Sekizuka, T., Suzuki, Y., Okuno, R., ... Iwata, S. (2018). FRI-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolated in Tokyo, Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(11), 2969–2972. <https://doi.org/10.1093/jac/dky291>
- (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, *130*(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Maria Lina Mezzatesta, F. G. & S. S. (2018). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Cell*, *172*(5), 1136–1136.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>
- Streit, J. M., Jones, R. N., Sader, H. S., & Fritsche, T. R. (2004). Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *International Journal of Antimicrobial Agents*, *24*(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.12.019>
- Tomasz, A. (1979). The Mechanism of the Irreversible Antimicrobial Effects of Penicillins: How the Beta-Lactam Antibiotics Kill and Lyse Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *33*(1), 113–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.000553>

Acknowledgements

Dear all,

I feel fortunate to be able to express my appreciation to people who have helped me during my research and stay in Groningen. Thank you all.

Before starting my acknowledgement, I would like to share a small fact of my life. I moved a lot during my childhood. I have changed school seven times in six different places, which included valleys, Terai and hilly areas of Nepal. Each time I moved, I did not know how my life was going to be like, but I used to explore and find a small domain where I could enjoy in the city, and from that point I always begin my new journey. I saw movement as a way of life. Therefore, I try to connect myself to the ambience of city, and of course that is important to me. I am glad that I could connect myself to Groningen. People often ask me, if I miss mountains and Himalayas. Definately, I miss the majestic mountains and vibrant culture that I have experienced in my home country Nepal. However, I also enjoy the beautiful sky and clouds of Netherlands. Sometimes, the clouds would orient in such a manner that it would look like a mountain range. Definitely, I can't trek: P, but it is interesting to see the interplay of clouds and sky. I consider it a valuable experience living here. I have enjoyed living in Netherlands. Not only I have enjoyed, but also I learned a lot during my Masters and PhD research.

Firstly I would like to appreciate some important people of my life who do not have a direct role in my PhD but very important role in my life. They have inspired, supported, trusted and showed me light, which I could use as a direction to find my way, whenever I needed. My mother enthusiasm, positivity, and forgiving nature has helped me a lot to grow in my personal and research life. Whenever I have accumulated negative energy, she has helped me neutralize them and recharge with her compassionate nature. Then, my childhood friend Roshan was the first person who introduced me to the world of science. He used to demonstrate fun science games which amused me, and I always look forward to see his work. Not only science but also he introduced me to aesthetics by his amazing calligraphy. Because of him, I began to appreciate the unseen aspects nature around me. At that time, I got excited and appreciated his work but I had no patience

to understand why and how. Nonetheless, I already noticed cool things were possible. I also began to pay more attention to the lectures at school, and since then I got better in my formal education. Then I moved to another city, where I met my friend Sabita, she has always adorned my life with her enthusiastic and positive nature. Sabita, we been friends from the time when I even did not know the meaning of friendship. You are amazing. Your insights have been so inspiring . I look forward to lot of travelling with you. I would also like to thank your husband Sudeep for helping us organize trips during my stay in United States. You both are lovely couple. My hajurama (grandmother), my buwa (father in Nepali) my bhai (brother) always show me possibilities, that might not be realistic sometimes but they always help me to regain constructive mindset and move towards a purposeful life. I would also like to thank my friend Silvia, who always help me clear my doubts and boost my confidence . Thanks for your constant trust on me. I appreciate all of your constant support and enthusiasm.

I would like to thank my promotor Prof. Jan Maarten van Dijl for giving me opportunity to start my PhD in his lab. I appreciate your kind and down to earth nature. You have been very supportive throughout this research journey. I had very good experience while working on Chapter 3, and I was so happy when you showed me direction to connect some missing links in the pathways. Honestly, I felt joy of being in science. I also appreciate that you challenged me to improve my communication skills. There was no option to move the project forward without good communication. I would also like to thank your wife Rita for nice talks during the lab get together. I would also like to than my co-promotor Erik Bathoorn. Thanks for helping me to improve the theoretical background and practical aspects of antibiotic resistance. I appreciate your support and patience. And thank you John Rossen for allowing me to use the sequencing facility. I really appreciate your willingness to help. Thank you all for your supervision. I wish you all the best and success.

I am grateful to my collaborator Stefano Grasso. I appreciate his immense interest, curiosity and critical thinking. I think you are intelligent and cool person. With you, I learned to manage my enthusiasm, slow down and evaluate each steps of analysis. I appreciate how you explain me bio-informatics. But your emails

are so long 😊. I wish we could work on more projects in future. You helped me right when i needed help most. I would also like to thank Giorgio for his critical analysis in the phylogeny of *E. cloacae* complex. I appreciate that you would try to answer all the relevant and irrelevant questions, and tolerating my annoying teasing. My sincere thanks to you Giorgio. Francis, I appreciate so much your insights on the biological processes. You have talent to notice the patterns and suggest meaningful ideas. With the trio of my collaborators, I learned to be more critical that help balance my extra optimism. I feel very lucky to work with you.

I would also like to thank my reading committee Arnold Driessen, Wim Quax and Kartsen Becker, Prof. A. Hamprecht for making time to read my thesis. And thank you Eleni, Solomon, , Rocio , Girbe, Hermie , Monika, Sigrid, Natacha, Margarita, Marines, Bimal, Tim, Sandra Maas , Silvia , Ruben and Jasper for helping and giving me advice on various subjects related to PhD.

I would like to thank my lovely paranymphs Francis, Marines and Bimal. My life in the lab would have been so boring without you all. Bimal, I am going to miss the Chiya/ Coffee gaaf (Nepali way of saying tea time talks). I feel so fortunate that we met in Groningen and ended up working in the same lab. Talking with you is fun because we feel comfortable to talk about the economy, society, bad music, movies to future, space and so on. I like the joke about the bird that you tell. That joke always makes me laugh. I have also enjoyed travelling with you during conferences and courses. I am sure we will stay in touch and I wish you all the best and success in your enterprenual endeavours. Marines, you are so enthusiastic . You are so easygoing, always ready to try new things. I am happy that i met you and very happy that we could make memorable trip to Lanzarote 😊 . Francis, I learn a lot from you. I like that you have diverse knowledge on various topics. I appreciate a lot your insights and suggestions. What for? Thats the question i often forget to ask . Working with you I learned to ask that question . Thank you all for helping me organize my defense day. I wish my lovely paranymphs all the best and I am sure we will stay in touch.

Thank you my cool officemates Tim , Andrea, Laura, Yanyan and Elias. Tim, you are very positive and organized. . I like that you shared your travel experience. I was lucky to have my classmate and friend as colleague :) . I remember with you and Solomon our office was lively and full of energy. Andrea, you are so affectionate, and real hugger. The more I know you, the more I admire you. I also think you are amazing story teller. Thank you for being so sweet to me . I wish you all the best. Laura, it was nice to see you again. I enjoyed a lot making songs for Solomon, wasn't it fun? I think so. Thanks Yanyan and Elias for nice environment in the office. Special thanks to Minia. I enjoyed a lot your company during your short stay in Groningen. I wish you happiness.

I am so lucky that i have funny , warm, affectionate, crazy, sweet, lazy , advenferous friends. I am indebted to my friend Ana, Irene and Violeta. My dearest friends, my life in Groningen would have been so boring without you. All those movies evening, parties, dinners, short trips, holidays , coffee breaks and much more have decorated my stay in Groningen. Ana you have been so warm and always there for me. I miss you so much. Irene, it was so nice to be your paranyph. It's so fun to be around you. Violeta, you simply make us dance :). I love you all.

I feel so lucky to find amazing friends at my workplace. That is so rare. Giorgio, you know me since I joined the lab. I sincerely want to thank you for all the delicious food you cooked for us, especially taking care of personal taste. You are the most passionate chef. Giorgio and Maggie, you both are loving and caring and you don't wait to show your care. That's lovely. Maggie, thanks for all support during the last days of my PhD research. Thanks for the pumpkin chai late, almond milk and coffee breaks that helped me cope with time pressure. You are heartwarming. Rocio, you inspired , supported and help me improve in so many areas of my life. I enjoy your company a lot. I look forward to making some cool clay earrings with you. Stefano, you rarely joke. But, some of your jokes are really funny. I wish you all the best.

My lekkers group friends Guido, Georgia , Gabi and Tim. I have enjoyed all the nice , funny, strange, warm talks . I love how we have gathered to order the popular “Alfajores” . Definately, Alfajores sped up my writing process (Rurira). Guido, i can imagine you will be telling the story of culture shock stories even to your grandchildren. Georgia, you are so warm and welcoming. I love coffee time and talks with you. Gabi, thank you for nice talks and suggestions . I wish you all the best .

Jasmine, my sister and my flatmate. You light up my PhD life. I look forward to our trip to Croatia together :). Atieh , my crazy friend. You are awesome. Thanks for all support and encouragement . Both you and Jethro revive my feelings towards social work. You all are my sweet family in Groningen.

Dear Merle and Chris , I am so happy that you are in Groningen . Thanks for you understanding and love. There are many trips we made together. But i think we all agree that the surprise Hungary trip was fun :). Thanks Gergely for hosting all of us. Thanks Maiu, Morl, Anita and Sarah. Sarah, i really like that you get excited about research . I wish you all the best. Santoshi and Jimmie, you both are lovely. Thanks for your care during my stay in Netherlands. Marry, my amazing friend,thank you for showing me around Groningen and sharing your life experiences. I learn a lot from you.

Dear Elisa, when you are enthusiastic you bring so much excitement. Thanks for 1% coffee break time. I wish you all the best. Marina, i appreciate so much your caring nature. I would also like to thank Usma for all fun time. Mafalda, Tiago and Rita, thank you for nice conversations

Xin, you have been always so nice to me. Thanks for all the good thoughts. Definately, that is helpful to deal with the moments of self doubts. Jolanda , i will always remeber “let’s shine “. Thanks for positive talks. Gaby, thanks for all jokes and fun talks in breaks. Min, i admire the way you express your enthusiasm for food and travelling. Sjouke, thanks for your help in my copper project, and also your help in translating Dutch to English. Lissane, thanks for the tips to use inkscape . Dear, Yaremit , Paola, Lu, Marjolein. I would like to wish you all the best. I am sorry if I forgot to mention some names. Thanks amazing Molbac members.

I would like to thank Han Moshage for selecting me in the top Masters programme. That was a special opportunity which allowed me to explore and understand research world.

I would also like to thank Samiksha, Pragyi, and Greeshma. I am glad that I met you in Groningen. I wish you a lot of fun, all the best for your future. I would like to appreciate all my friends from Nepal. Kishor you have been encouraging and concerned. Thanks for your support. Suraiya, Kritan, Kalpana, Sakun, Rashna, Sahana, Rashmi, Ramesh, thank you all. Special thanks to Sarju dai. I wish you all the best for finishing your PhD. I would also like to thank all my family members in Nepal and Europe.

Thank you very much everyone. You all have been extremely supportive.

Best Regards,

Suruchi

