

University of Groningen

Structure-function relationship between homogalacturonan pectins and intestinal immunity

Beukema, Martin

DOI:
[10.33612/diss.191042608](https://doi.org/10.33612/diss.191042608)

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:
2021

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

Citation for published version (APA):

Beukema, M. (2021). *Structure-function relationship between homogalacturonan pectins and intestinal immunity: Microbiota-(in)dependent effects on the gastrointestinal immune barrier*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.191042608>

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.

Addendum

Food and/or Feed compositions to manage immune homeostasis

Summary

Nederlandse samenvatting

Dankwoord

Curriculum Vitae

Publication list





European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact

| | |
|------|----------|
| Date | 05 02 21 |
|------|----------|

| | |
|---|--|
| Reference | Application No /Patent No 20169672.1 - 1112 |
| Applicant/Proprietor DSM IP Assets B V , et al | |

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING 15 04 20
 PRIORITY //
 TITLE FOOD AND/OR FEED COMPOSITIONS TO
 MANAGE IMMUNE HOMEOSTASIS
 DESIGNATED STATES AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
 GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
 PL PT RO RS SE SI SK SM TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0)

- 1/BEUKEMA, Martin/o University Medical Center Groningen (UMCG), Pathology and Medical Biology Hanzeplein 1, EA 14/9713 GZ Groningen/NL
- 1/DE VOS, Paulus/o University Medical Center Groningen (UMCG), Pathology and Medical Biology Hanzeplein 1, EA 14/9713 GZ Groningen/NL
- 1/JERMENDI, Éva/o Wageningen University, Laboratory of Food Chemistry, Bornse Weilanden 9/6708 WG Wageningen/NL
- 1/SCHOLS, Hendrik Arie/o Wageningen University, Laboratory of Food Chemistry, Bornse Weilanden 9/6708 WG Wageningen/NL
- 1/VAN DEN BERG, Marco Alexander/DSM Nutritional Products Ltd o/o Patent Department Wurmisweg 679/4303 Kaiseraugst/CH

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC

The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s)

Receiving Section



EPO Form 1048 10/09



Summary

Over the last decades, the incidence of lifestyle-related diseases has increased in Western society. Much evidence supports the important role of dietary fibers in the prevention of such Western diseases. One mechanism by which fibers may protect against the development of disease is by preserving the gastrointestinal immune barrier. The gastrointestinal immune barrier is the gatekeeper of the human body. It is composed of a mucus layer and a layer of epithelial cells and prevents luminal molecules from entering the underlying lamina propria containing immune cells. Intestinal barrier dysfunction may result in immune-related disorders such as autoimmune and inflammatory diseases. Barrier protective effects of dietary fibers can prevent the development of such diseases, but the effects are however strongly dependent on the type of dietary fiber. Besides more studies are required to understand structure-function relationships between dietary fibers and the intestinal immune barrier.

Pectins are one type of dietary fibers that have been recognized to reduce the incidence of such Western diseases. These fibers can be found in fruits and vegetables where they can be composed of complex chemical structures, such as homogalacturonan regions, rhamnogalacturonan I and II regions, or xylogalacturonan. Pectins largely consist of homogalacturonan regions that contain a backbone of galacturonic acid residues. These galacturonic acid residues can be methyl-esterified in a different level (degree of methyl-esterification; DM) or distribution (degree of blockiness; DB). Pectins with a high DM contain a high level of methyl-esters and pectins with a high DB contain a high level of blockwise distributed non-esterified galacturonic acid residues. The DM and DB strongly influence functional properties of homogalacturonan pectins, such as bulking effects, reducing the absorption of glucose and LDL cholesterol, or binding to bile acids. Pectins also influence intestinal immunity, but current knowledge on whether the degree and distribution of methyl-esters of homogalacturonan pectins influence the gastrointestinal immune barrier is limited.

Pectin can influence the immune system of the gastrointestinal tract, but the effects are not similar for each pectin structure. In **Chapter 1**, we reviewed the current knowledge of the immunomodulatory properties of structural characteristics of pectins and their beneficial effects on the gastrointestinal immune barrier. Pectins were demonstrated to have beneficial effects through direct interactions with the gastrointestinal immune barrier by strengthening the mucus layer, preservation of epithelial integrity, activation or inhibition of innate immune responses, or interaction with pattern recognition receptors. Furthermore, pectins can also influence the gastrointestinal immune system through microbiota-dependent effects. The fibers are found to exert these effects through stimulation of microbiota species, stimulation of short-chain fatty acids (SCFA) production or impacting the bacterial adhesion to epithelial

cells. This review demonstrated that various pectin structures have the potential to influence the gastrointestinal immune system through direct interactions with the immune system or modulation of the intestinal microbiota. However, it has been challenging to determine which specific structural patterns of pectins were responsible for the immune-modulating effects in these studies since most tested pectins contained a combination of different structural regions. Future studies were therefore suggested to focus on the impact of single structural characteristics of pectins on the gastrointestinal immune barrier. Hence, we investigated in the following chapters whether the DM and DB of homogalacturonan pectins influence the gastrointestinal immune barrier through direct interactions or microbiota dependent effects.

First, the direct interaction between pectins and Toll-like receptor (TLR) signalling was investigated. In **Chapter 2**, we investigated whether the DM of pectins plays a role in this interaction. Pectins with a different DM were tested on TLR activating and TLR inhibiting properties on TLR2, TLR2-1, TLR2-6, TLR4, and TLR5. We found that pectins had minimal TLR activating effects, but they strongly inhibited TLR2-1 signalling. This effect was most pronounced with low DM pectins. Low DM interacts with TLR2 through electrostatic interactions between negative charged non-esterified galacturonic acid residues and positively charged amino acids of TLR2. The anti-inflammatory effect of low DM pectins was also found *in vitro* in TLR2-activated dendritic cells and macrophages and *in vivo* in TLR-2 dependent mucositis in mice. Mucositis was prevented by administration of pectin and anti-inflammatory effects were independent of SCFA production. Our findings demonstrate that low DM pectins have strong anti-inflammatory effects through inhibition of TLR2-1 signalling, suggesting that a high level of non-esterified galacturonic acids increases inhibitory effects of pectins on TLR2-1 signalling.

Next, we investigated in **Chapter 3** whether the distribution of methyl-esters in pectins with a varying DM influences the impact of pectins on TLR signalling. First, two orange and two lemon pectins with a low DM (~DM30) and high DM (~DM60) were tested on TLR activating and inhibiting properties on TLR2, TLR2-1, TLR2-6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, and TLR9. The pectins minimally activated the different TLRs. Furthermore, of the different TLRs, TLR2-1 was mainly inhibited by the orange and lemon pectins. However, the orange and lemon pectins with a similar high DM (~DM60) did not show a similar level of TLR2-1 inhibition, while orange and lemon pectins with a low DM (~DM30) induced a similar level of TLR2-1 inhibition. Of the high DM pectins, the orange pectin inhibited TLR2-1 more strongly than the lemon pectin, which could be related to the high DB in the orange pectin. To investigate this further, pectins in three categories of DM with either a low and high DB were tested on TLR2-1 inhibitory properties. We found that low DM pectins (~DM19) with a low and high DB or intermediate DM pectins (~DM46) with a high DB inhibit TLR2-1 strongly,

Addendum

whereas intermediate DM pectins with a low DB or high DM pectins (~DM86) both with a low or high DB did not inhibit TLR2-1 as strong. These pectin structures with strong TLR2-1 inhibiting properties were also very efficient in binding TLR2. Furthermore, these pectin structures could prevent TLR2 induced IL-6 secretion from macrophages, suggesting that the pectin structures with TLR2-1 inhibiting properties can induce anti-inflammatory effects on immune cells which is mediated through TLR2 binding. Together, our study demonstrates that pectins with a large number of blockwise distributed non-esterified galacturonic acid residues induce anti-inflammatory effects TLR2-1, whereas a low number or a more random distribution of non-esterified galacturonic acid residues in pectins do not.

Next, we investigated in **Chapter 4** whether the anti-inflammatory effects of the pectin structures on TLR2, as measured *in vitro*, can be extrapolated to anti-inflammatory effects on TLR2 *in vivo*. To test this, we used a mouse model with doxorubicin-induced mucositis that is a TLR2-mediated inflammation of the small intestine. Four structurally different pectins that differed in DM and DB were tested. Of these pectins, three were strong TLR2-1 inhibitors (two low DM pectins (~DM19) with both a low and high DB and one intermediate DM (~DM46) pectin with a high DB), whereas one pectin was a weak TLR2-1 inhibitor (intermediate DM with a low DB). Our data showed that the pectins prevented doxorubicin-induced apoptosis and peritonitis in a structural dependent manner, whereas intestinal inflammation was prevented by all pectins. These findings suggest that the strong TLR2-1 inhibiting pectin structures were most efficient in preventing the development of doxorubicin-induced mucositis, whereas the weak TLR2-1 inhibiting pectin structure showed lower anti-inflammatory effects.

As the DM and DB of pectins induce anti-inflammatory effects through direct interactions with intestinal immunity, we investigated in the following chapters how these structural properties of pectins may influence the gastrointestinal immune barrier through microbiota-dependent ways. In **Chapter 5**, we investigated how supplementation of these pectin structures influence microbiota-immune interactions under healthy conditions. We supplemented healthy mice for 1 to 4 weeks with the pectin structures that were previously tested in mice with doxorubicin-induced mucositis. From these mice, we determined T cell frequencies in the spleen and mesenteric lymph nodes. We measured caecal microbiota composition, SCFA composition and the ability of caecal digesta to activate Aryl-hydrogen receptors (Ahr) to determine which microbial-derived products may be responsible for the effects on T cell immunity. Our data showed that pectin supplementation did not change the frequency of T cells from the spleen. However, supplementation of DM19 (high DB) pectin and both intermediate DM pectins for only one week increased the frequencies of Th1, Th2 and Roryt⁺ regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes. After four weeks, supplementation

with those pectins reduced the frequencies of Th1 and Th2 to control levels, whereas Roryt⁺ regulatory T cell frequencies remained high. These effects were however not observed after 1 or 4 weeks of supplementation with the DM18 (low DB) pectin. This could be explained by pectin dependent differences in shifts in microbiota composition that differed for DM18 (low DB) pectin compared to the other pectins. The pectin-induced increase in Th1 and Th2 frequencies was correlated to an increase in *Lachnoclostridium*, and the increased frequency of Roryt⁺ regulatory T cells correlated to *Lachnospiraceae* NK4A136 and *Ruminococcaceae* UCG-003. T cell-stimulating effects were not derived from SCFA, but rather through an increase in Ahr-activating components in caecal digesta of DM19 (high DB), DM49 (low DB) or DM43 (high DB) supplemented mice. Together, this study demonstrates that pectins influence microbiota-T cell interactions in a DM and DB dependent manner.

As the DM and DB of pectins induce anti-inflammatory effects through direct interactions with the intestinal immunity and influence microbiota-immune interactions, we next investigated whether these structural properties of pectins can induce anti-inflammatory effects during pathogenic infection through the microbiota dependent ways. An infection with the enteric pathogen *Citrobacter rodentium* was used to study the microbiota dependent effect of the pectins as this pathogen specifically induce an altered microbiota composition that is characterized by the overgrowth of this pathogen in the caecum and colon of mice. Here, the pathogen will bind to epithelial cells after which they will induce high levels of inflammation. First, we performed *in vitro* studies in **Chapter 6** to determine whether structurally different pectins protect from epithelial barrier disruption by *C. rodentium*. One low DM (DM32) pectin and two high DM pectins (DM59 and DM64) with a low or a high DB were used in this study to determine the DM and DB dependent effects. Our study demonstrated that pectins limited *C. rodentium* induced barrier disruption through antimicrobial effects. The protective antimicrobial effects of the pectins were independent of the DM and DB because all three pectins induced similar protective effects. The antimicrobial effects are suggested to occur through direct interaction of the homogalacturonan pectins with *C. rodentium* specifically since only binding was measured between pectins and *C. rodentium* and not between pectins and *Lactobacillus plantarum* or *Escherichia coli*. Together, this study demonstrates that pectins protect from *C. rodentium* induced disruption of the epithelial barrier through antimicrobial effects on *C. rodentium*.

Next, we investigated *in vivo* in **Chapter 7** the anti-inflammatory impact of the DB in high DM pectins in mice with *C. rodentium* induced colitis. Two high DM pectins (DM59 and DM64) that differed in DB were used in the current study. This study showed that both pectins, independent of the DB, prevented the development of *C. rodentium* induced colitis by protecting from *C. rodentium* induced epithelial disruption, intestinal damage and

Addendum

inflammation. The pectins changed the caecal microbiota to a relatively similar composition, suggesting that the difference in DB of pectins does not induce differences in caecal microbiota compositions in the mice. Moreover, the protective effects of pectins were not derived from enhanced SCFA levels in the caecum, but rather from the lower bacterial load of *C. rodentium* in the caecum of pectin treated mice. These findings suggest that the distribution of methyl esters of high DM pectins do not influence the anti-inflammatory effects of pectins on *C. rodentium* induced colitis.

Finally, in **Chapter 8** the results described in this thesis are discussed. Different studies imply that direct interactions between pectins and intestinal immunity occur mostly in the small intestine since it contains a loose mucus layer and a low abundance of microbiota species. It was suggested that in the large intestine microbiota dependent effects occur as the large intestine contains a thick mucus layer and a high abundance of microbiota species prevent the direct interactions of pectins with the intestinal immune system. It was also concluded from the aforementioned studies that the level and distribution of methyl-esters influences the direct effects of homogalacturonan pectins on TLR2 and microbiota-immune interactions. However, the DM and DB do not change the anti-pathogenic impact of homogalacturonan pectins on *C. rodentium*. The use of homogalacturonan pectins with an intermediated DM and a high DB may influence immunity and enhance intestinal barrier function through both direct effects on immunity and microbiota-dependent effects. Ultimately, the knowledge on the anti-inflammatory properties of pectins on intestinal immunity, as described in this thesis, can help the industry in tailoring pectin formulations with anti-inflammatory properties. Such formulations can be used to reduce the incidence of immune-related diseases in Western society.

Nederlandse samenvatting

Over de laatste jaren is het duidelijk geworden dat het aantal levensstijl gerelateerde ziektes is toegenomen in de Westerse wereld. Er is veel bewijs dat heeft laten zien dat voedingsvezels een belangrijke rol spelen in het voorkomen van zulke Westerse ziektes. Eén mechanisme hoe vezels kunnen beschermen tegen de ontwikkeling van ziektes is door het behouden van de gastro-intestinale immuun barrière. De gastro-intestinale immuun barrière is de poortwachter van het menselijk lichaam. Het bestaat uit een slijm laag en een laag van epitheel cellen die voorkomen dat lumenale moleculen binnendringen in de onderliggende lamina propria dat immuun cellen bevat. Een disfunctie van de intestinale barrière kan resulteren in immuun gerelateerde ziektes zoals auto immuun ziektes en ontstekingsziekten. De barrière beschermende effecten van voedingsvezels kunnen de incidentie van zulke ziektes voorkomen, maar de gezondheid bevorderende effecten van voedingsvezels zijn echter afhankelijk van het type voedingsvezel. Daarnaast zijn er meerdere studies nodig om te structuur-functie relaties tussen voedingsvezels en de immuun barrière te begrijpen.

Pectines zijn voedingsvezels die erkend zijn om de incidentie van zulke Westerse ziektes te verminderen. Deze voedingsvezels kunnen geïsoleerd worden uit verschillende fruitsoorten of groentes, waarin ze kunnen bestaan uit verschillende complexe chemische structuren, zoals homogalacturonan regio's, rhamnogalacturonan I en II regio's, of xylogalacturonan regio's. Pectines bestaan grotendeels uit homogalacturonan regio's die zijn opgebouwd uit een keten van galacturonzuren. Deze galacturonzuur residuen kunnen een methyl-ester bevatten in een verschillende gradatie (degree of methyl-esterification; DM) en distributie (degree of blockiness; DB). Pectines met een hoge DM bevatten veel methyl-esters en pectines met een hoge DB bevatten een blok wijze distributie van niet-veresterde galacturonzuur residuen (galacturonzuren zonder methyl-ester). De DM en DB hebben een sterke invloed op functionele eigenschappen van homogalacturonan pectines, waaronder de bulk effecten, het reduceren van de absorptie van glucose en LDL cholesterol of het binden aan galzuren. Pectines hebben ook een invloed op het immuunsysteem van de darm, maar huidige kennis over hoe de graad en distributie van methyl-esters van homogalacturonan pectines de gastro-intestinale immuun barrière beïnvloeden is beperkt.

Pectines kunnen het immuunsysteem van de darm beïnvloeden, maar deze effecten zijn niet hetzelfde voor elke pectine structuur. In **Hoofdstuk 1** hebben we in een review de huidige kennis samengevat naar de immuun modulerende effecten van structurele eigenschappen van pectines en hun gunstige effecten op de gastro-intestinale immuun barrière. Pectines bleken gunstige effecten uit te oefenen door directe interacties aan te gaan met de gastro-intestinale immuun barrière door het versterken van de slijm laag, het behouden van de epitheel

integriteit, activatie of inhibitie van aangeboren immuun responsen of interactie met pattern recognition receptoren. Verder kunnen pectines ook de gastro-intestinale immuun barrière beïnvloeden door microbiota afhankelijke effecten. De vezels bleken deze effecten uit te oefenen door stimulatie van microbiota soorten, stimulatie van kortketige vetzuur (short-chain fatty acids; SCFA) productie of door de adhesie van bacteriën op epitheelcellen te beïnvloeden. Dit review heeft laten zien dat verschillende pectine structuren de potentie hebben om het gastro-intestinale immuun systeem te beïnvloeden door directe interacties met het immuunsysteem of door modulatie van de intestinale microbiota. Het is echter uitdagend om te bepalen welke specifieke structurele patronen van pectines verantwoordelijk zijn voor de immuun-modulerende effecten in deze studies aangezien de meest geteste pectines een combinatie van verschillende structurele regio's bevatten. Vandaar dat we in de volgende hoofdstukken bepalen of de DM en DB van homogalacturonan pectines de gastro-intestinale immuun barrière beïnvloeden door directe interacties of microbiota afhankelijke effecten.

Allereerst werd de interactie tussen pectines en Toll-like receptor (TLR) signalering onderzocht. In **Hoofdstuk 2** onderzochten we of de DM van pectines een rol spelen in deze interactie. Pectines met een verschillende DM werden getest op TLR activerende en TLR inhiberende eigenschappen op TLR2, TLR2-1, TLR2-6, TLR4, en TLR5. We vonden dat pectines de verschillende TLRs minimaal activeren, maar wel dat pectines een sterk inhiberend effect hadden op TLR2-1. Deze effecten op TLR2-1 gelden met name voor pectines met een lage DM. Lage DM pectines gaan een interactie aan met TLR2 door elektrostatische interacties tussen negatief geladen niet-veresterde galacturonzuren en positief geladen aminozuren van TLR2. De anti-inflammatoire effecten van lage DM pectines waren ook gevonden *in vitro* in TLR2-geactiveerde dendritische cellen en macrofagen en *in vivo* in TLR-2 afhankelijke mucositis in muizen. Mucositis was voorkomen door toediening van pectines en anti-inflammatoire effecten waren onafhankelijk van SCFA productie. Onze bevindingen laten zien dat pectines met een lage DM een sterk anti-inflammatoire effect hebben door inhibitie van TLR2-1 signalering. Dit suggereert dat een hoog percentage van niet-veresterde galacturonzuren de inhiberende effecten van pectines op TLR2-1 signalering vergroten.

Daarnaast onderzochten we in **Hoofdstuk 3** of de distributie van methyl-esters in pectines met een verschillende DM een invloed uitoefenen op de impact van pectines op TLR signalering. Twee sinaasappel en twee limoen pectines met een laag en hoge DM werden getest op activerende en inhiberende effecten op TLR2, TLR2-1, TLR2-6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, en TLR9. De pectines activeerden de verschillende TLRs minimaal. De sinaasappel en limoen pectines met dezelfde hoge DM (~DM60) inhibeerden TLR2-1 echter op een verschillend niveau, terwijl sinaasappel en limoen pectines met een lage DM (~DM30) een zelfde niveau van TLR2-1 inhibitie induceren. Van de hoge DM pectines inhibeerde de

Addendum

sinaasappel pectine TLR2-1 sterker dan de limoen pectine, wat gerelateerd kon zijn aan de hoge DB van de sinaasappel pectine. Om dit DB-afhankelijke effect verder te onderzoeken zijn daarom pectines in drie categorieën van DM getest met elk een laag en hoog DB op TLR2-1 inhiberende eigenschappen. We vonden dat lage DM pectines (~DM19) met een laag en hoge DB of intermediair DM pectines (~DM46) met een hoge DB TLR2-1 sterk inhiberen, terwijl intermediair DM pectines met een lage DB of hoge DM pectines (~DM86) beide met lage en hoge DB TLR2-1 zo sterk inhibeerden. Deze pectine structuren met een sterk TLR2-1 inhiberende eigenschappen waren ook erg effectief in de binding van TLR2. Verder konden deze pectine structuren TLR2 geïnduceerde IL-6 secretie van macrofagen remmen, wat suggereert dat de pectine structuren met TLR2-1 inhiberende eigenschappen anti-inflammatoire effecten kunnen induceren op immuun cellen dat is gemedieerd door de binding van de pectines aan TLR2. Samengevat laten deze studies zien dat pectines met een hoog percentage van bloksgewijs gedistribueerde niet-veresterde galacturonzuur residuen de anti-inflammatoire effecten op TLR2-1 induceren, terwijl pectines met een laag percentage of een meer gerandomiseerde distributie van niet veresterde galacturonzuur residuen in pectines deze effecten minder induceren.

Vervolgens is in **Hoofdstuk 4** onderzocht of de anti-inflammatoire effecten van pectine structuren op TLR2, zoals gemeten *in vitro*, kunnen worden geëxtrapoleerd naar anti-inflammatoire effecten op TLR2 *in vivo*. Om dit te testen werd een muis model met doxorubicine geïnduceerde mucositis gebruikt dat een TLR2-gemedieerde ontsteking van de dunne darm is. Vier structureel verschillende pectines die verschilden in DM en DB werden getest. Van deze pectines waren drie pectines sterke TLR2-1 inhibitoren (twee lage DM pectines (~DM19) met beide een lage en hoge DB en één intermediair DM (~DM46) pectine met een hoge DB), terwijl één pectine een zwakke TLR2-1 inhibitor was (intermediair DM met een lage DB). Onze data laat zien dat pectines doxorubicine geïnduceerde apoptose en peritonitis voorkomen in een structuur-afhankelijke manier, terwijl de ontsteking van de darm was voorkomen door alle pectines. Deze bevindingen suggereren dat de sterke TLR2-1 inhiberende pectine structuren het meest efficiënt waren in het voorkomen van de ontwikkeling van doxorubicine geïnduceerde mucositis, terwijl de zwak TLR2-1 inhiberende pectine structuur een lager anti-inflammatoir effect laat zien.

Aangezien de DM en DB van pectines anti-inflammatoire effecten induceren door directe interacties met intestinale immuniteit, hebben we in de opvolgende hoofdstukken onderzocht hoe deze structurele eigenschappen de gastro-intestinale immuun barrière beïnvloeden door microbiota afhankelijke effecten. In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht hoe toediening van verschillende pectine structuren de microbiota-immune interactie kunnen beïnvloeden onder gezonde condities. We dienden aan gezonde muizen voor 1 tot 4 weken de

pectine structuren toe die waren getest in muizen met doxorubicine geïnduceerde mucositis. Van deze muizen bepaalden we de T cel frequenties in de milt en mesenteriale lymfe knopen. Daarnaast hebben we de microbiota compositie in het caecum, SCFA compositie, en aanwezigheid van Aryl-hydrogen receptor (Ahr) activerende componenten gemeten om te bepalen welke microbiota afkomstige producten verantwoordelijk zijn voor de effecten op T cel immuniteit. De data laat zien dat pectine toediening geen veranderingen induceerde in T cel frequenties in de milt. Echter zorgt toediening van DM19 (hoge DB) pectine en beide intermediair DM pectines (~DM46; lage en hoge DB) voor enkel één week voor een toename in de frequenties van Th1, Th2 en Roryt⁺ regulatoire T cellen in mesenteriale lymfe knopen, terwijl DM18 (lage DB) dit effect niet induceerden. Na vier weken reduceren deze pectine structuren de Th1 en Th2 frequenties, terwijl Roryt⁺ regulatoire T cellen hoog blijven. Deze effecten werden echter niet geobserveerd bij toediening van de DM18 (lage DB) pectine. Dit kan worden verklaard door pectine afhankelijke verschillen in veranderingen van microbiota compositie dat verschillend was voor de DM18 (lage DB) pectine in vergelijking met de andere pectine structuren. Pectine geïnduceerde Th1 en Th2 frequenties waren gecorreleerd aan een toename in *Lachnoclostridium*, en de toename in Roryt⁺ regulatoire T cellen correleerde aan *Lachnospiraceae* NK4A136 en *Ruminococcaceae* UCG-003. De T cel stimulerende effecten waren niet afkomstig van SCFA, maar eerder door een toename in Ahr-activerende componenten in de digesta van het caecum van muizen waar DM19 (hoge DB), DM43 (lage DB) en DM43 (hoge DB) aan toegediend was. Samengevat laat deze studie zien dat pectines de microbiota-T cel interactie beïnvloeden op een DM en DB afhankelijke manier.

Aangezien de DM en DB van pectine anti-inflammatoire effecten induceren door directe interacties met het intestinale immuunsysteem en microbiota-immune interacties beïnvloeden, hebben we vervolgens onderzocht of deze structurele eigenschappen van pectines anti-inflammatoire effecten kunnen uitoefenen tijdens pathogene infectie door invloed uit te oefenen op de microbiota. Een infectie met het enterische pathogeen *Citrobacter rodentium* was gebruikt om microbiota afhankelijke effecten te bestuderen van pectines, aangezien dit pathogeen specifiek veranderingen in de microbiota compositie induceert in het caecum en colon van muizen. Hier bindt het pathogeen aan epitheelcellen waarna het veel ontsteking induceert. Allereerst hebben we in **Hoofdstuk 6** door middel van *in vitro* studies bestudeerd hoe de structurele verschillende pectine structuren beschermen tegen barrière disruptie van de epitheel laag door *C. rodentium*. Eén lage DM pectine (DM32) en twee hoge DM pectines (DM59 and DM64), met en respectievelijke lage en hoge DB, waren gebruikt om DM en DB afhankelijke effecten te meten. Onze studie heeft laten zien dat de drie pectines de *C. rodentium* geïnduceerde barrière disruptie verminderen door antimicrobiële effecten. De beschermende antimicrobiële effecten van de pectines waren onafhankelijk van de DM en DB, omdat alle pectines dezelfde beschermende effecten induceren. De antimicrobiële effecten

Addendum

werden gesuggereerd om specifiek plaats te vinden door middel van directe interactie tussen homogalacturonan pectines en *C. rodentium*, aangezien een er alleen binding was gemeten tussen pectines en *C. rodentium* en niet tussen pectines en *Lactobacillus plantarum* of *Escherichia coli*. Kortom, deze studie laat zien dat pectines blijken te beschermen tegen *C. rodentium* geïnduceerde disruptie van de epitheel laag door middel van antimicrobiële effecten op *C. rodentium*.

In **Hoofdstuk 7** was de anti-inflammatoire impact van de DB in hoge DM pectines onderzocht in muizen met *C. rodentium* geïnduceerde ontsteking van de dikke darm. Twee hoge DM pectines (DM59 en DM64) die verschilden in DB werden gebruikt in de huidige studie. Deze studie laat zien dat beide pectines de ontsteking van *C. rodentium* geïnduceerde colitis voorkomen door te beschermen van *C. rodentium* geïnduceerde disruptie van het epitheel, darm schade en ontsteking. De pectines induceerden een relatief gelijke verandering in microbiota compositie, wat suggereert dat het verschil in DB van pectines geen verschil induceert in de microbiota compositie in het caecum in de muizen. Verder waren de beschermende effecten van pectines niet afkomstig van een toename in SCFAs in het caecum, maar eerder door een verlaging van bacteriële lading van *C. rodentium* in het caecum van pectine behandelde muizen. Deze bevindingen suggereren dat de distributie van methyl-esters niet de gunstige effecten van hoge DM pectines beïnvloeden op *C. rodentium* geïnduceerde colitis in muizen.

Ten slotte zijn in **Hoofdstuk 8** de resultaten in dit proefschrift bediscussieerd. Vanuit verschillende studies werd geïmpliceerd dat de directe interacties van pectines met het immuunsysteem met name plaatsvinden in de dunne darm, aangezien hier een dunne slijmlaag aanwezig is en een weinig overvloed van microbiota. Er werd gesuggereerd dat in de dikke darm microbiota afhankelijke effecten plaatsvinden, aangezien een dikke slijmlaag en de overvloed van microbiota soorten de directe interactie van pectines met het immuunsysteem voorkomen. Vanuit de bovengenoemde studies werd ook geconcludeerd dat het gradatie als de distributie van methyl-esters de directe effecten van homogalacturonan pectines op TLR2 en microbiota-immune interacties beïnvloeden. De DM en DB veranderen echter niet de anti-pathogene impact van homogalacturonan pectines op *C. rodentium*. Homogalacturonan pectines met een intermediair DM en een hoge DB zouden gebruikt kunnen worden voor toepassing in functionele voeding, aangezien deze pectine structuur de gastro-intestinale immune barrière beïnvloeden door zowel directe effecten als microbiota afhankelijke effecten. Uiteindelijk zou de kennis over anti-inflammatoire eigenschappen van pectines op het intestinale immuunsysteem de industrie kunnen helpen in het op maat maken van pectine formuleringen met anti-inflammatoire eigenschappen. Zulke formuleringen zouden gebruikt kunnen worden om de incidentie van immune-gerelateerde ziektes te verminderen in de Westerse wereld.

Dankwoord

Het is zover, mijn proefschrift is af! Het was onmogelijk om dit af te ronden zonder de hulp van mijn begeleiders, naaste collega's, vrienden en familie. Met dit dankwoord wil ik een poging doen om iedereen te bedanken voor hun hulp de afgelopen jaren.

Allereerst wil ik mijn begeleiders Paul de Vos en Marijke Faas bedanken. Ik ben bij jullie begonnen als master-student en later kwam ik bij jullie in de groep voor een PhD project. Zonder jullie hulp was mijn proefschrift niet geworden zoals het nu is.

Paul, alleerst bedankt voor al je input op mijn promotieonderzoek. Je gedrevenheid en enthousiasme voor onderzoek heeft me altijd geïnspireerd. Je was altijd razend snel in mijn manuscripten nakijken, ondanks de hoeveelheid manuscripten die naar jou in een week werden gestuurd. Daarnaast bood je ook veel mogelijkheden om internationale samenwerkingen aan te gaan en gaf je me de ruimte om mijn onderzoek zelf in te kunnen vullen. Dit laatste was ook hoe ik het liefst werkte. Ik stond ook versteld van je leuke nieuwe ideeën, zoals het huisvesten van giraffen in het CDP of een rondrit in een trabant door Berlijn. Bedankt voor alles de afgelopen jaren!

Marijke, je was tijdens mijn master ook al mijn mentor en vervolgens mijn copromotor. Ik heb je input op mijn onderzoek altijd erg gewaardeerd. Je kon altijd een kritische blik werpen op mijn studies op de maandagochtend en input geven waar weinig mensen nog over hadden nagedacht. Daarnaast was je ook altijd erg geïnteresseerd in de volgende stap van mijn carrière en was jij degene die mij attendeerde op de advertentie voor mijn huidige postdoc. Bedankt voor alles!

Ik zou ook graag Henk Schols en Éva Jermendi willen bedanken voor de prettige samenwerking de afgelopen jaren. **Henk**, jouw enthousiasme en kennis over pectines hebben me altijd erg geïnspireerd. Bedankt voor je scherpe blik, je hulp, en je betrokkenheid bij het project de afgelopen jaren. **Éva**, I was happy to work with you over the last years on the pectin project. You are a very nice and joyful person. It was always great to come to Wageningen, because you always treated us to a fantastic lunch or vegetables from your own garden. I enjoyed talking with you about our common interests such as sports or traveling. Good luck with finishing your PhD and I hope we will stay in touch.

I also would like to thank the **assessment committee**, Prof. dr. H.J. Wichers, Prof. dr. Stefan Drusch and Prof. dr. Lubbert Dijkhuizen for reading and assessing my thesis.

Verder wil ik ook graag alle CCC partners, **Marco, Erik, Geert, Bianca, Els, Eelke, Elaine, Arjen, Janneke, Lubbert, Gert-Jan, Gert, Yang, Saskia, Walter, Lizette, Hans, Mirthe, Dirk-jan, Ellen, Emanuel, Ellen, Ran, Barbara, Gerben, Mara, Madelon, Melanie, Guido** en **Erwin** bedanken voor de samenwerking. Het was een leuke ervaring om de verschillende fabrieken en onderzoekscentra te mogen bezoeken. **Madelon**, bedankt voor je hulp bij de microbiota analyse wat zeker onmisbaar was. Samen met Renate en Éva maakten we het altijd erg gezellig tijdens de Carbokinetics meetings de afgelopen jaren.

I also had the opportunity to work with Samira Prado from the University of Sao Paulo, Brazil and with Keita Ishisono and Kohji Kutigachi from the Gifu University, Japan. **Samira**, it was great to work with you in the lab. Good luck with your postdoc at Örebro University! **Keita**, thank you for helping me in the lab on studies with *C. rodentium* and pectins. It was great to work with you. Good luck with your future career! **Kohji**, it was great to collaborate with you on several projects. Thank you for the all your advice and input on the research which taught me a lot.

Veel dank aan mijn collega's van de **Immunoendocrinologie: Bart, Sandra, Marlies, Chunli, Jolanda, Taco, Cheng Cheng, Gea, Erika, Yu, Tamara, Marjolein, Lianghui, Shuxian, Cynthia, Tian, Susana, Carlos, Alexia, Yifeng, Alberto, Luis, Renate, Anne, Yuanrui, Karlijn, Rei, Lieske** en **Tom** voor jullie inspanningen die hebben bijgedragen aan dit proefschrift. **Bart**, bedankt voor alle tips in het lab en voor fietsroutes in de provincie. Je input was altijd welkom. **Sandra**, je was al in de groep toen ik student was en hebt het hele traject meegemaakt. Jullie zijn beide de harde kern van de immunoendocrinologie. Bedankt voor afgelopen jaren. **Marlies**, bedankt voor alle hulp voor de proefdierstudies en de leuke BBQs bij jou thuis. **Marjolein** en **Taco**, ik wil jullie erg bedanken voor alle hulp bij het uitvoeren van de dierstudies. Dit was een onmogelijke taak zonder jullie hulp. **Lianghui**, thank you for the nice discussions and talks in the ML2. I enjoyed working with you over the years. Good luck with your postdoc at the Huazhong University! **Chunli**, thank you for helping me out with giving oral gavage to mice during some weekends. I enjoyed working with you on several projects over the last years. It was also a very nice time at

Addendum

the conference in Brisbane. Most of all, I enjoyed the delicious hot pot you cooked. Good luck with your future career and I hope we will meet again. **Yu**, it was great to meet such a hardworking and independent person as you. I will remember you as a nice colleague and wish you all the best. **Lieske**, eerst als student en later als collega was het erg leuk om met je te werken. Uiteindelijk was jij het die mij leerde om de milt en lymfeklieren te crushen! Bedankt voor de mooie momenten aan het eind van mijn PhD! **Chengcheng**, thank you for always being prepared to help me in the lab. The many gifts I got from you often remembered me of the many talks we had about Chinese culture or about your passion for cheese. It was great to have you as a colleague and I wish you all the best for your postdoc in Heidelberg. **Alexia**, it were rememberable times in the lab. You (you and you) brought my French vocabulary to the next level, and we felt never ashamed to sing along with the radio in the ML2. Together with **Roderick** we had fun times in the lab! **Gea**, bedankt voor alle hulp tijdens de start van mijn PhD. Het is altijd fijn om op iemand terug te kunnen vallen in het begin van je PhD. **Cynthia**, lo pruebo en español. Nunca conocí a una persona que trabaja tan dura como tú. Las últimas horas en el trabajo a menudo resultaban en cenar juntos en el restaurant de UMCG (también porque éramos demasiados perezosos para cocinar). Me ensenas mucho de la cultura de México. También practicamos hablar en español juntos que mejoró mi español. Realmente disfruté tenerte como colega y espero que nos volvamos a ver. **Shuxian**, it was great to have somebody else in the lab working on pectins. I enjoyed working with you on several project. **Erika**, we only met at the end of my PhD, but that was already enough to see how much passion you have for science. I really enjoyed that funny game we played at your place with all the PhD students. **Carlos**, thank you for the good times in the office. You're a fun, hard working person with a high sense of responsibility. **Luis**, thank you for being such a helpful colleague in the office. We often had nice discussions about science which made me aware of how passionate you are about science. It was nice to sit next to you in the office and I wish you the best in the future. **Yuanrui**, thank you for the different tips on animals experiments, nice chats and for being such a funny person. I hope you still enjoy to swim in the ocean of knowledge. **Tamara** and **Susana**, thank you for giving me a warm welcome to the group and office. Tamara, I really enjoyed all the fun moments, our talks about politics, our career paths and life. I was happy to meet you and I wish you all the best with your faculty position in Chile! Susana, I was glad to work with you in the same office over the years. We had a lot of fun moments, nice

chats and good dinners together. I will never forget how you and Edwin directly invited me over after Mirjam had just left to Ghent for the first weeks. We will celebrate our PhD degrees over a sip of wine! **Tom**, we gaan al een aantal jaren terug. Ik vond het mooi om te zien hoe gedreven jij bent en jij je doelen weet te bereiken. Bedankt voor alle momenten afgelopen jaren. **Anne**, bedankt voor al je hulp in het lab en het CDP, de borrels en natuurlijk de sushi. De koffiemomenten met jullie beide (met overgebleven taart) waren onmisbaar afgelopen jaren. **Neha**, it started all after an internship with you. Thank you for all your advice and teaching.

Tijdens mijn project heb ik ook de mogelijkheid gehad om studenten te begeleiden. **Jolien** en **Gijs**, bedankt voor jullie gedrevenheid en jullie bijdrage aan dit proefschrift.

Ik wil ook graag alle collega's van de Pathologie & Medische Biologie bedanken. In het bijzonder, **Jelleke**, **Theo Borghuis**, **Anita Niemarkt**, **Timara**, **Rianne**, **Julian**, **Daniela**, **Wendy**, **Geert**, **Qing**, **Dennis**, **Hataitip**, **Roderick**, **Henk**, **Josée** en **Matthijs**. Ook wil ik **Petra**, **Carolien**, **Johanna** bedanken voor de hulp bij het regelen van allerlei administratieve zaken. **Hans**, ook jou wil ik speciaal bedanken voor je hulp wat betreft financiële zaken de afgelopen jaren.

Ook wil ik hier graag iedereen van het CDP bedanken voor jullie hulp. Met name **Daryll**, **Michel** en **Annemarie** wil ik bedanken bij de opleiding in van vele handelingen en de hulp bij het opzetten van de dierstudies. Het valt niet mee om dierstudies op te zetten en zonder jullie hulp was het niet zo vlekkeloos gelopen.

I also would like to extend my gratitude to the **Virology and Immunology** group of the UMCG for the warm welcome.

Roy, vanaf de middelbare school zaten we al bij elkaar in de klas, toen studeerden we samen tijdens de bachelor, pre-master en master. En vervolgens ook nog een PhD op dezelfde afdeling Pathologie en Medische Biologie. Ik heb deze tijd altijd als gezellig ervaren en het was altijd mooi om met jou samen te werken! Het was ook fantastisch om jou en Marloes op te zoeken in Sydney!

Marloes Heemstra, ook wij kennen elkaar al weer vanaf de Hanze. Bedankt voor alle gezelligheid de afgelopen jaren.

Addendum

Virinchi, it was great having you in the office. I enjoyed canoeing in Giethoorn with you and it was great to visiting you in Australia. Good luck with your postdoc at Harvard University!

Ook wil ik graag **Anne & Marco, Laura & Jorian, Joes & Vincent, Eva, Floor & Kevin, Iris & Roel** en **Maarten** bedanken voor de afleiding tijdens de weekendjes weg, diner avond en spelletjes avonden. In het begin spraken we soms wel twee keer per week af om samen te eten en tot late uurtjes spelletjes te doen.

Beste **Wim & Kirsten, Marthijn & Karin** en **Richard & Harriëtte** bedankt voor alle mooie momenten afgelopen jaren! Oud & nieuw, bevrijdingsfestival en koningsdag is elk jaar een succes! Het is prettig om terug te kunnen vallen op vrienden zoals jullie!

Renate, we begonnen tegelijk aan het avontuur en we konden het goed met elkaar vinden tijdens onze PhD! Het was prettig om met iemand op te trekken die in dezelfde fase zit en dezelfde nuchtere blik heeft op situaties. De vele ritjes door het hele land voor de CCC, de stops bij Macdonalds, de koffiepauzes en de congressen in Madrid en Brisbane waren altijd een groot succes! Verder kunnen we ook goed samenwerken waar ik in mijn huidige baan weer op kan terugvallen! Ik ben daarom ook blij dat je mijn paranimf bent!

Hendrik, bedankt voor alle momenten afgelopen jaren. Ons wetenschappelijk interesse begon al bij met de petflesraket tijdens natuurkunde en dat bleef tot tijdens tot ons promotieonderzoek. Je brede interesse heeft me altijd erg geïnspireerd en gemotiveerd om nieuwe dingen op te pakken. Geregeld pakken we de racefiets, gaan we bierbrouwen of houden we spelletjes avonden met ons vieren. Ik ben ook blij dat je naast me zult staan als paranimf tijdens mijn verdediging. **Valentina** ook jij erg bedankt voor alle mooie momenten afgelopen jaren. Jullie vriendschap geeft me altijd veel energie!

Graag wil ik iedereen van de **Familie Bouman** en **Beukema** bedanken voor jullie oprechte interesse en betrokkenheid de afgelopen jaren! **Oma**, na 25 jaar 'studeren', kan ik nu wel zeggen dat het klaar is.

Janny, Bram, Floor en Luuk, bedankt voor alle leuke momenten afgelopen jaren. De vele weekendjes weg en wintersport in Oostenrijk waren altijd een succes. **Janny**, je bent altijd erg betrokken en zorgzaam voor ons. Bedankt dat we altijd bij je terecht kunnen. **Bram en Floor**, ik heb bewondering voor hoe gedreven jullie zijn in jullie werk en hobbies. Niks is leuker dan samen met jullie risk te doen of samen de berg af te skiën. Verder hebben we veel aan elkaar gehad de afgelopen tijd. De leegte die **Hilbrand** achterlaat is niet met woorden te vullen, maar de steun aan elkaar houdt ons wel overeind.

Yvonne, Rolf, Bjorn & Damon en Margot & Han, bedankt voor jullie support, bbq's, etentjes, weekendjes weg en andere afleidingen de afgelopen jaren. Het is fijn dat ik altijd bij jullie kan aankloppen voor een kopje koffie of een borrel. **Yvonne**, ik ken niet iemand die zo veel doorzettingsvermogen en empathisch vermogen heeft als jij. Ik heb enorm veel bewondering hoe jij de dingen aanpakt. **Margot**, jou nuchtere humor houdt me altijd op de been.

Pap en Mam, dit boekje draag ik op aan jullie. Jullie hebben mij altijd gestimuleerd en gesteund wat ervoor heeft gezorgd dat ik ben gekomen waar ik nu ben. Jullie doorzettingsvermogen, zorgzaamheid en brede interesse zijn een ware bron van inspiratie voor mij! Bedankt voor alles afgelopen jaren!

Lieve **Mirjam**, ik kan je niet genoeg bedanken voor wat je altijd voor me doet. Zonder jou waren de afgelopen jaren niet een succes geweest. Ik ben trots op hoe jij het avontuur aangaat, waarin je op de proef wordt gesteld, maar je daar altijd succesvol uit komt. Met name de afgelopen jaren waren niet altijd makkelijk, maar jij wist je er wel doorheen te slaan. Jouw humor, begrip, liefde en steun is precies wat ik nodig heb. Bedankt dat je er altijd voor me bent en ik kijk uit naar nog vele avonturen en mooie momenten samen!

Curriculum Vitae

The author of this thesis, Martin Beukema, was born on the 4th of December 1991 in Assen, the Netherlands. He completed his secondary school education at Vincent van Gogh in 2009 (Assen). In September of the same year, he started with the Study Biology and Medical Laboratory Techniques at the Hanze Hogeschool in Groningen. During his bachelor, Martin performed two research projects. At the Department of Immunology in Swansea, Wales under the supervision of Prof. dr. Catherine Thornton he investigated the role of glucose metabolism in the placenta of obese women. Then he started a project at the Pediatrics Department of the University Medical Center Groningen (UMCG) under the supervision of dr. Janine Kruit and ing. Niels Mulder in which he worked on the impact of microRNAs on type 2 diabetes. He obtained his bachelor's degree in 2013 and directly started a pre-master Biomedical Sciences at the University of Groningen. After this in 2014, he started the master Biomedical Sciences at the University of Groningen and performed two research projects. At the Department of Pathology and Medical Biology in the UMCG, he worked under the supervision of dr. Neha Sahasrabudhe and dr. Marijke Faas on a project investigating the anti-inflammatory role of pectins in doxorubicin-induced mucositis. Then, he started a project investigating the electrochemical properties of *F. prausnitzii* in a microbial fuel cell at the Department of Medical Microbiology and Infection prevention of the UMCG under the supervision of dr. Hermie Harmen and dr. Mehi Sadghian. In 2016, he received his master diploma and started subsequently as PhD student under the supervision of Prof. dr. Paul de Vos and dr. Marijke Faas at the Pathology and Medical Biology Department of the UMCG. This research resulted in the thesis on the structure-function relationship between homogalacturonan pectins and intestinal immunity. This PhD project was performed in collaboration with Éva Jermendi and Prof. dr. Henk Schols of the Laboratory of Food Chemistry of Wageningen University and Research and part of the Carbokinetics consortium of the Carbohydrate Competence Center. After his PhD, he started a postdoc in the group of Prof. dr. Anke Huckriede at the department of Medical Microbiology and Infection Prevention of the UMCG.

Publication List

- 2021 **M. Beukema**, R. Akkerman, É. Jermendi, T. Koster, A. Laskewitz, H. A. Schols, M. M. Faas, P. de Vos, Anti-inflammatory properties of pectins in mice with *C. rodentium*-induced colitis, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2100346
- 2021 R. Akkerman¹, M. J. Logtenberg¹, **M. Beukema**, B. J. de Haan, M. M. Faas, E. G. Zoetendal, H. A. Schols, P. de Vos, Chicory inulin enhances fermentation of 2'-fucosyllactose by infant fecal microbiota and differentially influences immature dendritic cell and T-cell cytokine responses under normal and Th2- polarizing conditions, *Food and Function*
- 2021 S. Figueroa-Lozano, R. Akkerman, **M. Beukema**, S. van Leeuwen, L. Dijkhuizen, P. de Vos, 2'-Fucosyllactose impacts the expression of mucus-related genes in goblet cells and maintains barrier function of gut epithelial cells, *Journal of Functional Foods*, 85, 104630
- 2021 C. Kong, **M. Beukema**, M. Wang, B. J. de Haan, P. de Vos, Human milk oligosaccharides and non-digestible carbohydrates prevent adhesion of specific pathogens via modulating glycosylation or inflammatory genes in intestinal epithelial cells, *Food and Function*, 12, 8100-8119
- 2021 **M. Beukema**, É. Jermendi, T. Koster, K. Kitaguchi, B. J. de Haan, M. A. van den Berg, M. M. Faas, H. A. Schols, P. de Vos, Attenuation of doxorubicin-induced small intestinal mucositis by pectins is dependent on pectin's methyl ester number and distribution, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2100222
- 2021 **M. Beukema**, K. Ishisono, J. de Waard, M. M. Faas, P. de Vos, K. Kitaguchi, Pectin limits epithelial barrier disruption by *Citrobacter rodentium* through antimicrobial effects, *Food and Function*, 12, 881-891
- 2021 **M. Beukema**, É. Jermendi, M. A. van den Berg, M. M. Faas, H. A. Schols, P. de Vos, The impact of the level and distribution of methyl-esters of pectins on TLR2-1 dependent anti-inflammatory responses, *Carbohydrate Polymers*, 251, 117093

-
- 2021 S. Hu, R. Kuwabara, C. Navaro Chica, A. M. Smink, J. D. Medina, T. Koster, B. J. de Haan, **M. Beukema**, J. R. Lakey, A. J. García, P. de Vos, Toll-like Receptor 2-modulating pectin-polymers in alginate-based microcapsules attenuate immune responses and support islet-xenograft survival, *Biomaterials*, 266, 120460
- 2021 S. Hu, R. Kuwabara, **M. Beukema**, M. Ferrari, B. J. de Haan, M. T. C. Walvoort, P. de Vos, A. M. Smink, Low methyl-esterified pectin protects pancreatic β -cells against diabetes-induced oxidative and inflammatory stress via galectin-3, *Carbohydrate Polymers*, 249, 116803
- 2020 **M. Beukema**, É. Jermendi, H. A. Schols, P. de Vos, The influence of calcium on pectin's impact on TLR2 signaling, *Food & Function*, 11, 7427-7432
- 2020 **M. Beukema**, M. M. Faas, P. de Vos, The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via microbiota and direct effects on immune cells, *Experimental and Molecular Medicine*, 52, 1364-1376
- 2020 S. B. R Prado, **M. Beukema**, É. Jermendi, H. A. Schols, P. de Vos, J. P. Fabi, pectin interaction with immune receptors is modulated by ripening process in papayas, *Scientific Reports*, 10,1-10
- 2018 N.M. Sahasrabudhe, **M. Beukema**, L. Tian, B. Troost, J. Scholte, E. Bruininx, G. Bruggeman, M.A. van den Berg, A. Scheurink, H.A. Schols, M.M. Faas, P. de Vos, Dietary fiber pectin directly blocks Toll-Like Receptor 2-1 and prevents doxorubicin-induced ileitis, *Frontiers in Immunology*, 383

Publications in preparation

C. Kong, R. Akkerman, C. E. Klostermann, **M. Beukema**, M. P. Oerlemans, H. A. Schols, and P. de Vos, Distinct fermentation of human milk oligosaccharides 3-FL and LNT2 and GOS/inulin by infant gut microbiota and impact on adhesion of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to gut epithelial cells, under revision at *Food and Function*

É. Jermendi, **M. Beukema**, M. A. van den Berg, P. de Vos, H. A. Schols, Revealing methyl-esterification patterns of pectins by enzymatic fingerprinting: beyond the degree of blockiness, under revision at *Carbohydrate Polymers*

M. Beukema, É. Jermendi, M. P. Oerlemans, M. J. Logtenberg, R. Akkerman, R. An, M. A. van den Berg, E. G. Zoetendal, T. Koster, C. Kong, M. M. Faas, H. A. Schols, P. de Vos, The level and distribution of methyl-esters determine the impact of pectin on intestinal T cell immunity, microbiota composition, short-chain fatty acid production and aryl-hydrocarbon receptor activation in healthy mice

R. Akkerman¹, M. J. Logtenberg¹, **M. Beukema**, B. J. de Haan, M. M. Faas, E. G. Zoetendal, H. A. Schols, P. de Vos, Combining and galacto-oligosaccharides alters their fermentation α -fucosyllactose kinetics by infant fecal microbiota during in vitro fermentation and influences AhR-receptor dependent cytokine responses in immature dendritic cells

É. Jermendi, **M. Beukema**, M. J. Logtenberg, P. de Vos, H. A. Schols, Effects of supplementing structurally different pectins on the fermentation patterns in mice

É. Jermendi, **M. Beukema**, P. de Vos, H. A. Schols, Tailoring pectins for their methyl-esterification patterns