



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Regulation of complement activation on red blood cells

Thielen, A.J.F.

Publication date

2019

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Thielen, A. J. F. (2019). *Regulation of complement activation on red blood cells*. [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, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Appendix

English summary

Nederlandse samenvatting

List of publications

List of co-authors and their contribution to the manuscript

PhD portfolio

Curriculum Vitae

Dankwoord

ENGLISH SUMMARY

The complement system is part of our innate immune system and is important as first line of defense against pathogens. Next to pathogen clearance, the complement system also plays an important role in removing damaged or dying cells from the body. The complement system can be activated via three pathways, which are activated via separate mechanisms, but all eventually converge to a common terminal pathway. In general, the classical pathway (CP) is activated by antibody-antigen complexes, the lectin pathway (LP) by pathogen specific carbohydrates and the alternative pathway (AP) gets spontaneously activated on unregulated surfaces. Red blood cells (RBCs) are the most common type of blood cells and while circulating in the body being continuously in contact with complement components in the blood plasma. To protect against unwanted complement activation, RBCs (like all host cells) are equipped with several complement regulating proteins, either expressed on the cell membrane such as CD35, CD55 and CD59 or acting in the fluid phase such as factor H (FH). Inefficient regulation or overstimulation of the complement system may cause complement deposition on RBCs. This can result into intravascular clearance of RBCs via the formation of the membrane attack complex or extravascular clearance of RBCs via complement receptor-mediated phagocytosis by macrophages and both can contribute to the development of anemia. RBC transfusions are given to restore oxygen transporting capacity when there are clear signals of lack of oxygen due to anemia. The focus of this thesis is to further elucidate how complement activation is regulated on RBCs, under normal conditions, during RBC transfusion and in hemolytic diseases.

Under normal conditions, complement regulatory proteins are redundant in controlling complement activation on the RBC surface. However, decreased expression and/or function of complement regulatory proteins may result in unwanted complement activation and accelerated removal of RBCs, depending on which regulator is affected and the underlying disease. In **Chapter 2**, we reviewed literature on complement regulation on RBCs and the (clinical) consequences of dysregulated complement regulation, either due to genetic mutations or acquired during several clinical conditions.

RBCs express membrane bound complement regulators CD35, CD55 and CD59, but lack CD46 expression, which is expressed on all nucleated cells. In **Chapter 3**, we report for the first time the dynamics of the expression of complement regulator CD46 during erythropoiesis. CD46 follows a similar decreasing expression pattern as CD71 (transferrin receptor) during erythropoiesis and this occurred mainly before enucleation. Thus, CD46 may be used as a surrogate erythroid differentiation

progression marker in addition to CD71, thereby increasing the panel of markers that can be used to monitor progression of erythropoiesis. In addition, we observed that CD35 was already expressed early in erythropoiesis showing that proerythroblasts uniquely express both complement regulators CD35 and CD46.

As stored RBCs that are transfused into patients are cleared rapidly from the circulation of the recipient, we investigated in **Chapter 4** whether complement deposition and antibody binding, both facilitating phagocytosis, could be a mechanism contributing to this clearance. We demonstrated that under current Dutch blood bank conditions there is no complement deposition on stored RBCs as present in a concentrate. However, we showed that upon contact with human serum, as occurring during transfusion, RBCs are susceptible for complement deposition and antibody binding independent of storage time. This however seemed not sufficient for the phagocytic uptake by monocyte-derived macrophages. These results indicate that besides complement deposition and antibody binding on stored RBCs upon mimicking a transfusion more factors are involved in the clearance of donor RBCs in recipients.

Besides membrane bound complement regulators, fluid phase regulator FH is important in the regulation of complement activation on RBCs. In **Chapter 5** we described the characterization of 20 newly generated anti-FH monoclonal antibodies. With the use of these antibodies we showed that besides the well-established role of binding domains 19-20, binding domains 6-8 are important for complement regulation on RBCs. Blocking these binding domains resulted in increased C3 deposition on RBCs when incubated with human serum.

Dysfunction of complement regulation can result in damage to host cells, thereby contributing to the pathology of many diseases. The unlimited availability of complement regulator deficient cell lines may be helpful to further investigate in vitro the delicate balance of complement activation and regulation on human cells. To the best of our knowledge, we showed in **Chapter 6** for the first time, the generation of human single CD46, CD55 and CD59 knockout, double CD46/CD55, CD46/CD59 and CD55/CD59 knockout and triple CD46/CD55/CD59 knockout cell lines. We confirmed the known function of these complement regulators and observed an effect of CD59 deficiency on C3 deposition, which suggests involvement of CD59 in regulation of C3 convertases. In addition, these cell lines may provide a useful tool to test novel therapeutic complement inhibitors in vitro.

For efficient complement activation via each of the activation pathways, the AP amplification loop is assumed to be an essential feed forward mechanism. Because of this, the AP is considered a potential therapeutic target for auto-antibody induced conditions. In **Chapter 7** we, however, showed that the amplification loop is bypassed when inducing CP activation via antibodies on physiologically relevant cell surfaces. So, this indicates that most probably therapeutic intervention of the amplification loop is not effective to treat antibody-mediated diseases.

The results described in this thesis were summarized and discussed in **Chapter 8** giving a comprehensive overview on regulation of complement activation on RBCs.

NEDERLANDS SAMENVATTING

Het complement systeem is onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en speelt een belangrijke rol bij de verdediging tegen pathogenen. Naast het opruimen van pathogenen, speelt het complement systeem ook een belangrijke rol bij het verwijderen van beschadigde of dode cellen in ons lichaam. Het complement systeem kan worden geactiveerd via drie routes, die elk een eigen activatie mechanisme hebben, maar uiteindelijk uitkomen bij een gemeenschappelijke eind route. In het algemeen wordt de klassieke route geactiveerd door antilichaam-antigeen complexen, de lectine route door pathogeen-specifieke suikers en de alternatieve route wordt spontaan geactiveerd op oppervlakten zonder complement regulatie.

Rode bloedcellen zijn de meest voorkomende bloedcellen in ons lichaam. Terwijl ze door ons lichaam circuleren zijn deze rode bloedcellen voortdurend in contact met de in het bloedplasma aanwezige complement componenten. Om rode bloedcellen te beschermen tegen ongewenste complement activatie, zijn ze (net als alle andere lichaamseigen cellen) uitgerust met verschillende complement regulerende eiwitten, die tot expressie komen op het celmembraan, zoals CD35, CD55 en CD59, of werkzaam zijn in ons bloedplasma zoals factor H (FH). Inefficiënte regulatie of te veel stimulatie van het complement systeem kan leiden tot complement depositie op rode bloedcellen. Dit kan resulteren in intravasculaire klaring van de rode bloedcellen via de vorming van het membraan attack complex of resulteren in extravasculaire klaring van de rode bloedcellen via complement receptor-gemedieerde fagocytose door macrofagen. In beide gevallen zal dit leiden tot een tekort aan rode bloedcellen en uiteindelijk anemie.

Rode bloedcel transfusies kunnen de zuurstoftransport capaciteit herstellen wanneer er bij de patiënt duidelijke signalen zijn van zuurstofgebrek als gevolg van anemie. De focus van dit proefschrift is om verder te verduidelijken hoe complement activatie wordt gereguleerd op rode bloedcellen onder normale omstandigheden, tijdens rode bloedcel transfusies en bij hemolytische aandoeningen.

Onder normale omstandigheden zijn er meer dan voldoende complement regulerende eiwitten aanwezig om complement activatie op het membraan van rode bloedcellen onder controle te houden. Echter verminderde expressie en/of functie van deze regulerende eiwitten kan leiden tot ongewenste complement activatie en versnelde klaring van rode bloedcellen. Dit is zowel afhankelijk van het type regulatoren dat is aangedaan als wel afhankelijk van de onderliggende ziekte. **Hoofdstuk 2** biedt een overzicht van de huidige literatuur over complement activatie op rode bloedcellen. Ook worden de (klinische) gevolgen van ontregelde complement regulatie besproken, hetzij als gevolg van genetische mutaties, hetzij verworven bij verschillende klinische omstandigheden.

Rode bloedcellen brengen op hun celmembraan de complement regulatoren CD35, CD55 en CD59 tot expressie, maar ze missen de expressie van CD46. Dit doordat CD46 alleen tot expressie komt op het celmembraan van cellen met een kern. **Hoofdstuk 3** rapporteert de dynamiek van de expressie van complement regulator CD46 tijdens de erythropoëse. Expressie van CD46 neemt af gedurende de erythropoëse dat vergelijkbaar is met het expressie patroon van CD71 (transferrine receptor). Dit gebeurt voornamelijk voordat enucleatie plaatsvindt. Dit maakt CD46, naast CD71, een geschikte kandidaat als surrogaat erythroïde differentiatie marker; een uitbreiding van het panel aan markers dat gebruikt kan worden voor het volgen van de voortgang van de erythropoëse. Daarnaast rapporteren we dat CD35 al vroeg tijdens de erythropoëse tot expressie komt, wat aantoont dat proerytroblasten uniek zijn, omdat ze zowel de complement regulatoren CD35 als CD46 tot expressie brengen.

Het is bekend dat opgeslagen rode bloedcellen, die patiënten krijgen voor transfusie, snel uit de circulatie van de ontvanger worden geklaard. Om hier een verklaring voor te vinden, hebben we in **Hoofdstuk 4** onderzocht of complement depositie en antilichaam binding, welke beide fagocytose mogelijk maken, bijdragen aan deze klaring. We hebben aangetoond dat rode bloedcellen, aanwezig in een rode cel concentraat dat opgeslagen is volgens de huidige bewaarcondities van de Nederlandse Bloedbank, geen complement depositie op hun celmembraan vertonen. We hebben echter ook aangetoond dat bij contact met humaan serum, zoals tijdens een transfusie, deze rode bloedcellen vatbaar zijn voor complement depositie en antilichaam binding wat onafhankelijk is van de bewaartijd. Deze complement depositie en antilichaam binding lijkt echter onvoldoende voor fagocytose van de rode bloedcellen door macrofagen (van monocyten oorsprong). Deze resultaten tonen aan dat niet alleen complement depositie op en antilichaam binding aan het celmembraan van de opgeslagen rode bloedcellen verantwoordelijk zijn voor de klaring van donor rode bloedcellen bij ontvangers, maar ook meerdere andere factoren betrokken zijn.

Naast membraan gebonden complement regulatoren is complement regulator FH (aanwezig in bloedplasma) belangrijk voor het reguleren van complement activatie op rode bloedcellen. In **Hoofdstuk 5** wordt de karakterisering van 20 nieuw gegenereerde anti-FH monoklonale antilichamen beschreven. We hebben aangetoond dat naast de reeds bekende FH bindingsdomeinen 19-20, ook de bindingsdomeinen 6-8 belangrijk zijn voor complement regulatie op rode bloedcellen. Het blokkeren van deze bindingsdomeinen resulteerde in verhoogde C3 depositie op rode bloedcellen na incubatie met humaan serum.

Een verstoorde complement regulatie kan resulteren in schade aan lichaamseigen cellen en daardoor bijdragen aan de pathologie van veel ziektes. Om in vitro de delicate balans van complement activatie en regulatie op menselijke cellen te onderzoeken, is er behoefte aan cellijnen die slechts enkele of zelfs geen complement regulatoren hebben. Voor zover bekend, hebben wij als eerste humane cellijnen gecreëerd, die enkelvoudig, tweevoudig en drievoudig deficiënt zijn voor de complement regulatoren CD46, CD5 en/of CD59, zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**. Proeven met deze cellijnen bevestigen de bekende functie van deze complement regulatoren. Daarnaast hebben we ook een effect van CD59 deficiëntie op C3 depositie waargenomen, wat suggereert dat CD59 betrokken is bij de regulatie van de C3 convertase. In de toekomst verwachten we deze complement regulator deficiënte cellijnen te gebruiken om nieuwe therapeutische complement remmers in vitro te testen.

Momenteel wordt de amplificatie loop van de alternatieve route gezien als een essentieel feed-forward mechanisme voor efficiënte complement activatie via elke van de andere bekende activatie routes. Om deze reden wordt de alternatieve route beschouwd als een potentieel therapeutisch doelwit voor condities waarbij antilichamen (die het eigen lichaam aanvallen) een belangrijke rol spelen. In **Hoofdstuk 7** tonen we echter aan dat de amplificatie loop omzeild kan worden als de klassieke route wordt geactiveerd via antilichamen op fysiologisch relevante cel oppervlaktes. Dit geeft aan dat therapeutische interventie van de amplificatie loop hoogstwaarschijnlijk niet effectief is voor de behandeling van antilichaam gemedieerde ziektes.

De resultaten beschreven in dit proefschrift zijn samengevat en bediscussieerd in **Hoofdstuk 8** en geeft tevens een uitgebreid overzicht over de regulatie van complement activatie op rode bloedcellen.

LIST OF PUBLICATIONS

Thielen AJF, Zeerleder S and Wouters D

Consequences of dysregulated complement regulators on red blood cells.

Blood Rev. 2018 Jul;32(4):280-288.

Thielen AJF, van Baarsen IM, Jongasma ML, Zeerleder S, Spaapen RM and Wouters D

CRISPR/Cas9 generated human CD46, CD55 and CD59 knockout cell lines as a tool for complement research.

J. Immunol. Methods. 2018 May;456:15-22

Thielen AJF, Meulenbroek EM, Baas I, van Bruggen R, Zeerleder S and Wouters D

Complement deposition and IgG binding on stored red blood cells are independent of storage time.

Transfus. Med. Hemother. 2018 Mar.

LIST OF LIST OF CO-AUTHORS AND THEIR CONTRIBUTION TO THE MANUSCRIPT

Consequences of dysregulated complement regulators on red blood cells

AJF Thielen	Drafting the manuscript and final approval of the manuscript.
S Zeerleder	Critically reviewing and final approval of the manuscript.
D Wouters	Drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.

Complement regulator CD46 expression is lost gradually during erythropoiesis and enucleation

AJF Thielen	Study concept and design, conducting experiments, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript and final approval of the manuscript.
A Visser	Conducting experiments, analysis and interpretation of te results.
D Wouters	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.
E van den Akker	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, critically reviewing and final approval of the manuscript.
P Burger	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, critically reviewing and final approval of the manuscript.

Complement deposition and IgG binding on stored red blood cells are independent of storage time

AJF Thielen	Study concept and design, conducting experiments, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript and final approval of the manuscript.
EM Meulenbroek	Study concept and design and final approval of the manuscript.
I Baas	Conducting experiments and final approval of the manuscript.
R van Bruggen	Provided material, critically reviewing and final approval of the manuscript.
S Zeerleder	Study concept and design, critically reviewing and final approval of the manuscript.
D Wouters	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.

Blocking the binding region domains 6-8 of factor H inhibits its complement regulation function on human red blood cells

RB Pouw	Study concept and design, conducting experiments, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript and final approval of the manuscript.
AJF Thielen	Conducting experiments, analysis and interpretation of te results, critically reviewing and final approval of the manuscript.
MC Brouwer	Conducting experiments and final approval of the manuscript.
CQ Schmidt	Provided material, critically reviewing and final approval of the manuscript.
TW Kuijpers	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, critically reviewing and final approval of the manuscript.
D Wouters	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.

CRISPR/Cas9 generated human CD46, CD55 and CD59 knockout cell lines as a tool for complement research

AJF Thielen	Study concept and design, conducting experiments, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript and final approval of the manuscript.
IM van Baarsen	Conducting experiments, analysis and interpretation of te results and final approval of the manuscript.
ML Jongasma	Provided technical support, analysis and interpretation of te results, critically reviewing and final approval of the manuscript.
S Zeerleder	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, critically reviewing and final approval of the manuscript.
RM Spaapen	Study concept and design, provided technical support, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.
D Wouters	Study concept and design, analysis and interpretation of te results, drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.

The amplification loop is not required for efficient classical pathway complement activation

AJF Thielen	Study concept and design, conducting experiments, analysis and interpretation of the results, drafting the manuscript and final approval of the manuscript.
EM Meulenbroek	Study concept and design and final approval of the manuscript.
MC Brouwer	Conducting experiments and final approval of the manuscript.
ML Jongsma	Provided technical support and final approval of the manuscript.
RM Spaapen	Analysis and interpretation of the results, critically reviewing and final approval of the manuscript
S Zeerleder	Study concept and design, analysis and interpretation of the results, critically reviewing and final approval of the manuscript.
D Wouters	Study concept and design, analysis and interpretation of the results, drafting the manuscript, critically reviewing and final approval of the manuscript.

PHD PORTOFOLIO

Courses	Year	ECTS
European Network of Immunology- Advanced Immunology Summerschool	2014	1.8
Advanced Immunology	2014	2.9
Browsing Genomes with Ensemble	2014	0.2
DNA Technology	2014	1.4
Sanquin Science Course	2015	0.5
Scientific English Writing	2015	3.0
Presenting	2015	0.3
Seminars & workshops	Year	ECTS
Department meeting	2013-2017	5.0
Journal Club	2013-2017	5.0
Landsteiner Lectures and Guest Speaker Seminars	2013-2017	5.0
Teaching Day 25th International Complement Workshop (ICW)	2014	0.3
Teaching Day 15th European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD)	2015	0.3
(Inter)national Conferences	Year	ECTS
Interactive Infection & Immunity retreat (Triple I) Vinkeveen, The Netherlands poster	2014	1.0
25th International Complement Workshop (ICW) Rio de Janeiro, Brazil Poster	2014	2.0
Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVVI) Winterschool Noordwijkerhout/Kaatsheuvel, The Netherlands poster	2013-2015	1.5
15th European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD) Uppsala, Sweden poster	2015	2.0

Appendix

(Inter)national Conferences	Year	ECTS
Sanquin Science Day Amsterdam, The Netherlands poster	2014, 2016	1.0
Dutch Complement Symposium Nunspeet, The Netherlands Posters	2014, 2016	1.0
Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVVI) Lunteren Symposium Lunteren, The Netherlands	2016	0.5
26th International Complement Workshop (ICW) Kanazawa, Japan Poster	2016	2.0
AMC Complement symposium Amsterdam, The Netherlands	2017	0.3
Teaching	Year	ECTS
Master student: Iris van Baarsen (8 months)	2014-2015	2.7
Practical course assistant – Immunology (bachelor course)	2016	0.5
Award & Prizes	Year	
European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD) Travel award for poster presentation	2015	
Dutch Complement Symposium Poster Prize	2016	
Nominated for AMC PhD poster awards	2016	
Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVVI) travel grant	2016	

CURRICULUM VITAE

Astrid Thielen is geboren op 18 februari 1989 te Venray. Ze groeide op in Horst, waar zij in 2007 haar middelbare school diploma behaalde met het profiel Natuur en Gezondheid op het Dendron College. In datzelfde jaar begon zij aan haar bachelor opleiding (Medische) Biologie aan de Radboud Universiteit te Nijmegen. Tijdens haar bachelor volgde zij een korte stage bij de afdeling Urologie van het Nijmegen Center Molecular Life Science waar ze keek of het enzym AKR1C3 een marker en therapeutisch target kon zijn



voor castratie-resistente prostaatkanker. Direct na haar bachelor begon zij in 2010 aan de master Medische Biologie aan de Radboud Universiteit van Nijmegen. Tijdens haar master liep zij stage bij Dr. Sandra van Bijnen en Dr. Harry Dolstra op de afdeling Hematologie van het Radboud UMC, waar ze onderzoek deed naar myeloïde suppressor cellen in myelodysplastisch syndroom. Op dezelfde afdeling schreef ze een scriptie onder begeleiding van Dr. Anniek van der Waard en Dr. Harry Dolstra over Wnt/ β -catenin signaal route in de formatie van geheugen CD8+ T-cellen. Een tweede stage volgde zij op de afdeling Nefrologie van het Radboud UMC onder begeleiding van Dr. Jürgen Dieker en Dr. Johan van der Vlag. In deze stage onderzocht zij apoptotische microdeeltjes uit het plasma van systemische lupus erythematosus patiënten. Tevens schreef zij onder begeleiding van hen een scriptie waarin ze de rol van neutrofiel extracellulaire traps in de pathogenese van systemische lupus erythematosus onderzocht. In 2013 begon ze onder begeleiding van Dr. Diana Wouters, Prof. Dr. Sacha Zeerleder en Prof. Dr. Marieke van Ham aan haar promotieonderzoek op de afdeling Immunopathologie van Sanquin Research. Tijdens dit promotieonderzoek onderzocht zij regulatie van complement activatie op rode bloedcellen. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in het proefschrift dat hier voor u ligt.

DANKWOORD

Eindelijk het is zover... het kost wat, maar dan heb je ook wat! Dit zou echter nooit mogelijk zijn geweest zonder de bijdrage van velen. De laatste woorden van dit proefschrift wil ik dan ook graag aan jullie wijden. Allemaal bedankt dat het gelukt is om een 'boekje' te krijgen!

Diana, mijn copromotor, bedankt dat je het aandurfde om dat meisje uit het zuiden in je groep op te nemen. In het begin moest ik wennen aan je (Amsterdamse) directheid, maar later wist ik altijd waar ik aan toe was. Ik heb me op wetenschappelijk gebied kunnen ontwikkelen, maar vooral ook op persoonlijk vlak. Je hebt me veel geleerd over het complement wereldje en je zorgde altijd erg goed voor je complement groep. Ondanks je nieuwe drukke baan op het RIVM, heb je op het eind ervoor gezorgd dat alles afkwam. Bedankt daarvoor en de mooie samenwerking de afgelopen jaren! Sacha, mijn promotor, ik heb veel geleerd van de kritische vragen die je stelde. Je zorgde met je vele klinische ervaring voor een andere kijk op de data. Verder bedankt voor de jaarlijkse borrel "Chez Zerri" en veel succes in Zwitserland. Marieke, je bent mijn promotor en hoofd van de afdeling. We spraken elkaar niet zo vaak, maar ondanks dat verbaasde je me altijd weer met hoeveel je van mijn onderzoekslijnen wist. Jij zorgt goed voor je afdeling en ik ben dan ook dankbaar dat ik in zo'n fijne omgeving mijn PhD heb kunnen voltooien.

Mijn paranimfen: Marlieke en Laura.

Marlieke je bent iets na mij bij de afdeling gekomen en ik denk dat er vanaf het eerste moment bij het labweekend een klik was. Ik waardeer jouw optimisme en overal het positieve van inzien. Helaas kunnen we nu niet meer samen cellen doorzetten... maar het was erg fijn dat je mij kon ondersteunen met de CRISPR techniek. CRISPR of was het nou CRISPS... hè Laura! Hoe dan ook het resulteerde in gezellige dagjes film kijken met zijn drieën met héél véél chips. Later werd dit voorgezet met onze gezellige (all-you-can-eat) etentjes. Ik hoop dat we nog vaak samen uit eten gaan! Laura, ik vind het knap dat je de stap hebt genomen om als analist te stoppen en als promovendus verder te gegaan. Ik wens je nog heel veel succes met jouw PhD traject!

De complement groep. Elisabeth, bedankt dat je me op gang hebt geholpen met mijn PhD en dat ik de eerste paar jaren altijd met vragen bij je terecht kon. Mischa, wat fijn dat we aan het begin samen konden strijden tegen het factor H 'virus'. Richard en Anna, factor H is samen jullie ding. Het is mooi om te zien dat jullie daar helemaal voor gaan en dit leidt tot mooie resultaten. Jullie hebben ervoor gezorgd

Appendix

dat ik het factor H 'virus' toch te pakken heb gekregen (Hoofdstuk 5). Mieke, Gerard en Angela bedankt voor jullie praktische kennis over de vele complement assays en Kyra bedankt voor je (diagnostische) kennis en input. Allemaal bedankt voor de leuke werkbesprekingen met koekjes en de gezellige complement etentjes!

Robbert bedankt dat je naar onze afdeling bent gekomen en de CRISPR techniek met je meenam. Hierdoor heeft mijn PhD project hele andere onderzoekslijnen erbij gekregen en hebben Marlieke en ik, "kastje en de muur", gezellig mogen samen werken. Dit heeft uiteindelijk geleid tot mooie data, bedankt daarvoor!

Iris, mijn student, bedankt dat ik je heb mogen begeleiden tijdens mijn PhD. We hebben samen veel gepraat, koppen thee gedronken en met enthousiasme ervoor gezorgd dat de knockouts een succes werden.

Alle PhD studenten: Anna, Anno, Anouk, Casper, Gerben, Inge, Iwan, Jana, Jorn, Judith, Karin, Laura, Lea, Marein, Mateusz, Niels, Peter-Paul, Sanne, Saskia, Sonja, Twan en Willem. Bedankt voor de vele wetenschappelijke discussies, de OIO-avonden, congressen en de gezellige pauzes. Maar natuurlijk ook bedankt voor alles buiten het werk zoals de vele borrels, ('90 en single) feestjes, picknicken/BBQen in het park, diners en alle OIO uitjes. Jullie hebben allemaal gezorgd voor enorm veel gezelligheid tijdens mijn PhD op zowel U1 als later in de kantoortuin. Hierdoor werd het leven van een PhD-er een stuk leuker en beter vol te houden!

Fatima en Kaoutar bedankt voor alle administratieve hulp de afgelopen jaren. En natuurlijk de rest van de afdeling: Anja, Anneke, Annelies (ik mis de wandelingen naar de metro), Brenda (bedankt voor alle input tijdens de hemolyse besprekingen), Dorien, Dorina, Ellen, Gertjan, Gijs, Henk, Ingrid, Iris, Irma, Jolanda, John (bedankt voor het meerijden), Judith, Karien, Kristof, Margreet, Marja, Miranda, Ninotska, Pleuni, Ruchira, Shabnam, Simone, Steven, Theo en Tineke. Jullie zijn allemaal bereid om te helpen bij vragen en zorgen voor een goed sfeer op de afdeling. Ik zal de playbackshows, sinterklaas/kerst avonden, labuitjes en labweekenden nooit vergeten.

Dit proefschrift had er niet gelegen als ik naast mijn werk niet zoveel fijne vrienden zou hebben. Lydia, Robin, Christel, Arnout, Iris, Rick, Martin, Daniël en Chantal, hoe vaak we elkaar spreken wisselt, maar ik weet dat ik altijd bij jullie terecht kan voor alles! Ik geniet onder andere van samen eten en de vele spelletjes die we spelen. Dankjewel voor de leuke momenten samen en ik kijk uit naar de vele nieuwe momenten in de toekomst.

Gwenda, André, Joris, Mirjam, Mischa en Loes wat begon met alleen volleyballen om het hoofd leeg te krijgen, is uitgegroeid tot een groep waarmee we nog veel meer dingen doen dan alleen volleyballen. Ik kijk uit naar onze volgende dagjes in de dierentuin en alle (verjaardag)uitjes die nog gaan komen.

Het is fijn dat ik met jullie over werk gerelateerd pieken en dalen kan praten, maar ook dat we gezellig kunnen kletsen en lachen om onnozele dingen. Jullie hebben me allemaal altijd gesteund en gezorgd voor de nodige afleiding en ontspanning tijdens mijn PhD, die ik heel hard nodig had. Allemaal bedankt daarvoor!

Lieve pap en mam, bedankt voor de jaren van onvoorwaardelijk vertrouwen, steun en liefde die jullie altijd hebben gegeven. Pap, jij wist vaak beter de techniek achter de apparatuur die ik gebruikte dan ikzelf. Je hebt altijd laten zien dat je met hard werken een heel eind komt. Mam je zei ooit tegen mij: 'ik dacht niet dat je de universiteit zou halen', zo trots dat je was. Nou ik geloof dat zelf een stapje hoger gelukt is! Ook al woon ik nu nog verder weg, ik weet dat jullie er voor me zijn en enorm TROTS zijn. Linda & Mark en René door onze drukke agenda's zien we elkaar te weinig. Echter hebben jullie me altijd gesteund ook al begrepen jullie lang niet altijd waar mijn onderzoek over ging. Ik weet dat ook jullie trots op me zijn dat ik de eindstreep gehaald heb. Lieve schoonouders, Jan en Sjoukje, jullie wonen op een mooie, rustige plek. Dit zorgde ervoor dat ik me bij jullie altijd op mijn gemak voelde en even weg kon vluchten van alle drukte op het werk. Ik ben blij met jullie als schoonouders.

Tot slot, allerliefste Sjaak... wat had in zonder jou gemoeten! Jij kent me vaak nog beter dan ik mezelf ken. Als ik het even niet zag zitten was jij er voor mij, je toonde begrip en steunde me altijd. Je toverde een lach op mijn gezicht op de momenten dat het nodig was en je stuurde me achter mijn laptop om te zorgen dat dit proefschrift voltooid werd. Je zei altijd: 'je boekje kost je bloed, zweet en tranen' en dat heeft het zeker gedaan. Ondanks dat ik het je niet altijd gemakkelijk heb gemaakt, mag ik je inmiddels mijn man noemen en mogen we dit promotie avontuur als voltooid zien. Op naar de vele nieuwe avonturen die liggen te wachten!

