UNIVERSITY OF AMSTERDAM

UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Setting the scale

The balance between complement factor H and its related proteins in health and disease

Pouw, R.B.

Publication date
2018
Document Version
Other version
License
Other

Link to publication

Citation for published version (APA):
Pouw, R. B. (2018). *Setting the scale: The balance between complement factor H and its related proteins in health and disease*. [Thesis, externally prepared, Universiteit van Amsterdam].

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

Disclaimer/Complaints regulations
If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: https://uba.uva.nl/en/contact, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (https://dare.uva.nl)

Download date:18 Nov 2026

A

Appendix

English summary
Nederlandse samenvatting
List of publications
Contributing authors
PhD portfolio
Curiculum vitae
Dankwoord

English summary

Setting the scale: the balance between complement factor H and its related proteins in health and disease

The human immune system comprises an innate and adaptive part. Adaptive immunity can react specifically and powerfully against pathogens that have been encountered before, while innate immunity responds against any, unknown, pathogen. Both are needed to protect the human body against infections. An essential part of innate immunity is the complement system. This system consists entirely of proteins that together form an activation cascade in our blood. The complement system is constantly active and in principle attacks everything that it comes into contact with. This is highly beneficial to attack any possible pathogen without first requiring it to be recognized as such. In that way, the complement system is a very fast and effective defense mechanism in human blood. However, because the complement system activates on everything it encounters, the system will also attack human cells. To prevent that this will lead to damage and immune reactions against human cells, several complement inhibitors are present. These are located on the surface of human cells, but are also circulating freely in human blood. One of the most important inhibitors of the complement system that circulates freely is a protein named complement factor H (FH).

Factor H protects human cells against complement by inhibiting the continuously activation of the system. This is achieved by binding complement component 3 (C3) when it auto-activates. In addition, FH binds to human cells once the activated part of C3, C3b, attaches to human cells. Next to FH, humans also have five other proteins in their blood that are very similar to FH, the FH-related (FHR) proteins. These FHRs lack the domains that, in FH, are responsible for the inhibition of the complement system. However, FHRs do have the same domains as FH that are involved in the binding to human cells. Thus, FHRs are thought to support instead of inhibiting the activation of the complement system by preventing FH to inhibit C3b. This could be an extra layer of regulation within the system. Inhibition of FH could for instance be beneficial in the clearance of dying human cells, which need to be cleared by the immune system.

There have been extensive studies into the function of the FHRs since their discovery. This has been hampered by their high similarity with FH and therefore lack of specific reagents (antibodies) to distinguish them from each other. This has also prevented establishing the concentrations of FHRs in human blood, in contrast to FH, which is one of the most abundant proteins in circulation. As there could be a competition between FH and the FHRs, it is important to know the ratio between these proteins.

In this thesis FH and two of the FHRs, FHR-3 and FHR-4A, were studied. To this end, new antibodies were characterized which were used to distinguish FH, FHR-3 and FHR-4A. With these new reagents the function of FH could be further studied and new assay were developed to determine the concentrations of FHR-3 and FHR-4A in blood. This has led to new insights in the biology of FH and the role of FHR-3 and FHR-4A within the complement system. In addition, these proteins were further studied in various diseases.

FH is essential for the protection of red blood cells

In **Chapter 2** we describe the characterization of 20 new antibodies generated against human FH. With the use of FH fragments the binding site of the antibodies could be determined. This was used to further study the function of FH when different domains are blocked with the antibodies. This has initially been tested using red blood cells of sheep. These cells are not intrinsically protected against human complement, causing the red blood cells to lyse once they are exposed to human complement. However, sheep red blood cells can bind human FH, which will prevent lysis to occur. This makes sheep red blood cells easy to use to study the function of human FH. Only when FH is fully functional, the sheep red blood cells stay intact. Blocking specific domains of FH with the antibodies prevented FH from protecting the sheep red blood cells. This was confirmed using human red blood cells. Human red blood cells do not lyse when they are in contact with human complement, thanks to the presence of complement regulators on their surface. It is, however, possible to measure C3b binding to the red blood cells as a result of complement activation. The blocking of FH with antibodies resulted in increased C3b binding to the red blood cells, despite the presence of several other complement inhibitors. This was unexpected, as it was thought that the other inhibitors would be sufficient to prevent complement activation to occur. Binding of C3b to red blood cells is harmful, as C3b bearing cells will be destroyed. This shows that FH has an essential role in the protection of red blood cells, despite the presence of other inhibitors.

FH can be improved

In **Chapter 3** we describe one antibody, of the 20 from **Chapter 2**, that showed a remarkable, different effect on FH function compared to the other antibodies. Most antibodies in **Chapter 2** inhibited the function of FH, while antibody number 7 (anti-FH.07) improved the function of FH. Anti-FH.07 lowered de complement activation in standard functional complement assays and increased the binding of FH to C3b. More importantly, anti-FH.07 restored the decreased function of FH in patients with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). People with aHUS have an imbalance in their complement system that leads to unwarranted activation causing damage and inflammatory reactions within the kidneys. This can lead to severe and life-threatening renal failure. In many cases mutations in FH cause the imbalance in the complement system. These mutations are heterozygous, affecting only one of the two FH genes. The mutated FH can no longer bind efficiently to human cells and which are thus

less well protected against complement. This is again tested using sheep red blood cells. As discussed before, sheep red blood cells rely on fully functional FH to protect them against human complement. When serum of aHUS patients is added to sheep red blood cells, lysis will occur due to the decreased protection caused by mutations in FH. Addition of anti-FH.07 to aHUS patient sera prevented lysis of the sheep red blood cells. Anti-FH.07 restored the balance in the complement system independent of the mutation in FH. Anti-FH.07 also restored the balance on human cells. By blocking a portion of FH, C3b binding will occur on human cells (**Chapter 2**). This was also prevented by anti-FH.07. It is still unknown whether anti-FH.07 also restores the mutated FH or whether anti-FH.07 only improves the function of the unmutated FH. Current therapies that are being used to prevent unwarranted complement activation on human cells, completely block parts of the complement system. This is highly effective in preventing damage to own cells, but at the same time exposes patients to an increased infection risk as they no longer have a working complement system anymore. We demonstrated this with eculizumab, a therapeutic antibody targeting complement component 5 (C5), which is required to directly kill bacteria. Bacteria survived in human serum in the presence of eculizumab, while they were easily killed by the complement system without eculizumab. Anti-FH.07 did not protect the bacteria. Addition of anti-FH.07 led to increased protection against complement of human cells, but not of bacteria. This is an important and unique property of anti-FH.07 over other therapeutic strategies and it is thus likely much safer than the current therapies; treatment with anti-FH.07 would not induce an increased risk of infection.

The presence of FHR-3 is relatively low in blood

In **Chapter 4** we describe new antibodies generated against FHR-3. With these antibodies the first FHR-3 specific assay was developed to determine the FHR-3 concentration in blood. FHR-3 is not present in all donors. About 4% of the Western population does not have any genes coding for FHR-3 and is thus deficient. About 20% of the Western population has only one FHR-3 gene, and is thus heterozygous for FHR-3. This was confirmed with the new assay. Deficient donors did not have any measurable FHR-3, while heterozygous donors had about half of the levels of FHR-3 in their blood compared to 'normal' donors with two FHR-3 genes. Remarkable was the very low concentration of FHR-3. Earlier estimations of the FHR-3 concentration claimed concentrations equal or close to that of FH. However, our new measurement showed an average FHR-3 concentration that was about 140-fold lower compared to FH. It is likely that the earlier estimations were made based on a-specific antibodies which led to an overestimation of FHR-3 levels. The in comparison very low FHR-3 levels make it unlikely that any physiologically relevant competition with the much more abundant FH takes places in blood.

FHR-4A is the dominant protein of the FHR-4 gene

In Chapter 5 we describe thirteen new antibodies directed against FHR-4A. FHR-4A is one of the two proteins of the FHR-4 gene. The other protein is FHR-4B. All domains of FHR-4B are also present in FHR-4A, making it impossible to distinguish FHR-4B from FHR-4A. However, FHR-4A has extra, unique domains making it possible to distinguish FHR-4A, if there are antibodies against these unique domains. Of the thirteen antibodies against FHR-4A, six antibodies were found to be directed against these unique domains in FHR-4A. The other antibodies also bound FHR-4B or even other FHR proteins. The binding site of each of the antibodies was determined using fragments of FHR-4A. Using the specific antibodies against FHR-4A, a new FHR-4A assay was developed. Similar to FHR-3, the FHR-4A concentration was found to be much lower than earlier estimations. On average, FHR-4A is 67-fold less abundant than FH in blood. Remarkably, FHR-4B could not be identified in human blood, despite using all thirteen antibodies. This indicates that FHR-4B either circulates at extremely low levels or it might even be completely absent in blood, and thus that FHR-4A is the dominant protein expressed by the FHR-4 gene.

FHR-3 concentrations are higher in aHUS patients

In **Chapter 6** we describe FHR-3 concentrations in aHUS patients. These patients have a variant of the FHR-3 gene that has been associated with developing aHUS. This genetic variant has now been linked with having higher concentrations of FHR-3 in blood. The average FHR-3 concentration was almost four-fold higher as compared to healthy controls (**Chapter 4**). This could provide an explanation why the genetic variant was associated with aHUS. Possibly the higher FHR-3 levels lead to a decreased protection of human cells due to the binding of more FHR-3 instead of FH to the cells. As FHR-3 does not protect human cells against complement, binding of FHR-3 could lead to more complement activation and subsequent damage to the own cells. Having higher FHR-3 is probably not the sole cause of developing aHUS. These patients also commonly have lower FH levels. The combination of lower FH and higher FHR-3 is more likely one of the reasons for developing aHUS. The balance between FH and FHR-3 differs in these patients compared to healthy donors, with possible imbalance in complement inhibition as a result.

FH, and not FHR-3, is important in meningitis patients

Another disease in which complement plays an important role is meningococcal disease. This bacterial infection mainly affects young children and is caused by *Neisseria meningitidis*, also known as the meningococcus. Bacteria like *N. meningitidis* are very sensitive to complement and will be, under normal circumstances, rapidly killed by complement. To prevent this, these bacteria have evolved several strategies to evade or inhibit the human complement system. Upon infection, *N. meningitidis* expresses a protein on its cell surface named FH-binding protein (fHbp). This protein binds human FH and thereby confers the FH-mediated protection

to the bacterium. This ensures that *N. meningitidis* can survive longer in blood, resulting in severe infection. It is, however, unclear why one child becomes infected, while another child does not. It is possible that this has to do (among other factors) with the complement system, especially FH, and differences in this system among children.

In order to further understand this, a large genetic study was conducted in 2010, investigating specifically the genes involved in the complement system, including the genes of FH and the FHR proteins. The methods used in that study are useful to identify which genes are involved in the risk for infection, but are not optimal to identify which mutations are responsible for the association. The study showed that not only mutations in FH, but also mutations in FHR-3 are associated with increased risk for meningococcal disease. This led to the idea that FHR-3 plays an important role in whether a child becomes infected or not. Of note, the domains of FH that are bound by fHbp of *N. meningitidis* are also, almost completely identical, present in FHR-3. This striking similarity, in combination with the found genetic association, led to a model in which FHR-3, instead of FH, would bind to fHbp. As FHR-3 does not confer protection against complement for *N. meningitidis*, binding of FHR-3 would result in complement activation and killing of *N. meningitidis*. This has recently been shown by another research group. FHR-3 can indeed decrease the survival of *N. meningitidis* in human blood by binding, instead of FH, to fHbp. However, this was performed under laboratory conditions and it is unknown whether this indeed occurs in the human body during infection. FHR-3 could possibly protect children against meningococcal disease by preventing FH from binding to the bacteria. Possibly, children with a higher risk of meningococcal disease have lower FHR-3 levels in their blood.

In **Chapter 7** we describe a new study in order to understand which mutations in FHR-3 are responsible for the increased risk for meningococcal disease, to understand which consequences these mutations have for FHR-3, and if patients that have had a *N. meningitidis* infection have lower levels of FHR-3 in their blood. To this end, the genes of FH and the FHRs were studied in 238 patients and 237 healthy controls, to identify the responsible mutations. The results were confirmed in another 1,522 patients and 2,672 controls. Of 367 patients the FH and FHR-3 concentration was determined after they recovered from the infection. Unexpectedly, de average FHR-3 levels of the entire patient group was similar to those found in the healthy controls. The FH concentration was increased in the patients, confirming other studies. The increased FH concentration associated with the presence of the mutation in the FHR-3 gene. Such a connection between mutation in the FHR-3 gene and FH concentration was unknown. With the use of human cells, we were able to show that the FHR-3 gene controls the production of FH. Mutations in the FHR-3 gene disturb this regulation and lead to an increased production of FH. These higher FH levels in blood of children are a risk factor for meningococcal disease, as there is more FH present in blood that can be used by

N. meningitidis to survive. The already relatively low FHR-3 levels (see **Chapter 4**) make is unlikely that there will be enough FHR-3 present to prevent *N. meningitidis* infections to occur. FH concentration, and not FHR-3, is thus an important factor in the risk for meningococcal disease. The regulation of FH production by the FHR-3 gene, and its disruption by mutations in the FHR-3 gene, could also be important for other bacterial infections. Multiple bacteria make use of human FH to protect themselves against the complement system. Possibly, higher FH concentration by mutations in the FHR-3 gene could also be risk factor for other infections.

While **Chapter 7** describes the association between FH, FHR-3 and the risk for meningococcal disease, we describe in **Chapter 8** FH and FHR-3 levels during the infection to study if there is an association of FH or FHR-3 with severity of the infection. Of the 367 patients from **Chapter 7**, there were 90 patients of which samples were available collected during the first days of infection. The concentration of both FH and FHR-3 in blood were strongly decreased during the first days of infection, but recovered within a few days. The FH and FHR-3 levels were linked to clinical parameters that reflect the severity of the disease. This showed that predominantly the decrease in FH levels correlated with the severity of the disease. In patients with more severe disease and poorer prognosis, the FH levels were lower in the first days of disease. FHR-3 levels only correlated with a few clinical parameters. Following the conclusion of **Chapter 7**, also during meningococcal disease, FH seems to play a bigger role than FHR-3. It is, however, unclear what causes the decreased levels. Possibly FH and FHR-3 are being used as a result of extensive complement activation during infection. It could also reflect the binding of FH and FHR-3 to *N. meningitidis*. We could not exclude a lower production by the liver, or an increased leakage of protein out of the blood. Additional research is required to understand what happens to FH and FHR-3 during meningococcal disease.

Chapter 9 is a summarizing discussion in which the most important results of this study ae being discussed. Among these are the measurements of FHR-3 and FHR-4A in healthy donors, showing that both are present at relatively low concentrations in blood. This makes it unlikely that either one efficiently competes with FH. FHR-3 concentrations were increased in aHUS patients, but were normal in meningococcal disease patients. The increased concentrations of FH in meningococcal disease patients was found to be regulated by the FHR-3 gene, a mechanism that might be relevant for other infectious diseases as well. In addition, we demonstrated that the function of FH can be enhanced, which has potential as a therapeutic application for diseases in which damaging complement activation on own cells occurs.

A

Nederlandse samenvatting

Het ijken van de weegschaal: de balans tussen complement factor H en de gerelateerde eiwitten tijdens gezondheid en ziekte

Het humane afweersysteem bestaat uit een aangeleerde tak en een aangeboren tak. Waar de aangeleerde afweer heel specifiek en sterk kan reageren op pathogenen die al eens eerder het lichaam zijn binnengedrongen, kan de aangeboren afweer reageren op elke onbekende, dreiging. Beide zijn nodig om de mens te beschermen tegen infecties. Een belangrijk onderdeel van de aangeboren afweer is het complement systeem. Dit systeem bestaat volledig uit eiwitten die gezamenlijk een activatie cascade vormen in ons bloed. Het complement systeem staat continu 'aan' en valt in principe alles aan waarmee het in aanraking komt. Dit heeft als groot voordeel dat elk mogelijk gevaarlijk pathogeen direct aan wordt gevallen zonder dat deze eerst als zodanig herkend moet worden. Daarmee is het complement systeem een erg snelle en effectieve verdediging in het bloed. Echter, omdat het complement systeem geactiveerd wordt door alles waarmee het in aanraking komt, valt het systeem ook alle humane cellen aan. Om te voorkomen dat dit tot schade en afweerreacties tegen humane cellen leidt, zijn er verschillende remmers van het complement systeem in het lichaam. Deze bevinden zich deels op de humane cellen, maar komen ook vrij voor in het bloed. Eén van de belangrijkste remmers van het complement systeem die vrij circuleert in het bloed is een eiwit genaamd complement factor H (FH).

Factor H beschermt humane cellen tegen complement door in eerste plaats de continue activatie van het systeem af te remmen. Dit doet het door te binden aan complement eiwit 3 (C3) zodra dit uit zichzelf activeert. Daarnaast bindt FH aan humane cellen zodra het geactiveerde onderdeel van C3, C3b, zich aan humane cellen bindt, om ook dit vervolgens te remmen. Naast FH heeft de mens ook vijf andere eiwitten in het bloed die erg op FH lijken, de FH-gerelateerde (FHR) eiwitten. Deze FHRs missen de onderdelen die in FH verantwoordelijk zijn voor de remming van het complement systeem. Ze hebben wel dezelfde onderdelen als FH die betrokken zijn bij de binding aan humane cellen. Er wordt dus gedacht dat deze FHRs niet zozeer het complement systeem remmen, maar juist de activatie ervan ondersteunen door te voorkomen dat FH C3b kan remmen. Dit zou een extra laag in de regulatie van het systeem kunnen zijn. Remming van FH zou bijvoorbeeld nuttig kunnen zijn bij het opruimen van dode humane cellen. Deze moeten ook door het afweersysteem opgeruimd worden en hoeven er dus niet meer sterk tegen beschermd te worden.

Sinds de ontdekking van de FHRs is er veel onderzoek gedaan naar hun functie. Dit gaat echter moeizaam, omdat ze erg veel op FH lijken en er daardoor geen geschikte middelen

(antistoffen) waren om ze van elkaar te onderscheiden. Dit heeft er ook voor gezorgd dat de concentratie van de FHRs in het bloed onbekend is, in tegenstelling tot FH, dat één van de meest voorkomende eiwitten in het bloed is. Omdat gedacht wordt dat er een competitie is tussen FH en de FHRs is het belangrijk om de onderlinge verhouding tussen deze eiwitten te weten.

In dit proefschrift zijn FH en twee van de FHRs, FHR-3 en FHR-4A, verder onderzocht. Dit is gedaan door nieuwe antistoffen te ontwikkelen waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen FH, FHR-3 en FHR-4A. Met deze nieuwe middelen is de functie van FH verder onderzocht en zijn nieuwe methodes opgezet waarmee de concentraties van FHR-3 en FHR-4A in het bloed kunnen worden bepaald. Dit heeft geleid tot nieuwe inzichten in de werking van FH en de rol van FHR-3 en FHR-4A in het complement systeem. Daarnaast zijn deze eiwitten bestudeerd in verschillende ziektes.

FH is cruciaal in de bescherming van rode bloedcellen

In **Hoofdstuk 2** beschrijven wij de karakterisatie van 20 nieuwe antistoffen opgewekt tegen humaan FH. Met behulp van fragmenten van FH kon de precieze bindingsplaats van deze antistoffen worden bepaald. Hiermee is bestudeerd wat er gebeurt met de functie van FH als specifieke onderdelen ervan met behulp van de antistoffen worden geblokkeerd. Dit is in eerste instantie getest met rode bloedcellen van schapen. Deze cellen zijn uit zichzelf niet beschermd tegen het complement systeem van de mens, waardoor de rode bloedcellen stuk gaan (lyseren) zodra ze daarmee in aanraking komen. Echter, rode bloedcellen van schapen kunnen wel humaan FH binden, waarna deze voorkomt dat lysis optreedt. Daardoor zijn schaap rode bloedcellen eenvoudig te gebruiken om de functie van humaan FH te onderzoeken. Alleen als FH volledig functioneel is, blijven de schaap rode bloedcellen intact. Het blokkeren van specifieke onderdelen van FH met de antistoffen voorkwam dat FH de schapen rode bloedcellen beschermde. Vervolgens is dit ook getest met humane rode bloedcellen. Humane rode bloedcellen lyseren niet als ze in aanraking komen met het humane complement systeem, omdat ze verschillende remmers op hun cel oppervlakte hebben. Het is echter wel mogelijk om C3b binding als gevolg van complement activatie te meten. Ondanks de aanwezigheid van andere complement remmers op de humane rode bloedcellen, bleek het blokkeren van FH een grote toename in C3b binding aan de cellen tot gevolg te hebben. Dit was onverwachts, omdat gedacht werd dat de andere remmers in staat zouden moeten zijn dit te voorkomen. De binding van C3b aan de rode bloedcellen is zeer schadelijk, omdat deze cellen dan vernietigd zullen worden. Hiermee is dus duidelijk geworden dat FH een belangrijke rol heeft in het beschermen van rode bloedcellen, ondanks de aanwezigheid van andere remmers.

FH kan verbeterd worden

In **Hoofdstuk 3** beschrijven wij één antistof, van de 20 uit **Hoofdstuk 2**, die een opvallend

ander effect bleek te hebben op FH dan alle andere onderzochte antistoffen. Waar de meeste antistoffen in **Hoofdstuk 2** een remmend effect hadden op de functie van FH, bleek antistof nummer 7 (anti-FH.07) de functie van FH juist te verbeteren. Anti-FH.07 verlaagde de complement activatie in standaard functionele complement testen en verhoogde de binding van FH aan C3b. Nog belangrijker, anti-FH.07 herstelde de verminderde functie van FH in patiënten met atypisch hemolytisch uremisch syndroom (aHUS). Mensen met aHUS hebben een onbalans in hun complement systeem waardoor er onnodige activatie plaatsvindt met schade en ontstekingsreacties in de nieren tot gevolg. Dit kan leiden tot zeer ernstig en levensbedreigend nierfalen. In veel gevallen wordt de onbalans veroorzaakt door mutaties in FH. Dit zijn heterozygote mutaties, oftewel maar één van de twee FH genen is gemuteerd. Het gemuteerde FH kan niet meer goed aan humane cellen binden en dus is er verminderde bescherming tegen het complement systeem. Dit is te testen met behulp van schapen rode bloedcellen. Zoals eerder besproken zijn deze afhankelijk van volledig functioneel humaan FH om zich te beschermen tegen humaan complement. Wanneer serum van aHUS patiënten wordt toegevoegd aan schapen rode bloedcellen lyseren deze doordat het gemuteerde FH onvoldoende bescherming biedt. Toevoeging van anti-FH.07 aan serum van aHUS patiënten voorkwam het lyseren van de schapen rode bloedcellen. Anti-FH.07 herstelde de balans in het complement systeem onafhankelijk van de mutatie in FH. Anti-FH.07 herstelde ook de balans op humane cellen. Door een deel van FH te blokkeren vindt er C3b binding plaats op humane cellen (**Hoofdstuk 2**). Ook dit was te herstellen met anti-FH.07. Het is vooralsnog onduidelijk of anti-FH.07 ook het gemuteerde FH herstelt of dat anti-FH.07 alleen het normale FH verbetert. Huidige therapieën die gebruikt worden om ongewenste complement activatie op de eigen cellen tegen te gaan, remmen delen van het complement systeem volledig. Dit werkt goed om schade aan de eigen cellen te voorkomen, maar maakt tegelijkertijd patiënten vatbaarder voor infecties, omdat ze geen functioneel complement systeem meer hebben. Dit hebben we gedemonstreerd met eculizumab, een therapeutisch antistof tegen complement eiwit 5 (C5) dat noodzakelijk is om bacteriën direct te doden. Bacteriën overleefden in humaan serum na toevoeging van eculizumab, terwijl ze zonder eculizumab werden gedood door het complement systeem. Anti-FH.07 bood geen bescherming voor de bacteriën. Toevoeging van anti-FH.07 leidt dus wel tot extra bescherming tegen het complement systeem voor humane cellen, maar niet voor bacteriën. Dit is een belangrijke en unieke eigenschap van anti-FH.07 tegenover andere therapeutische mogelijkheden en is daarmee dus waarschijnlijk veel veiliger dan huidige therapieën; behandeling met anti-FH.07 zal geen verhoogd infectie risico geven.

FHR-3 komt relatief weinig voor in het bloed

In **Hoofdstuk 4** beschrijven we nieuwe antistoffen opgewekt tegen FHR-3. Hiermee is de eerste FHR-3 specifieke test opgezet om de FHR-3 concentratie in het bloed te bepalen. FHR-3 komt niet bij iedereen voor. Ongeveer 4% van de Westerse bevolking heeft geen genen die coderen voor FHR-3 en is dus deficiënt. Zo'n 20% van de Westerse bevolking heeft maar

één FHR-3 gen en is dus heterozygoot voor FHR-3. Dit werd bevestigd met de nieuwe test. Deficiënte donoren hadden geen meetbaar FHR-3, terwijl heterozygote donoren ongeveer de helft van FHR-3 hadden ten opzichte van 'normale' donoren die wel twee FHR-3 genen hebben. Opvallend was de zeer lage concentratie van FHR-3. Eerdere schattingen van de FHR-3 concentratie beweerden een concentratie gelijk of dicht bij die van FH. Echter, onze nieuwe metingen lieten een gemiddelde FHR-3 concentratie zien die ongeveer 140 keer lager dan FH was. Het is zeer goed mogelijk dat de eerdere schattingen zijn gemaakt op basis van niet specifieke antistoffen waardoor de FHR-3 concentratie overschat is. De in verhouding zeer lage FHR-3 concentratie maakt het onwaarschijnlijk dat er een relevante competitie kan plaats vinden in het bloed met het veel meer aanwezige FH.

FHR-4A is het belangrijkste eiwit van het FHR-4 gen

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we dertien nieuwe antistoffen opgewekt tegen FHR-4A. FHR-4A is één van de twee eiwitten van het FHR-4 gen. Het andere eiwit is FHR-4B. Alle onderdelen van FHR-4B komen ook exact hetzelfde voor in FHR-4A, waardoor het onmogelijk is om FHR-4B specifiek te onderscheiden van FHR-4A. Echter, FHR-4A heeft extra, unieke onderdelen waardoor het wel mogelijk is om FHR-4A specifiek te onderscheiden, mits daartegen antistoffen gevonden worden. Van de dertien antistoffen tegen FHR-4A bleken er zes antistoffen te zijn die aan deze unieke onderdelen van FHR-4A binden. De andere antistoffen bonden ook aan FHR-4B of zelfs andere FHR eiwitten. De precieze locatie van de bindingsplek van de antistoffen is bepaald met behulp van fragmenten van FHR-4A. Met de specifieke antistoffen tegen FHR-4A kon een nieuwe FHR-4A test opgezet worden. Wederom bleek dat FHR-4A concentraties in het bloed lager waren dan oorspronkelijk gedacht. FHR-4A komt gemiddeld 67 keer minder voor dan FH in het bloed. Opvallend was dat FHR-4B niet gevonden kon worden in het bloed, ondanks het gebruik van alle antistoffen. Dit geeft aan dat FHR-4B of circuleert met zeer lage concentraties in het bloed of zelfs helemaal niet voorkomt in het bloed en dat FHR-4A dus het belangrijkste eiwit van het FHR-4 gen is.

FHR-3 concentraties zijn hoger bij aHUS patiënten

In **Hoofdstuk 6** beschrijven we FHR-3 concentraties in aHUS patiënten. Deze patiënten hebben een variant van het FHR-3 gen dat gekoppeld wordt aan het hebben van de ziekte. Deze genetische variant bleek overeen te komen met hogere concentraties van FHR-3 in het bloed. De FHR-3 concentratie was gemiddeld bijna vier keer hoger dan wat er gevonden wordt in gezonde donoren (**Hoofdstuk 4**). Dit zou een verklaring kunnen geven over het verband tussen de variant van het FHR-3 gen en het hebben van aHUS. Mogelijk leiden de hogere FHR-3 waarden tot slechtere bescherming van de humane cellen doordat er meer FHR-3 bindt aan de cellen in plaats van FH. Aangezien FHR-3 geen bescherming biedt voor de cellen waar het aan bindt, zou binding van FHR-3 kunnen leiden tot meer complement activatie en bijkomende schade aan de eigen cellen. Waarschijnlijk is alleen het hebben van hogere FHR-3

concentraties niet de reden voor het ontwikkelen van de ziekte. Dezelfde patiënten hebben namelijk ook vaker een lagere FH concentratie. Waarschijnlijker is de combinatie van laag FH en hoger FHR-3 één van de redenen voor het ontwikkelen van aHUS. De balans tussen FH en FHR-3 is in deze aHUS patiënten dus anders dan bij gezonde donoren, met een mogelijke onbalans in complement remming tot gevolg.

FH, en niet FHR-3, is belangrijk in meningitis patiënten

Een andere ziekte waar complement een belangrijke rol speelt is meningokokkenziekte. Deze bacteriële infectie komt voornamelijk voor bij zeer jonge kinderen en wordt veroorzaakt door de meningokok: *Neisseria meningitidis*. Meningokokkenziekte is zeer ernstig en kan onder andere leiden tot meningitis, een levensbedreigende ontsteking van de hersenvliezen (meningitis), en bloedvergiftiging. Bacteriën zoals *N. meningitidis* zijn zeer gevoelig voor het complement systeem en worden onder normale omstandigheden snel door complement gedood. Om dit te voorkomen hebben bacteriën verschillende strategieën geëvolueerd om het humane complement systeem te ontwijken of te remmen. Tijdens de infectie brengt *N. meningitidis* een eiwit tot expressie op het cel oppervlakte genaamd FH-bindend eiwit (fHbp). Dit eiwit bindt humaan FH zodat FH de bacterie gaat beschermen tegen complement. Dit zorgt ervoor dat *N. meningitidis* langer kan overleven in het bloed wat leidt tot ernstige infecties. Het is echter nog niet duidelijk waarom het ene kind wel meningokokkenziekte krijgt en het andere kind niet. Het is mogelijk dat dit onder andere te maken heeft met het complement systeem, met name FH, en verschillen daarin tussen kinderen.

Om dit te kunnen beantwoorden is er in 2010 een grote genetische studie gedaan die specifiek de genen van het complement systeem, waaronder FH en de FHR eiwitten, bestudeerde. De methode die gebruikt werd in die studie zijn niet geschikt om de precieze mutaties in de genen te vinden die daadwerkelijk verantwoordelijk zijn voor de gevonden associatie, maar geven wel een sterke aanwijzing welke genen belangrijk zijn. Daaruit bleek dat niet alleen mutaties in het FH gen maar ook mutaties in het FHR-3 gen geassocieerd konden worden met een verhoogd risico tot het krijgen van meningokokkenziekte. Dit leidde tot het idee dat FHR-3 een belangrijke rol speelt in het wel of niet krijgen van meningokokkenziekte. Het opvallende was dat de onderdelen van FH die gebonden worden door het fHbp van *N. meningitidis*, ook bijna geheel identiek voorkomen in FHR-3. Deze opvallende overeenkomst, in combinatie met de genetische associatie, leidde tot een model waarin in plaats van FH, FHR-3 bindt aan het fHbp. Aangezien FHR-3 geen bescherming kan bieden aan *N. meningitidis*, zou dit leiden tot complement activatie en vervolgens het doden van *N. meningitidis*. Dit is recent aangetoond door een andere onderzoeksgroep. FHR-3 zorgt er inderdaad voor dat minder meningokokken overleven in humaan bloed door in plaats van FH te binden aan fHbp. Echter, dit is gedaan onder lab condities en het is onbekend of dit ook daadwerkelijk gebeurt in het lichaam tijdens een infectie. FHR-3 zou dus mogelijk kinderen kunnen beschermen

tegen meningokokkenziekte door te voorkomen dat FH aan de bacteriën bindt. Mogelijk hebben kinderen met een hoger risico op meningokokkenziekte dus lagere FHR-3 waardes in hun bloed.

In **Hoofdstuk 7** beschrijven we een nieuwe studie om erachter te komen welke mutaties in het FHR-3 gen verantwoordelijk zijn voor het verhoogde risico op meningokokkenziekten, om te begrijpen wat voor gevolgen deze mutaties hebben op FHR-3, en of patiënten die een meningokokkenziekte hebben gehad lagere FHR-3 waarden in hun bloed hebben. Hiervoor zijn de FH en FHR genen van 238 patiënten en 237 gezonde donoren opnieuw bestudeerd, waarmee de verantwoordelijke mutaties gevonden konden worden. Dit kon bevestigd worden in nog eens 1,522 meningitis patiënten en 2,672 gezonde donoren. Van 367 patiënten zijn vervolgens de FH en FHR-3 waarden in het bloed bepaald nadat ze hersteld waren van de infectie. Onverwachts bleek dat over de gehele groep genomen de FHR-3 waarden niet afweken van de gezonde controles. De FH waarden waren verhoogd in de patiënten, wat een eerdere studie bevestigde. De verhoogde FH waarden kwamen overeen met het hebben van de mutatie in het FHR-3 gen. Een dergelijk verband tussen mutaties in het FHR-3 gen en de FH waarden was nog niet bekend. Met behulp van humane cellen konden we aantonen dat het FHR-3 gen de productie van FH controleert. Mutaties in het FHR-3 gen verstoorden deze regulatie en leidden tot een verhoogde productie van FH. Deze verhoogde FH waarden in het bloed van kinderen zorgen voor een hoger risico op *N. meningitidis* infectie, omdat er meer FH aanwezig is waarmee *N. meningitidis* zich kan beschermen. De toch al lage waarden van FHR-3 (zie **Hoofdstuk 4**) maakten het al onwaarschijnlijk dat er voldoende FHR-3 aanwezig zou zijn om *N. meningitidis* infecties te voorkomen. De concentratie in het bloed van FH, en niet die van FHR-3, is dus een belangrijke factor in het risico op meningitis infectie. De regulatie van FH productie door FHR-3, en het verstoren daarvan door mutaties in het FHR-3 gen, kan ook belangrijk zijn voor andere bacteriële infecties. Meerdere bacteriën maken misbruik van humaan FH om zichzelf te beschermen tegen het complement systeem. Mogelijk zijn de verhoogde FH waarden door mutaties in FHR-3 dus ook een risico factor voor andere infecties.

Waar in **Hoofdstuk 7** gekeken is naar FH, FHR-3, en het risico op het krijgen van meningokokkenziekte, beschrijven we in **Hoofdstuk 8** FH en FHR-3 tijdens de infectie om te bestuderen of er een relatie is tussen FH, FHR-3 en de ernst van de infectie. Van de 367 patiënten uit **Hoofdstuk 7** waren er van 90 patiënten bloedmonsters beschikbaar die tijdens de eerste dagen van de infectie afgenomen waren. De concentraties van zowel FH als FHR-3 in het bloed waren sterk afgenomen tijdens de eerste dagen van de infectie, maar herstelden zich binnen enkele dagen. De FH en FHR-3 waarden in deze monsters konden worden gekoppeld aan klinische parameters die de ernst van de infectie weerspiegelen. Daaruit bleek dat voornamelijk de afname in FH waarden overeenkomt met de ernst van de infectie. Hoe

erger de infectie en slechter de prognose, hoe lager de FH waarden in de eerste dagen van de infectie. FHR-3 waarden kwamen overeen met maar een paar van de klinische waarden. In lijn met de conclusies van **Hoofdstuk 7**, bleek dat ook tijdens meningitis infectie FH een belangrijkere rol lijkt te spelen dan FHR-3. Echter het is onduidelijk wat de oorzaak van de afnames is. Mogelijk worden FH en FHR-3 verbruikt door complement activatie tijdens de infectie. Het zou ook een reflectie kunnen zijn van verbruik van FH en FHR-3 door binding aan *N. meningitidis*. Een verlaagde productie door ziekte of een verhoogde lekkage van de eiwitten uit het bloed zijn ook niet uit te sluiten. Verder onderzoek is noodzakelijk om te kunnen begrijpen wat er gebeurt met FH en FHR-3 tijdens meningokokkenziekte.

Hoofdstuk 9 is een concluderende samenvatting waarin de belangrijkste behaalde resultaten van dit onderzoek verder worden bediscussieerd. Dit zijn het bepalen van FHR-3 en FHR-4A waarden onder gezonde condities, wat aantoonde dat deze in zeer lage concentraties voorkomen in het bloed. Dit maakt een effectieve competitie met FH onwaarschijnlijk. FHR-3 waarden waren wel verhoogd in patiënten die aHUS hebben, maar bleken normaal te zijn in patiënten met meningokokkenziekte. De verhoogde concentratie van FH in de meningitis patiënten bleek gereguleerd te worden door het FHR-3 gen, een mechanisme dat mogelijk ook van belang is bij andere infecties. Daarnaast bleek dat de functie van FH te verbeteren is, wat een mogelijke toepassing heeft als medicijn voor ziektes waarin schadelijke complement activatie op eigen cellen plaatsvindt.

List of publications

In preparation

Kumar V*, **Pouw RB***, Autio MI*, Phua ZY, Borghini L, Wright VJ, Pan B, Tan AKY, Binder A, Brouwer MC, Pinnock E, de Groot R, Hazelzet J, Emonts M, van der Flier M, Schlapbach LJ, Bellos E, Anderson A, Secka F, Martinon-Torres F, Salas A, Fink C, Carrol ED, Pollard AJ, Coin LJ, Zenz W, Wouters D, Hibberd ML, Ang LT, Levin M#, Kuijpers TW#, Davila S# on behalf of EUCLIDS consortium.
Variation in the *CFHR3* gene determines susceptibility to meningococcal disease by controlling factor H levels
* Shared first authorship
# Shared senior authorship

Pouw RB, Hoggart C, Wright VJ, Brouwer MC, Thomas J, Calvo-Bado L, Inwald D, Fink C, Wouters D, Levin M, Kuijpers TW.
Complement factor H (FH) and FH-related protein 3 levels during meningococcal disease

Kasanmoentalib ES, Valls Serón M, Engelen-Lee JY, Tanck MW, **Pouw RB**, van Mierlo G, Wouters D, Pickering M, van der Ende A, Kuijpers TW, Brouwer MC, van de Beek D.
Complement factor H contributes to mortality in humans and mice with pneumococcal meningitis

Submitted

Pouw RB, Brouwer MC, de Gast M, van Beek AE, Sánchez-Corral P, van den Heuvel L, Schmidt CQ, van der Ende A, Kuijpers TW, Wouters D.
Potentiation of complement regulator factor H protects human endothelial cells from complement attack in aHUS sera
Blood Advances

Peer reviewed

Sánchez-Corral P, **Pouw RB**, López-Trascasa M, Józsi M.
Self-damage caused by dysregulation of the complement alternative pathway: relevance of the factor H protein family
Frontiers in Immunology (2018) 9:1607 doi: 10.3389/fimmu.2018.01607

Pouw RB, Delgado IG, Lera AL, Rodríguez de Córdoba S, Wouters D, Kuijpers TW, Sánchez-Corral P.
High complement factor H-related (FHR)-3 levels are associated with the atypical haemolytic-uremic syndrome-risk allele *CFHR3*B*
Frontiers in Immunology (2018) 9:848. doi: 10.3389/fimmu.2018.00848

Pouw RB, Brouwer MC, van Beek AE, Józsi M, Wouters D, Kuijpers TW.
Complement factor H-related protein 4A is the dominant circulating splice variant of *CFHR4*
Frontiers in Immunology (2018) 9:729. doi: 10.3389/fimmu.2018.00729

van Beek AE, **Pouw RB**, Brouwer MC, van Mierlo G, Geissler J, Ooijevaar-de Heer P, de Boer M, van Leeuwen K, Rispens T, Wouters D, Kuijpers TW.
FHR-1 and FHR-2 form homo- and heterodimers, while FHR-5 circulates only as homodimer in human plasma
Frontiers in Immunology (2017) 8:1328. doi: 10.3389/fimmu.2017.01328

Schäfer N, Grosche A, Reinders J, Hauck S, **Pouw RB**, Kuijpers TW, Wouters D, Ehrenstein B, Enzmann V, Zipfel P, Skerka C, Pauly D.
Complement regulator FHR-3 is elevated either locally or systemically in a selection of autoimmune diseases
Frontiers in Immunology (2016) 7:542. doi: 10.3389/fimmu.2016.00542

Pouw RB, Brouwer MC, Geissler J, van Herpen LV, Zeerleder SS, Wuillemin WA, Wouters D, Kuijpers TW.
Complement factor H-related protein 3 serum levels are low compared to factor H and mainly determined by gene copy number variation in *CFHR3*
PLoS ONE (2016) 11(3): e0152164. doi: 10.1371/journal.pone.0152164

Pouw RB, Vredevoogd DW, Kuijpers TW, Wouters D.
Of mice and men: The factor H protein family and complement regulation
Molecular Immunology (2015) 67(1):12-20. doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.011

Keizer MP, **Pouw RB**, Kamp AM, Patiwael S, Marsman G, Hart MH, Zeerleder SS, Kuijpers TW, Wouters D.
TFPI inhibits lectin pathway of complement activation by direct interaction with MASP-2
European Journal of Immunology (2015) 45(2):544-50. doi: 10.1002/eji.201445070

Patents

Pouw RB, Brouwer MC, Kuijpers TW, Wouters D.
Factor H potentiating antibodies and uses thereof
Patent No. 18151726.9-1116

Pouw RB, Brouwer MC, Kuijpers TW, Wouters D.
Factor H potentiating antibodies and uses thereof
Patent WO 2016/028150, PCT/NL2015/050584

Contributing authors

Chapter 2

Pouw RB[1,2], Brouwer MC[1], Thielen AJF[1], Schmidt CQ[3], Kuijpers TW[3,4], Wouters D[1].
Characterization of novel anti-factor H antibodies reveals the role of factor H in protecting human erythrocytes from complement

[1] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands
[3] Institute of Pharmacology of Natural Products and Clinical Pharmacology, Ulm University, Ulm, Germany
[4] Sanquin Research, Department of Blood Cell Research, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

Study concept and design: RBP, TWK and DW
Data acquisition and analysis: RBP, MBC and AJFT
Provided critical reagents, samples and/or materials: CQS
Interpretation of data: all authors
Drafting of manuscript: RBP, TWK and DW
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version.

Chapter 3

Pouw RB[1,2], Brouwer MC[1], de Gast M[1], van Beek AE[1,2], van den Heuvel L[3], Schmidt CQ[4], van der Ende A[5], Sánchez-Corral P[6], Kuijpers TW[2,7], Wouters D[1].
Antibody-mediated potentiation of complement regulator factor H protects human endothelial cells from complement attack in aHUS sera
Manuscript in preparation

[1] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands

[3] Laboratory of Pediatric Nephrology, Department of Development & Regeneration, KU Leuven, Belgium; and Department of Pediatric Nephrology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands
[4] Institute of Pharmacology of Natural Products and Clinical Pharmacology, Ulm University, Ulm, Germany
[5] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Medical Microbiology, the Netherlands Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, CINIMA, Amsterdam, the Netherlands
[6] Complement Research Group, IdiPAZ, La Paz University Hospital, and Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain
[7] Sanquin Research, Department of Blood Cell Research, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

Study concept and design: RBP, AEvB, TWK and DW
Data acquisition and analysis: RBP, MCB, MdG and AEvB
Provided critical reagents, samples and/or materials: PS-C, LvdH, CQS and AvdE
Interpretation of data: all authors
Drafting of manuscript: RBP, TWK and DW
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version.

Chapter 4

Pouw RB[1,2], Brouwer MC[1], Geissler J[3], van Herpen LV[1], Zeerleder SS[4], Wuillemin WA[5], Wouters D[1], Kuijpers TW[2,3]
Complement factor H-related protein 3 serum levels are low compared to factor H and mainly determined by gene copy number variation in *CFHR3*
PLoS ONE (2016) 11(3): e0152164. doi: 10.1371/journal.pone.0152164

[1] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands
[3] Sanquin Research, Department of Blood Cell Research, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands
[4] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Hematology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

[5] Division of Hematology and Central Hematology Laboratory, Luzerner Kantonsspital and University of Berne, Berne, Switzerland

Study concept and design: RBP, DW and TWK
Data acquisition and analysis: RBP, MCB, JG, and LVvH
Provided critical reagents, samples and/or materials: SSZ and WW
Interpretation of data: all authors
Drafting of manuscript: RBP, DW and TWK
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version

Chapter 5

Pouw RB[1,2], Brouwer MC[1], van Beek AE[1,2], Józsi M[3], Wouters D[1†], Kuijpers TW[2,4†]
Complement factor H-related protein 4A is the dominant circulating splice variant of *CFHR4*
Frontiers in Immunology (2018) 9:729. doi: 10.3389/fimmu.2018.00729

[1] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands
[3] MTA-ELTE "Lendület" Complement Research Group, Department of Immunology, ELTE Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary
[4] Sanquin Research, Department of Blood Cell Research, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

[†] Equal contribution
Study concept and design: RBP, DW and TWK
Data acquisition and analysis: RBP, MCB, and AEvB
Provided critical reagents, samples and/or materials: MJ
Interpretation of data: all authors
Drafting of manuscript: RBP, DW and TWK
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version

Chapter 6

Pouw RB[1,2], Gómez Delgado I[3], López Lera A[4], Rodríguez de Córdoba S[5], Wouters D[1], Kuijpers TW[2,6], Sánchez-Corral P[3]

High complement factor H-related (FHR)-3 levels are associated with the atypical hemolytic-uremic syndrome-risk allele *CFHR3*B*
Frontiers in Immunology (2018) 9:848. doi: 10.3389/fimmu.2018.00848

[1] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands
[3] Complement Research Group, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain
[4] Immunology Unit, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain
[5] Biological Research Center (CIB)-CSIC, Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain
[6] Sanquin Research, Department of Blood Cell Research, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

Study concept and design: RBP, DW, TWK and PS-C
Data acquisition and analysis: RBP, IGD, ALL and SRdG
Interpretation of data: all authors
Drafting of manuscript: IGD and PS-C
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version

Chapter 7

Kumar V[1,25,†], Pouw RB[2,3,†], Autio MI[1,4,†], Phua ZY[1], Borghini L[1,22], Wright VJ[5], Pan B[1,4], Tan AKY[6], Binder A[7], Brouwer MC[3], Pinnock E[8], de Groot R[9], Hazelzet J[10], Emonts M[11,12], van der Flier M[9], Schlapbach LJ[13,14,15], Bellos E[5], Anderson S[16], Secka F[16], Martinon-Torres F[17], Salas A[18], Fink C[8], Carrol ED[19], Pollard AJ[20], Coin LJ[21], Zenz W[7], Wouters D[3], Hibberd ML[22,23], Ang LT[6], Levin M[5#], Kuijpers TW[2#], Davila S[1,24,25#] on behalf of the EUCLIDS consortium
Variation in the *CFHR3* gene determines susceptibility to meningococcal disease by controlling factor H levels
Manuscript in preparation

[1] Human Genetics, Genome Institute of Singapore, Singapore

[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands
[3] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[4] Cardiovascular Research Institute, Centre for Translational Medicine, National University Health System, Singapore 117599
[5] Section for Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Imperial College London, UK
[6] Cancer Stem Cell Biology, Genome Institute of Singapore, Singapore
[7] Department of General Pediatrics, Medical University of Graz, Graz, Austria
[8] Micropathology Ltd, University of Warwick, UK
[9] Department of Pediatrics and Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands
[10] Department of Pediatrics, Erasmus Medical Center-Sophia Children's hospital, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands
[11] Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom
[12] Paediatric Infectious Diseases and Immunology Department, Newcastle upon Tyne Hospitals Foundation Trust, Great North Children's Hospital, Newcastle upon Tyne, United Kingdom
[13] Paediatric Critical Care Research Group, Mater Research Institute, University of Queensland, Brisbane, Australia
[14] Paediatric Intensive Care Unit, Lady Cilento Children's Hospital, Brisbane, Australia
[15] Department of Pediatrics, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Switzerland
[16] Medical Research Council Unit Gambia, Banjul, The Gambia
[17] Translational Pediatrics and Infectious Diseases, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain, and GENVIP Research Group (www.genvip.org), Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, Galicia, Spain
[18] Unidade de Xenética, Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses, Instituto de Ciencias Forenses, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, and GenPop Research Group, Instituto de Investigaciones Sanitarias (IDIS), Hospital Clínico Universitario de Santiago, Galicia, Spain
[19] Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, UK
[20] Oxford Vaccine Group, Department of Pediatrics, University of Oxford and the NIHR Oxford Biomedical Research Centre, Oxford, UK
[21] Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St Lucia, Queensland, 4072, Australia
[22] Infectious diseases, Genome Institute of Singapore, Singapore

[23] Infectious and Tropical Disease, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK
[24] SingHealth Duke-NUS Institute of Precision Medicine (PRISM), Singapore
[25] Duke-NUS Medical School, Singapore

[†] Equal contribution, [#] Equal contribution

Study concept and design: all authors
Patient inclusion and collection of samples: VJW, BP, AKYT, AB, EP, RdG, JH, ME, MvdF, LJS, SA, FS, FM-T, AS, EC, AP, WZ
Data acquisition and analysis: VK, RBP, MA, ZYP, LB, MCB, EB and LJC
Interpretation of data: all authors
Drafting of manuscript: VK, RBP, ML, TWK and SD
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version

Chapter 8

Pouw RB[1,2], Hoggart C[3], Wright VJ[3], Brouwer MC[1], Thomas J[4], Calvo-Bado L[4], Inwald D[5], Fink C[4], Wouters D[1], Levin M[3], Kuijpers TW[2,6]
Complement factor H (FH) and FH-related protein 3 levels during meningococcal disease

[1] Sanquin Research, Department of Immunopathology, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, Amsterdam Infection and Immunity Institute, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.
[2] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's hospital, Amsterdam, the Netherlands
[3] Section for Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom
[4] Micropathology Ltd, University of Warwick, Warwick, United Kingdom
[5] Pediatric Intensive Care Unit, St Mary's Hospital, Imperial College London, London, United Kingdom
[6] Sanquin Research, Department of Blood Cell Research, Amsterdam, the Netherlands, and Landsteiner Laboratory, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

Study concept and design: RBP, DW, ML, and TWK
Patient inclusion and collection of samples: VJW and DI
Data acquisition and analysis: RBP, CH, MCB, JT, and LC-B
Interpretation of data: all authors

Drafting of manuscript: RBP, DW and TWK
All authors critically revised the manuscript and contributed to the final version.

PhD portfolio

Name PhD student:	Richard Benjamin Pouw
PhD period:	1 September 2012 – 31 August 2016
Promotor:	prof. dr. T. W. Kuijpers, MD
Co-promotor:	dr. D. Wouters

PhD training

Courses	Presentation	Year	ECTS
Mass Spectrometry, Proteomics, and Protein research (AMC graduate school)		2013	1.25
Advanced Immunology (AMC graduate school)		2013	2.90
Writing a Scientific Article		2013	3.00
8th ENII – Porto Conte Ricerche Summer School in Advanced Immunology	Poster	2013	2.00
Seminars & workshops			
Weekly Sanquin IP Department meetings	6x Oral	2012-2016	5.00
Biweekly Journal club		2012-2016	4.00
Monthly Department Science Evening	4x Oral	2012-2016	2.00
Weekly Sanquin Research Staff meeting	3x Oral	2012-2016	5.00
Landsteiner lectures and guest speaker seminars		2012-2016	2.50
EKZ KHI Department meetings	2x Oral	2012-2016	0.50
Sanquin Science Day	2x Poster	2012, 2014	0.50
14th European Meeting on complement in Human Disease Teaching day		2013	0.25
Annual EUCLIDS Meeting		2013-2016	2.00
EUCLIDS Workshop		2013, 2015	0.50
25th International Complement Workshop Teaching day		2014	0.25
Sanquin Spring Seminar	Poster	2015	0.25
Masterclasses			
Prof. dr. B. Paul Morgan		2012	0.20
Prof. dr. W. Martin Kast		2012	0.20
Prof. dr. Klaus Preissner		2013	0.20
Prof. dr. Ron Germain		2014	0.20
Prof. dr. Arturo Zychlinsky		2014	0.20
National Conferences			
Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVvI) Annual Winterschool	1x Oral 3x Poster	2012-2015	4.00

Interactive Infection & Immunity PhD-retreat (Triple I)	1x Oral 1x Poster	2013, 2014	2.00
The Dutch Complement Symposium, Nunspeet	1x Oral 1x Poster	2014, 2016	1.50
CIDA Symposium, Amsterdam	1x Oral	2015, 2016	0.75

International Conferences

14th European Meeting on Complement in Human Disease, Jena, Germany	Poster	2013	1.50
25th International Complement Workshop, Rio de Janeiro, Brasil	3x Poster	2014	2.50
15th European Meeting on Complement in Human Disease, Uppsala, Sweden	Poster	2015	1.50
26th International Complement Workshop, Kanazawa, Japan	Oral	2016	2.50
9th International Conference on Complement Therapeutics, Rhodes, Greece	Poster	2016	2.50

Working visits

Working visit of one week to the Complement lab of Dr. M. Jószi, Budapest, Hungary		2015	1.00

Teaching

Lecturing

EUCLIDS Workshop		2013, 2015	1.00
Practical course assistant – Immunology (BSc course)		2014, 2015	1.00

Supervising

MSc student Hinde El Otmani (internship, 6 months)		2013	2.00
MSc student Laurens V. van Herpen (internship, 5 months)		2014	1.50
MSc student David W. Vredevoogd (literature thesis)		2014	0.50
MSc student Andreja Novak (internship, 9 months)		2015	2.50

Parameters of Esteem

Honours and awards

Best Poster Presentation Award at the 'Triple I' 2013	2013
Ralph Steinman Memorial Outstanding Poster Award at the 8th ENII – Porto Conte Ricerche Summer School in Advanced Immunology	2013
Best Poster Presentation Award at the 14th European Meeting on Complement in Human Disease	2013

ICS Trainee Award at the 25th International Complement Workshop	2014
Nominee in-house Sanquin Seminar Award	2014-2016
Aegean Conference Travel Award at the 9th International Conference on Complement Therapeutics	2016
ICS Travel Award at the 26th International Complement Workshop	2016

Grants

Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVvI) PhD-student Scholarship for working visit	2015

Curriculum vitae

Richard Benjamin Pouw is op 1 januari 1988 geboren in Purmerend. Hij groeide op in Almere en behaalde in 2006 zijn VWO diploma met het profiel Natuur en Gezondheid aan Het Baken. Daarna begon hij aan de Universiteit van Amsterdam aan de bacheloropleiding Biomedische wetenschappen. Als onderdeel van zijn bachelor studies liep hij stage bij de afdeling Medische Microbiologie van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam, onder begeleiding van Melanie Nguyen en dr. Yvonne Pannekoek, waarbij hij werkte aan RNA thermometers in *Neisseria meningitidis*. Na zijn bachelor studies te hebben afgerond in 2010 vervolgde hij zijn opleiding aan de Universiteit van Amsterdam en begon aan de masteropleiding Biomedical Sciences. Tijdens deze opleiding kwam hij voor het eerst in aanraking met het complement systeem tijdens zijn eerste stage bij de afdeling Immunopathologie van Sanquin Research, onder begeleiding van Angela Kamp en dr. Diana Wouters. Tijdens deze stage werkte hij aan de ontdekking van TFPI als remmer van complement eiwit MASP-2, wat resulteerde in een bijdrage aan een wetenschappelijke publicatie. Zijn tweede stage vond plaats bij de afdelingen Neurologie en Medische Microbiologie van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam, onder begeleiding van Robert Huis in 't Veld, MD, dr. Yvonne Pannekoek, dr. Arie van der Ende, en prof. dr. Diederik van de Beek, MD. De stage bestond uit meerdere projecten. Zo werkte hij aan het opzetten van RNA isolatie methodes voor het in kaart brengen van het gehele transcriptoom van *Streptococcus pneumoniae*. Daarnaast bestudeerde hij ook de effecten van sRNA25 op de groei van *N. meningitidis* en de mogelijk daarbij betrokken eiwitten. Zijn masteropleiding rondde hij af in 2012, met een afstudeerthesis over mogelijk nieuwe antibacteriële medicijnen in de vorm van riboswitch ligand analogen, onder begeleiding van dr. Yvonne Pannekoek. In datzelfde jaar keerde hij terug naar het onderzoek aan het complement systeem en startte hij zijn promotieonderzoek bij de afdeling Kinderhematologie, Immunologie en Infectieziekten van het Emma Kinderziekenhuis, Academisch Medisch Centrum, en de afdeling Immunopathologie van Sanquin Research, in Amsterdam. Daarin werd hij begeleid door dr. Diana Wouters en prof. dr. Taco Kuijpers, MD. Tijdens zijn promotieonderzoek bestudeerde hij het complement regulatie eiwit factor H en de daaraan gerelateerde eiwitten in het kader van complement regulatie op humane cellen, de interacties van deze eiwitten met *N. meningitidis* en tijdens acute infectie. De resultaten van dat onderzoek hebben geleid tot de totstandkoming van dit proefschrift. Vanaf december 2017 is hij werkzaam als postdoctoraal onderzoeker bij de afdeling Farmaceutische Wetenschappen van de Universiteit Basel, in Basel, Zwitserland, in de onderzoeksgroep Moleculaire Farmacologie geleid door prof. dr. Daniel Ricklin, waar hij verder onderzoek doet naar het complement systeem.

Dankwoord

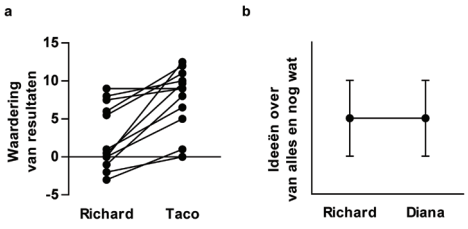
Abstract

Zo, eindelijk! Dan nu het laatste deel, het dankwoord. Waarschijnlijk ook voor dit boekje weer het meest gelezen gedeelte. En dat is terecht! Want ik zou het nooit zonder alle hulp van iedereen gered hebben en dankzij jullie allemaal is het dan ook eindelijk gelukt. Ik wil dan ook heel graag iedereen bedanken die het mogelijk hebben gemaakt dat ik dit promotie onderzoek heb kunnen doen. Maar zoals met elk hoofdstuk van dit boekje, zijn er ook voor dit gedeelte methodes opgezet, data verzameld en moeilijke analyses gemaakt. Alle resultaten leidden in dit geval tot één duidelijke conclusie; bedankt voor de geweldige en leerzame tijd!

Intro, Results and Discussion

Ik wil graag een aantal mensen persoonlijk bedanken. Allereerst mijn promotor, Taco (grote baas). Bedankt dat je het met mij aandurfde om aan dat immense EUCLIDS project te werken. Ik heb veel van je geleerd over alle aspecten van de wetenschap en het wereldje waarin we zitten (inclusief zijdelings een beetje kennis over kunst), waar ik nog zeker profijt van zal hebben in mijn verdere carrière. Je hebt mij als geen ander weten te motiveren tijdens mijn onderzoek, mede dankzij jouw onuitputtelijke enthousiasme over data waarvan ik zelf niet altijd zag wat de waarde was (**Fig. 1a**).

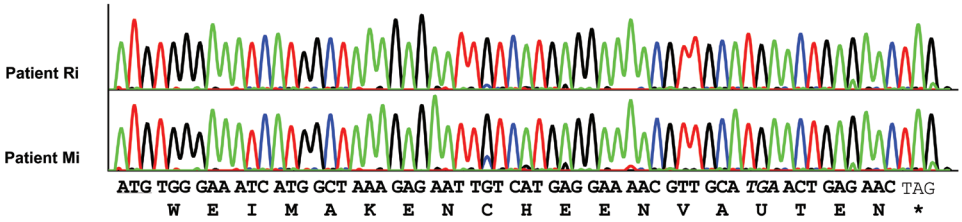
Mijn co-promotor, Diana (baas). Jij zorgde ervoor dat ik tijdens mijn studie verzeild raakte in het complement wereldje waardoor ik eindelijk wist welke kant ik op wilde. En zoals al voorspeld werd kwam ik weer terug onder jouw hoede bij Sanquin voor mijn promotieonderzoek. Ik ben altijd verbaasd geweest over hoe veel we op één lijn zaten over data, experimenten, wetenschap, het werk en alles wat daarbij komt kijken (**Fig. 1b**) en ik wil je bedanken voor het vertrouwen dat je mij daarmee gaf. Het sparren over van alles en nog wat was heel leerzaam. Met het H-team werken aan het patent was een voorrecht en bedankt dat ik bij alle onderhandelingen en besprekingen daarover mocht zijn. Samen bijna tegelijk weg gaan was wel heel onverwachts, maar ik bewonder je om je sprong in het diepe. Ik hoop dat ze op het RIVM beseffen wat voor geweldige Topper (…) ze in huis hebben gehaald.



Figuur 1. Resultaten met grote baas en baas. **a**) een representatieve steekproef van de subjectieve waardering van nieuwe data tijdens besprekingen. n=10. **b**) Representatieve weergave van overeenkomst in ideeën, uitgedrukt in arbitraire eenheden, over van alles en nog wat. Punten geven het gemiddelde weer, met verticale lijnen de spreiding, n=8.

Mijn paranimfen. Mieke. Waar zal ik beginnen… Zonder jou geen antistoffen, geen vliegende start, geen The Nine, geen "ik ben blij" mailtjes, geen phoenix cellen, geen rupsje-nooit-genoeg, geen RiMi en zeker weten ook geen boekje. Je was mijn extra linkerhand op het lab (**Fig. 2**) wat soms leidde tot gedeelde frustratie maar altijd zorgde voor de broodnodige relativering, nuchtere aanpak en de grootste lol. Samen enthousiast worden over één klein blauw welletje of die geslaagde proef en dan door het lab springen… Ik heb met heel veel plezier met je samengewerkt en ben trots dat je mijn paranimf wilt zijn!

Gerben, de hunk. Jij was mijn eerste en dat blijft natuurlijk speciaal, hoe ongemakkelijk het ook was… Maar gelukkig is het gelukt om van positie te wisselen. Ik ben vereerd dat jij nu naast mij staat als paranimf. Jouw enorme passie voor wetenschap wordt alleen maar geëvenaard

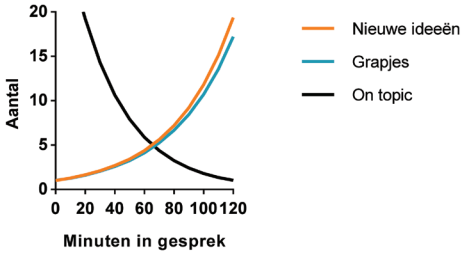


Figuur 2. Sequentie van een nieuw gen waargenomen in twee ongerelateerde individuen. Het enkele exon bevat een open reading frame voor een 2297.36 Da eiwit bestaande uit 19 aminozuren met een theoretische pI van 4.32. Het eiwit bevat een selenocysteïne op positie 16, afgekort met U. Verdere analyse laat zien dat het eiwit zeer instabiel is. De functie is vooralsnog onbekend.

door jouw kunde om met werkelijk alles een bierflesje te kunnen openen. We hebben veel samen meegemaakt tijdens ons onderzoek, met als kleine persoonlijke overwinning dat jij een werkbespreking over factor H (en, oké, FSAP) hield. Je bent en blijft een voorbeeld voor hoe ik dit moest afronden en ik hoop in de toekomst nog vele poker potjes te winnen van je, slechte grappen te maken, te wachten op de clues van je verhalen, discussiëren over Star Wars, genieten van G&T's, en nog meer life hacks of rare regels (**stelling 9**) van je te leren.

De complement groep. Angela, mijn labmoeder. Onder jouw vleugels mocht ik kennis maken met complement en zie nu het gevolg… je wordt bedankt! ;) Je hield het uit met die koppige student, die ondertussen stiekem wel heel veel van je geleerd heeft. Bedankt voor de vele steun ook tijdens mijn promotie en alle lol (waaronder met één krant, twee dobbelstenen en vele rode handen). Labweekenden waren altijd net iets leuker (en actiever) met jou erbij. Astrid, ik ben je nog net voor, maar je maakte dat nog wel een lastige uitdaging. Ik ben blij dat het ons allebei gelukt is om alles af te ronden. Gerard (baasie). Het nadeel van naar Amsterdam verhuizen was dat ik alle carpool ritjes met jou naar Almere moest gaan missen. Ik ken niemand anders met zoveel (wilde) ideeën, waarvan ik tegelijkertijd nooit zeker weet of het weer een grapje is (**Fig. 3**). Na al die jaren tuin ik er hoogstwaarschijnlijk toch zo weer in, hoewel ik hoop dat ik het je met de jaren iets moeilijker heb gemaakt om mij voor de gek te houden. Als er zoiets bestaat als een labvader, dan ben jij het. Altijd tijd voor een bakkie, open voor (wetenschappelijke) discussies en te helpen als er ook maar iets was. Dat Nature paper over factor J komt er vast nog aan, als iemand het kan ontdekken en uitzoeken ben jij het. Je bent nu in ieder geval van die wijsneus en lange blonde stengel af.

Elizabeth, bedankt voor je input die paar jaren en het mij nog wat bijbrengen over eiwit structuren. Kyra, het was heel fijn dat jij bij de groep kwam met meer senior kennis en input. Die nuchtere en droge blik van jou tijdens de werkbesprekingen zorgde ervoor dat ik nog een keer extra ging nadenken over de data en vervolg proeven. Allen bedankt! Ilse en Gillian, jullie hebben het lef getoond om de boel over te nemen, en ik bewonder het hoe jullie het allemaal oppakken. Bedankt dat ik met een gerust gevoel anti-FH.07 achter kon laten in jullie



Figuur 3. Analyse van vele gesprekken met dhr. G. van Mierlo. Het aantal nieuwe ideeën (oranje lijn) en On topic-onderwerpen (zwarte lijn) is gemeten met behulp van O.R.E.N.. Grapjes (blauwe lijn) zijn ook prospectief, maar doorgaans retroperspectief bepaald.

handen. En alle studenten die ik mocht begeleiden, Hinde, David, Laurens, Andreja en mijn gekaapte/geleende student, Marlon, bedankt voor de gezellige en productieve tijd.

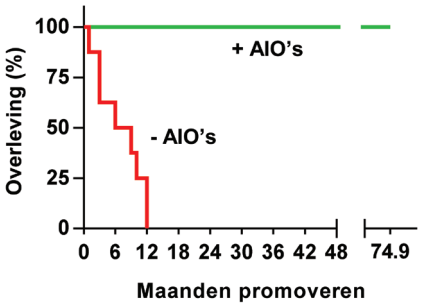
Iedereen van de afdeling Immunopathologie. Jullie zijn een geweldig wetenschappelijke familie en pas als je ergens anders gaat werken kom je er achter hoe uniek en speciaal Immunopathologie is. De vele dingen die we samen deden; labuitjes, labweekenden, IPlaybackshows, sinterklaas- en kerstfeesten, en de spontane en minder spontane borrels, ze waren allemaal geweldig, zorgden voor veel hilariteit en ontspanning.

Marieke, altijd klaar voor een goed gesprek en altijd met goed advies. Zonder jou zou IP er heel anders uit zien. Fatima en Kaoutar, de eeuwige rotsen in de branding. Bedankt voor jullie hulp met alles, zeker ook die laatste loodjes. Anja, Annelies, Brenda, Floris, Gertjan, Henk, Karien, Kristof, Lucien, Rob, Robbert, Ruchira, Sacha, Stefen en Theo, bedankt voor al jullie ideeën, suggesties en hulp.

Anneke, Dorien, Dorina, Ellen, Gijs, Ingrid, Iris, John, Judith, Margreet, Marja, Marlieke, Melanie, Miranda, Ninotska, Pleuni, Simone, Sophie en Tineke. Zonder jullie is er geen afdeling en jullie verdienen alle lof daarvoor. Bedankt voor al jullie hulp en ondersteuning.

Een speciaal bedankje voor Jolanda en Irma, bij wie ik eerst twee keer aan de slag mocht als student-assistent en later nog een paar dagen mocht helpen met de praktica. Jullie openden mijn ogen voor het plezier van lesgeven.

Alle PhD-studenten. Anna, Anno, Anouk, Casper, Femke, Inge, Iwan, Jana, Jelle, Jorn, Judith, Karin, kleine Laura, Laura, Lea, Lotte, Marein, Martine, Mateusz, Mischa, Niels, Pauline, Peter-Paul, Sanne, Saskia, Sonja, Twan en Willem. Dat eerste jaar in de AIO-kamer op U0 blijft onvergetelijk en de verhuizing naar de kamer op U1, later letterlijk omgedoopt naar Atlantis, en daarna naar U2 maakte het eigenlijk alleen maar gezelliger. Jullie zorgde er allemaal voor dat ik mij thuis voelde en zonder jullie zou ik het eerste jaar niet overleefd hebben (**Fig. 4**). De AIO-uitjes, sinter-kerst-en-nieuw, AIO-avonden, zevende paasdag, borrels en diners zorgden ervoor dat ik stukje bij beetje die >4 jaar door kwam. Het is niet uit te leggen hoe waardevol



Figuur 4. Overlevingscurve van een promovendus met mede-AIO's (groene lijn) en zonder mede-AIO's (rode lijn). Tot op de promotie blijkt regelmatige interactie met lotgenoten een cruciaal onderdeel om het promoveren tot een succesvol eind te brengen.

lotgenoten zijn in de beproeving die ze promoveren noemen.

Buiten de afdeling zijn ook een hoop geweldige mensen direct of indirect betrokken geweest bij het onderzoek. Arie van der Ende en Kim Schipper, bedankt voor de hulp met de meningokok proeven. Yvonne Pannekoek, je was een soort rode draad tijdens mijn studies en hebt er voor gezorgd dat ik bij Sanquin terecht kon voor een stage. Bedankt voor alle steun in de afgelopen jaren. Anneke, bedankt voor je lieve interesse in mijn onderzoek.

Ik had ook nog eens het geluk om van geweldige experts hulp te krijgen: Judy, bedankt dat je met je heerlijk aanstekelijke vrolijkheid mij MLPA's leerde. Martin en Karin, bedankt voor het sequencen van de antilichamen en de patiënten. Arnoud, bedankt voor je hulp en geduld om mij kennis te laten maken met SPR.

My dear EUCLIDs friends. From the first meeting on, you guys formed my second scientific family. It was a thrill and exciting to be part of such a big consortium and I am looking forward to the reunions and finding out where everyone is ending up. I especially want to thank a few special EUCLIDS members. Vic, you taught me the enormous value of a thoroughly, superbly organized cohort, which we affectionately refered to as the 'Vic cohort'. Thank you for all your help with the samples. Sonia and Vikrant, it was great to work closely together with you on the big paper, I am proud to be part of it. Mike, thank you for being you, you are the core ingredient for making EUCLIDs the big family that it is.

Special thanks to my collaborators. Mihály Józsi, thank you for having me in your lab and the shared interest in FHR proteins. I am sure we will keep on running into each other during conferences and collaborating in the future whenever possible. Christoph Schmidt, thank you so much for your enthusiasm regarding complement and science in general. It was great to come over to Ulm and learn from the best. You are setting the example with your open approach and tremendous knowledge. Pilar Sánchez-Corral and Bert van den Heuvel, thank you for the collaborations, valuable discussions and help with the patient samples.

Vrienden zijn heel belangrijk geweest om een beetje gezond verstand te houden in de afgelopen jaren. Yotam, de battle continues. Ik beloof je dat je van deze Pouw nog niet af bent. Kroeze, ik kom nog graag een keer verliezen van jou en die vent van je met Ligretto. De witte ijsberen; Simone, Laura en Mischa (Jut). De pubquizzes en popquiz marathons zijn altijd een feestje op zich, waarvan ik zeker weet dat we er nog vele zullen meemaken EN uiteindelijk ooit een keer winnen. Misschien helpt het als we minder speciaal biertjes en meer rooibos thee drinken… Simone, zonder jou zou het een grote ongeorganiseerde bende worden. Laura, jouw gave om met een enkele noot nummers te herkennen is bewonderingswaardig en beangstigend tegelijkertijd. Mischa (Jut). Lotgenoten bij Taco. Ik vond het op en buiten het lab altijd ontzettend gezellig met je (Jena…). Ik hoop nog veel mooie (en sterke) verhalen van je te horen onder het genot van een goede single malt. Bedankt voor de vele practical jokes die wij uitgehaald hebben bij anderen en elkaar. Gerben en Anouk, maatjes op en buiten het lab. Ik ben blij dat we nog altijd contact houden, ook al zitten er nu wat kilometers tussen. Boye en Lara, bedankt voor de gezelligheid. Boye, je blijft me elke keer weer verbazen en ik hoop nog vaak een biertje te doen in Almere om weer eens te horen wat je nu weer hebt meegemaakt of wat voor mooie plannen er bij zijn gekomen. Het is heel fijn om met iemand een goed gesprek te kunnen hebben dat een keer niet over wetenschap gaat. Bedankt allemaal.

Mijn lieve familie en schoonfamilie, bedankt voor jullie onvoorwaardelijke steun en interesse in mijn werk. Zelfs nu op grote afstand. Maar zeker ook bedankt voor alle afleiding. De Van Beekjes, ik kijk uit naar ons volgende feestje, jullie zijn een geweldig lieve en leuke schoonfamilie om te hebben. Stephan en Sandra, wauw. Ik ben ontzettend trots op jullie beiden. Owen, klein bolletje plezier. Een heel groot nadeel van werken in Basel is jouw jonge en geweldige lach moeten missen, maar ik beloof je dat we dat ruimschoots gaan inhalen. Pap en Mam. Bedankt. Voor alles. Jullie vragen je misschien wel eens af waar deze interesse in eiwitjes allemaal vandaan komt, maar ik krijg dit alles alleen maar voor elkaar omdat ik weet dat jullie er altijd voor me zijn, wat er ook gebeurt. Jullie zijn mijn grootste voorbeeld en grootste steun.

Anna, lieverd. Het was heel leuk om samen te werken aan hetzelfde project en te kunnen brainstormen over data en experimenten. Ik vind het bijzonder hoe je 'gewoon" even mee sprong op die rijdende trein, je staande hield, en het allemaal heel snel oppikte. Ik weet dat ik het je lastig heb gemaakt de afgelopen periode, en dan verdorie ook nog eens naar Duitsland verhuizen... Dank je voor je ongelofelijke steun en dat je het samen met mij vol houdt. Ik kan niet omschrijven hoeveel je voor me betekent. Je maakt me een beter mens en houdt me in balans. Ik hou van je.

Zo. Klaar, fin, Schluss.