
7.

Nederlandse samenvatting
Dankwoord
Curriculum Vitae
List of publications



SAMENVATTING

Sinds de ontdekking van *Mycobacterium tuberculosis*, de ziekteverwekker van tuberculose (TB), meer dan een eeuw geleden zijn er enorme inspanningen gedaan om TB terug te dringen en dit pathogeen te bestrijden; desondanks blijft TB echter een enorm wereldwijd volksgezondheidsprobleem. *M. tuberculosis* infecteert een derde van de wereldbevolking en ongeveer 5-10% van deze TB “patiënten” ontwikkelt actieve tuberculose. Behandeling van tuberculose wordt bemoeilijkt door het feit dat de bacillus ongevoelig is voor veel soorten antibiotica. Momenteel is de standaardbehandeling voor TB patiënten, bij niet-resistente *M. tuberculosis* stammen, een combinatie therapie met de eerstelijns TB middelen isoniazide, rifampin, pyrazinamide en ethambutol voor 4 maanden. Dit wordt gevolgd door een verdere behandeling met twee TB middelen gedurende 2 maanden. Hoewel deze zes maanden durende behandeling beschikbaar is, zorgt TB nog steeds wereldwijd voor ongeveer 1,5 miljoen doden per jaar. Daarom zijn innovatieve strategieën die doeltreffender TB kunnen bestrijden essentieel omdat onze huidige inspanningen deze ziekte te bestrijden tekortschieten. In dit verband zijn inzichten in de moleculaire mechanismen van de mycobacteriële cel envelop biogenese belangrijk voor het ontwerp van nieuwe TB drug therapieën omdat de cel envelop essentieel is voor het overleven, virulentie en pathogenese van *M. tuberculosis*. Uit intensief onderzoek van de afgelopen tientallen jaren blijkt dat de buitengewoon complexe cel envelop van *M. tuberculosis* een perifere polysaccharide kapsel laag bevat, die net als bij andere gekapselde bacteriën belangrijk kan zijn voor de bacteriële pathogenese. Daarom is dit kapsel een belangrijk target voor de ontwikkeling van immuno- en chemo-therapieën en de ontwikkeling van vaccins. Inderdaad, door de jaren heen zijn bij andere pathogenen soortgelijke strategieën gericht op bacteriële kapsel polysaccharides ontwikkeld. Vaccins op basis van kapsel polysaccharides van bacteriesoorten die dodelijke infecties bij de mens kunnen veroorzaken zoals: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* en *Streptococcus* groep B, zijn zeer effectief gebleken. Op dit moment zijn er echter beperkte gegevens beschikbaar over de kapsel polysaccharides van *M. tuberculosis*. Inzichten in de moleculaire mechanismen van de kapsel polysaccharide biosynthese zijn niet volledig en de polysaccharide bestanddelen zijn pas recent in detail gekarakteriseerd. In de afgelopen decennia bleek uit verschillende onderzoeken dat het kapsel van mycobacteriën uit drie glycopolymers bestaat, te weten α -glucan, arabinomannan en mannan, waarvan α -glucan de belangrijkste polysaccharide bestandsdeel vormt in *M. tuberculosis*. Hoewel kapsel α -glucan geassocieerd is met virulentie en immuun modulatie, ontbreken de inzichten over de exacte biosynthese routes, transport systemen, regulatie en de biologische functie van dit belangrijke glucopolymer. In dit werk, hebben we ons gericht op α -glucan en dit proefschrift beschrijft inzichten in verschillende ontbrekende facetten van het onderzoeksveld. Een van de meest beperkende factoren in het kapsel α -glucan onderzoek is het ontbreken van snelle α -glucan detectie technieken, die geschikt zijn voor verwerken van grote aantallen samples. Daarnaast ontbreken technieken die het mogelijk maken onbevooroordeeld genoom wijde mutant screenings op te zetten waarmee genen betrokken bij kapsel α -glucan biosynthese, transport

en regulatie geïdentificeerd kunnen worden. In hoofdstuk 2 beschrijven we nieuw ontwikkelde, op monoclonaal antilichaam (Mab) gebaseerde detectie technieken om deze beperking in het onderzoeksveld op te lossen en op deze manier het mycobacteriële kapsel polysaccharide-onderzoek te innoveren. Dit hoofdstuk beschrijft de epitooop karakterisatie van een Mab gericht tegen α -glucan en we beschrijven verschillende makkelijk uitvoerbare (semi-) kwantitatieve α -glucan detectie methodes. Met de ontwikkeling hiervan waren wij in staat genoom-brede screenings op te zetten door koppeling van de Mab-gebaseerde detectie technieken met grootschalige transposon mutagenese in verschillende mycobacteriële species. Vanuit dit kader hebben wij verschillende interessante kapsel α -glucan mutanten geïdentificeerd waarvan een aantal in detail zijn onderzocht in dit werk; deze zijn beschreven in hoofdstukken 4 en 5. Hoofdstuk 2 vormt de basis van dit proefschrift en de hierin beschreven technieken hebben de mogelijkheid gegeven verschillende aspecten te onderzoeken van kapsel α -glucan. In hoofdstuk 3 is het onderzoek weergegeven naar het ophelderen van de biosynthese routes van α -glucan. Door intensieve genetische manipulatie van genen betrokken bij α -glucan biosynthese te combineren met de α -glucan kwantificatiemethodes, waren wij in staat om tot een volledig beeld te komen hoe intra- en extracellulaire α -glucan's worden gesynthetiseerd in mycobacteriën. Ons onderzoek laat zien dat twee individuele routes TreS-Pep2 en GlgC-GlgA verantwoordelijk zijn voor de productie van het disaccharide maltose-1-P. Maltose-1-P wordt dan als bouwsteen gebruikt om via de enzymen GlgE en GlgB het complete glucopolymer α -glucan te synthetiseren. Met deze inzichten in de biosynthese routes waren we als eerste ter wereld in staat om α -glucan negatieve mutanten te creëren waarmee we de rol van dit glucopolymer konden bestuderen bij experimentele infecties in muizen om inzicht te verkrijgen in de bijdrage van α -glucan aan virulentie. In dit hoofdstuk hebben we beschreven dat α -glucan inderdaad een belangrijke rol heeft in de virulentie van *M. tuberculosis*. In hoofdstuk 4, geven we een diepteanalyse van een groep van mutanten in het ABC transport locus *pst*, die alle werden oppikt in de α -glucan Mab gebaseerde transposon screening. Het transport systeem Pst is belangrijk in de opname van anorganisch fosfaat en we laten zien dat deze mutanten het kapsel α -glucan massaal over produceren. In dit hoofdstuk beschrijven we dat anorganisch fosfaat stress een belangrijke trigger is voor het reguleren van kapsel α -glucan niveaus in mycobacteriën en onderzoeken we twee mogelijke stress response routes: het SigE regulon en de stringent response. We hebben ontdekt dat onder anorganische fosfaat stress de opregulatie van kapsel α -glucan afhankelijk is van transcriptiefactor SigE en niet van de stringent response. Onder een andere stress conditie, namelijk aminozuur stress, zorgt de stringent response wel voor de opregulatie van kapsel α -glucan productie. In dit hoofdstuk geven we ook een model hoe verschillende stress condities kunnen bijdragen aan een verhoogde kapsel α -glucan productie door deze twee stress response routes te activeren. In hoofdstuk 5, wordt een gedetailleerde studie weergegeven van een fascinerende transposon mutant, geïdentificeerd in de kapsel screen in *M. marinum*. Deze mutant heeft een transposon insertie in een gen van voorheen onbekende functie dat ortholoog is aan *M. tuberculosis* H37Rv *rv2179c*. Deze mutant in *M. marinum* is ernstig geattenuëerd *in vivo* in de zebravis. In

dit hoofdstuk beschrijven we dat gen *rv2179c* codeert voor een eiwit van de superfamilie DEDDh exonucleases. We beschrijven dat dit exonuclease in staat is specifiek polyA RNA-nucleotiden te hydrolyseren. Dit suggereert dat dit enzym polyA staarten van mRNA transcripten kan hydrolyseren en daarmee mogelijk de stabiliteit van mRNA reguleert. Daarnaast geven we een diepgaande analyse van de enzym activiteit inclusief de wijze van interactie met substraat en de nucleotide specificiteit. Aangezien we hebben ontdekt dat dit exonuclease specifiek polyA RNA hydrolyserende activiteit bezit, hebben we dit enzym geannoteerd als RNase AS (Adenosine Specifiek). De bevindingen van dit hoofdstuk suggereren dat RNase AS, en daarmee haar specifieke rol in RNA polyA staart hydrolyse essentieel is voor mycobacteriën *in vivo*. Ten slotte worden in hoofdstuk 6 de resultaten van de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift bediscussieerd in een bredere, coherente context. Samenvattend beschrijft dit proefschrift verschillende aspecten van het kapsel glucopolymer α -glucan en de nieuw verworven kennis vormt een platform voor verder onderzoek op het gebied van het kapsel polysaccharide α -glucan. Dit kan wellicht enerzijds leiden tot een nieuwe ingang om het transport systeem van α -glucan te identificeren. Anderzijds kan het wellicht een startpunt vormen voor de ontwikkeling van nieuwe TB regimes, gericht tegen α -glucan. Met dit werk hebben we nieuwe inzichten gekregen in de mycobacteriële kapsel polysaccharides die mogelijk bijdragen aan innovatieve strategieën om de enorme uitdaging van de TB pandemie aan te pakken.

DANKWOORD

Een lang gekoesterde droom van het promoveren gaat eindelijk in vervulling. Een pittige route die je op verschillende manieren uitdaagt op zowel wetenschappelijk alsmede het persoonlijk vlak, waarbij innovatieve adaptatie een dienende kracht is ter ontwikkeling van de geest en wetenschappelijke vooruitgang. Een pad waarbij de zoektocht der kennis je leidt via de fysische, metafysische en soms zelfs via psychische illusies naar de route van verlichting in je existentie. Het promoveren en het tot stand komen van dit proefschrift is het resultaat van een gigantische team prestatie van verschillende wetenschappers waarmee ik het genoegen heb gehad om mee samen te mogen werken en dierbare mensen, familie en vrienden, die me door dik en dun gesteund hebben en een platvorm hebben gecreëerd deze prestatie mogelijkheid te maken. Allereerst mijn grote dankbaarheid naar Ben Appelmelk, een echt grote en goede wetenschapper, die mij de kneepjes van dit mooie vak heeft bijgebracht. Jouw sturing in het PhD project en jouw gigantische kennis van de materie heeft mij veel gebracht en geleerd. Echt een voorbeeld hoe je je als wetenschapper kunt ontwikkelen. Het was daarom ook een eer om met jou te mogen samen werken en te mogen leren. Ik ben jouw laatste promovendus, de laatste der Mohikanen, en dat geeft natuurlijk wel wat druk om jouw imposante carrière goed en naar behoren af te sluiten en je trots te maken op dit laatste proefschrift, wat we samen afleveren. De route daar naartoe ging niet altijd over rozen en er waren ook pittige discussies van tijd tot tijd. Gewoon imposant hoe jij om kon gaan met mijn “lichtelijke” eigenwijsheid en mijn karakter en toch de rust kon bewaren om mij sturing te kunnen geven in het PhD project en als mens. Heeft me veel geleerd en geeft aan hoe groot en mooi jouw warme persoonlijkheid is, die je bezit als mens. Nu dit proefschrift is afgerond, is je laatste mission accomplished! En nu kun je dan eindelijk “echt” met pensioen en genieten van de andere mooie dingen die het leven te bieden heeft. Geniet ervan je hebt het dubbel en dwars verdiend! Ook gaat grote dank uit naar mijn copromotor Jeroen Geurtsen, de geestelijke vader van het capsule project. Ik werd aangenomen op jou (NWO) funding en jij was mijn supervisor voor de eerste jaren van mijn PhD traject. Met jouw sturing en inzichten heb ik de basis kunnen leggen voor de wetenschapper die ik nu ben geworden. Het was een buitengewoon mooie tijd zowel op wetenschappelijk alsmede persoonlijk vlak. Je hebt me een hoop geleerd en het was dan ook een waar genoegen om jou als supervisor te hebben. Een hoop van de afzonderlijke projecten die nu zijn uitgemond in mooie publicaties hebben we samen geïnitieerd. Jouw grote kennis, sturing en drive als wetenschapper hebben mij echt veel gebracht en heeft ook mede geleid tot dit mooie proefschrift. Na jouw vertrek op onze afdeling was het voor mij persoonlijk ff adapteren en moeilijk. Ik miste de dagelijkse discussies, de sparring sessies en toch ook wel een beetje de sturing en het overleg. Bovendien hadden we natuurlijk een set minder handjes in het mooie capsule project waardoor wel een aantal mooie sub-projecten zijn blijven liggen. Zoals elk nadeel ook zijn voordeel heeft, zijn de jaren nadat ik met jou heb mogen samenwerken een basis geweest voor mijn onafhankelijke ontwikkeling om het onderzoek te sturen. Ik heb een goed en groot voorbeeld gehad hoe ik dat moest doen en kon na jouw vertrek dit tot uitvoering brengen. Al was het soms met vallen

en opstaan, denk ik dat dit gelukt is en heb ik mij ook mede dankzij jou zo kunnen ontwikkelen in de wetenschap! Ook gaat mijn grote dank uit naar Wilbert Bitter, mijn promotor, een buiten-categorie wetenschapper waarbij jouw grote kennis, overzicht en goede begeleiding de puntjes op de befaamde i hebben gezet om mij de afgelopen jaren te ontwikkelen als onderzoeker. Bij jou werd ik echt uitgedaagd om mijn formuleringen beter te kiezen en mijn research naar een hoger plan te tillen. Het was dan ook een waar genoegen om te mogen samenwerken, te sparren en te leren van zo'n grote wetenschapper. Graag wil ik ook mijn promotor Christina Vandenbroucke-Grauls hartelijk bedanken voor alle input, discussies en sturing van mijn project. Dit heeft zeker geleid tot een hoger niveau en kwaliteit van het onderzoek. Ook gaat mijn grote dank uit naar Janneke Maaskant en Marion Sparrus, jullie waren het fundament van dit project en door jullie harde werk en gigantische inzet was het mogelijk om tot dit mooie eindresultaat te komen, waarop ik kan promoveren. Zonder jullie was dit proefschrift er niet geweest en had ik het niet gered. Dit is een fantastisch voorbeeld van super goed teamwork en ik denk dat jullie net zo trots mogen zijn als ik op deze prestatie! Astrid van de Sar wil ik natuurlijk ook hartelijk danken voor al jouw inzet, input en onze sparring sessies op wetenschappelijk gebied die mijn project ook tot een succes hebben gemaakt. Verder onze mooie en fijne sociaal gerelateerde gespreken en opbeurende woorden als ik er ff doorheen zat of liep te stuiten; jij was dan toch in staat mij andere invalshoeken te laten zien. Dat was erg fijn en ik heb daar veel aan gehad. Verder wil ik graag Gunny van der Brink en Theo Verboom bedanken voor de geweldige inzet bij het vissenwerk en jullie enthousiasme in deze projecten. Het was me een waar genoegen om met jullie te mogen samenwerken en van jullie te leren betreffende het vissen gebeuren. Roy Ummels wil ik graag bedanken voor al jouw inzet in mijn project en het mij bijbrengen/ leren van cloneringen; jij was altijd bereid mij te ondersteunen als ik vragen had en het was me een waar genoegen om jou als collega te hebben. Ook mijn grote dankbaarheid gaat uit naar Maikel Boot; toen jij op de afdeling kwam werd het echt een stuk gezelliger en jij bent uitgegroeid tot echt mijn makker/goede vriend for life. Buiten onze leuke feestjes en geweldige concerten/ festivals was jouw inzet, de sparrings sessies en wetenschappelijke inzichten in en buiten mijn project echt super en deze hebben mij ook veel geleerd. Ook op persoonlijk vlak heb jij een belangrijk aandeel gehad; zeker in mijn moeilijke tijden heb jij mij erdoor heen gesleept en dat waardeer ik enorm. Het is me dan ook een waar genoegen om met jou samen te werken en ik koester onze vriendschap. Ook jouw enthousiasme in de wetenschap is indrukwerkend en aanstekelijk. Ik zie jou als exceptionele wetenschapper die het erg ver gaat schoppen en ik wens je super veel succes met je eigen promotie en ben er van overtuigd dat jij binnen een aantal jaren na je promotie zelf een mooie groep gaat leiden. Jij bezit zeker alle ingrediënten om dat te kunnen. Lianne van Leeuwen jij ook super bedankt voor de gezelligheid, de mooie gespreken van de afgelopen jaren en jouw geweldige inzet, enthousiasme voor mijn project met het vissenwerk. Heel veel succes met het afronden van jouw promotie en met je nieuwe werk in Zuid-Afrika. Nanne Paauw jij super bedankt voor jouw fantastische inzet in mijn project en het bijbrengen van alles omtrent de elektronen microscopie. Verder zou ik graag ook de studenten Nadine de

Vries, Femke Brouwer, Maroeska Burggraaf en Ruben Lacroix willen bedanken voor hun buitengewone inzet en goede werk. Verder zou ik graag alle postdocs Jovanka Bestebroer, Edith Houben, Susanne Commandeur, Coen Kuijl, Alex Speer van de afdeling MMI en MolMic willen bedanken voor hun wetenschappelijke input. Louis Ates ook jou wil ik graag bedanken voor je inzet en goede discussie binnen en buiten mijn project en we hadden een wedstrijdje lopen wie er het eerst zou promoveren. Jij hebt me verslagen en jouw promotie was echt een voorbeeld. Ik wens jou veel succes met je nieuwe baan in Parijs. Verder wil ik ook alle OIO's, Vincent van Winden, Maroeska Burggraaf, Karlijn Bastiaanse, Kin'ki Jim en de reeds gepromoveerde myco-angels, Nicole Driessen, Esther Stoop, Evelien Weerdenburg, Maria Daleke en Aniek van der Woude van MMI en MolMic bedanken voor jullie gezelligheid en wetenschappelijke input. Wim Schouten jij ook super bedankt voor de gezellige tijd van de afgelopen jaren, de inzet en faciliterende werkzaamheden gedurende mijn PhD project. Was me een waar genoegen om jou als collega te mogen hebben. Marre van den Brand, Maysa Schepens, Evelien de Groot, Christel Gazenbeek, Martine Bos, Arnold Catsburg, Dries Budding en Linda Poort wil ik graag bedanken voor hun gezelligheid en wetenschappelijke input. Mede dankzij jullie heb ik mij echt thuis gevoeld op de afdeling en was het een geweldige tijd met jullie als collega's. Ook wil ik graag mijn internationale samenwerkingsverbanden/partners bedanken voor al hun input en de mooie resultaten die dat heeft opgeleverd. I like to thank Rainer Kalscheuer for the great and pleasant collaboration and scientific dedication in several projects over the years that resulted in very nice and brilliant work. It was a privilege to work together and learn from such a great scientist. Furthermore, I like to thank Steph Bornemann for his pleasant collaboration and scientific input. Next, I like to express my gratitude to Rita Berisio, Maria Romano, Alvaro Berbís and Jesus Jiménez-Barbero for their efforts and fantastic collaboration that resulted in the very nice published papers. Natuurlijk wil ik graag mijn familie en in het bijzonder mijn moeder, broertje, zus en mijn oom John Selinger bedanken voor het vertrouwen en ondersteuning die jullie gegeven hebben om mijn promotie tot een succes te maken; zonder deze onvoorwaardelijke toewijding en steun was het niet gelukt om dit proefschrift met succes af te ronden. Jill Cheryl van Diggele, jou wil ik ook bedanken voor alle gezellige momenten van de afgelopen jaren en vooral jouw onvoorwaardelijke steun, liefde en vertrouwen. Je hebt me in een van mijn moeilijkste periodes er echt door heen gesleept en de kracht gegeven weer verder te gaan, je bent een topper! Als laatste zou ik graag mijn vrienden en vriendinnen wil bedanken voor hun support en steun en uiteraard de gezelligheid over de jaren. Dit heeft zeker een grote bijdrage geleverd om mijn PhD thesis met succes te voltooien. Dankzij jullie onvoorwaardelijke steun en vertrouwen is er een mooi werk tot stand gekomen waar we allen trots op mogen zijn. Super bedankt allemaal voor de bijdragen die jullie geleverd hebben binnen en buiten mijn promotie traject.

CURRICULUM VITAE

Robert van de Weerd was born on September 6 1972 in Apeldoorn, the Netherlands. After finishing his high school (VWO) at the Apeldoorns College in Apeldoorn, he started his study in Physics at the VU University in Amsterdam in 1994 and subsequently his study in Chemistry (also at VU) in 1995. After working for a couple of years in fields not related to science, he restarted his study in Chemistry at the VU 2005 and graduated (BSc.) March 14, 2007. As part of the master studies in Chemistry (Biomolecular Sciences/ Pharmaceutical Sciences) he performed two main research projects as internships. (1) In the group of dr. Marco Siderius and prof. dr. Martine Smit at the Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences at the VU, where he studied the structure function relationship between mammalian cochaperone p50 and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc37. (2) In the group of dr. Irma van Die and dr. Boris Tefsen at the Department of Molecular Cell Biology and Immunology at the VU Medical Center in Amsterdam, where he launched his own research project and investigated complex-type glycans on human core histone proteins as novel epigenetic markers. His master thesis was written on the chaperone system HSP90 and co-chaperone Cdc37 and this enabled his graduation as a Master of Science on September 17, 2008. After graduation he was invited by dr. Irma van Die to work on two research projects, i.e. IgA nephropathy and Crohn's disease/ ulcerative colitis pathogenesis as a research technician. After this he started as a PhD student in the group of dr. Ben J. Appelmek and dr. Jeroen J. Geurtsen at the Department of Medical Microbiology and Infection Control at the VU University Medical Center. There, he studied the biosynthesis routes, transport mechanisms and virulence of the main capsular polysaccharide α -glucan of pathogenic mycobacteria until 2016, resulting in this thesis.

PUBLICATIONS

Robert van de Weerd*, M. Romano*, F.C.C. Brouwer, G.N. Roviello, R. Lacroix, M. Sparrius, G. van den Brink-van Stempvoort, J.J. Maaskant, A.M. van der Sar, B.J. Appelmelk, J. Geurtsen, R. Berisio. **Structure and function of RNase AS, a polyadenylate-specific exoribonuclease affecting mycobacterial virulence in vivo.** *Structure* (2014). **22**, 719-30.

Robert van de Weerd*, M. Alvaro*, J. Maaskant, M. Sparrius, N.J. Paauw, N. de Vries, J. Geurtsen, J.J. Barbero, B.J. Appelmelk. **A murine monoclonal antibody to glycogen: the use in mycobacterial capsular cell-surface research and characterization of epitope-fine specificity by using saturation difference transfer (STD) NMR.** *ChemBioChem* (2015). **10**, 977-989.

Robert van de Weerd, M. Boot, J. Maaskant, M. Sparrius, T. Verboom, L.M. van Leeuwen, M.J. Burggraaf, N.J. Paauw, E. Dainese, R. Manganelli, W. Bitter, B.J. Appelmelk and J. Geurtsen. **Inorganic phosphate limitation modulates capsular polysaccharide composition in mycobacteria.** *J. Biological Chemistry* (2016). Accepted for publication.

M. Boot, M. Sparrius, K. Jim, **Robert van de Weerd** and W. Bitter. **IniBAC induction is vitamin B12 and mutAB-dependent in *Mycobacterium marinum*.** Submitted.

H. Koliwer-Brandl*, K. Syson*, **Robert van de Weerd**, G. Chandra, B.J. Appelmelk, M. Alber, T.R. Ioerger, W.R. Jacobs Jr, J. Geurtsen, S. Bornemann and R. Kalscheuer. ***Mycobacterium tuberculosis* employs an intricate biosynthesis network to synthesize intra and extracellular α -glucans required for virulence.** Submitted.

E.M. Weerdenburg, R Ummels, **Robert van de Weerd**, S.A. Hassan, A. de Bruin, S. Bird, A.M. van der Sar, W. Bitter. **Characterization of *Mycobacterium marinum*-induced granulomas in zebrafish and the role of fatty acid and hypoxia in ESX-5-mediated hypervirulence.** PhD Thesis: Mycobacterial virulence – A delicate balance, (2014) **chapter 4**, ISBN 978-94-6182-400-4.

C.M.W. van Stijn, M. van den Broek, **Robert van de Weerd**, M. Visser, I. L. Tasdelen, B. Tefsen and I. van Die. **Regulation of expression and secretion of galectin-3 in human monocyte-derived dendritic cells.** *Molecular Immunology* (2009), **46**, 3292-3299.

L.S. Ates, R. Ummels, S. Commandeur, **Robert van de Weerd**, M. Sparrius, E.M. Weerdenburg, M. Alber, R. Kalscheuer, S.R. Piersma, A.M. Abdallah, A.M. Abdel-Haleem, A. Pain, C.R. Jiménez, W. Bitter and E.N.G. Houben. **Essential role of the ESX-5 secretion system in outer membrane permeability of pathogenic mycobacteria.** *PLOS Genetics* (2015), **11**, e1005190.

S. Carrère-Kremer, M. Blaise, V.K. Singh, L. Alibaud, E. Tuailon, I. Halloum, **Robert van de Weerd**, Y. Guérardel, M. Drancourt, H. Takiff, J. Geurtsen, and L. Kremer. **A new dehydratase conferring innate resistance to thiacetazone and intra-amoebal survival of *Mycobacterium smegmatis***. *Molecular Microbiology* (2015), **96**, 1085-1102.

L.S. Ates, A.D. van der Woude, J. Bestebroer, G. van Stempvoort, R.J.P. Musters, J.J. Garcia-Vallejo, D.I. Picavet, **Robert van de Weerd**, M. Maletta, C.P. Kuijl, N.N. van der Wel, W. Bitter. **The ESX-5 System of pathogenic mycobacteria is involved in capsule integrity and membrane rupture through its substrate PPE10**. Submitted.

Robert van de Weerd, G. van Stempvoort, E. Stoop, L.M. van Leeuwen, A.M. van der Sar, B.J. Appelmelk, S. Bornemann, R. Kalscheuer. **Methylglucolipopolysaccharides (MGLPs) are essential for development of early granuloma formation and virulence in *Mycobacterium marinum***. Manuscript in preparation.

Robert van de Weerd, B. Tefsen, M. van den Broek, J. Kooter, R. Hokke, M. Wuhler and I. van Die. **Human core histones are modified by complex-type glycans**. Manuscript in preparation.

* These authors contributed equally