



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Factor VII-activating protease

*Unraveling the release and regulation of dead cell nuclear dumps*

Marsman, G.

#### Publication date

2017

#### Document Version

Other version

#### License

Other

[Link to publication](#)

#### Citation for published version (APA):

Marsman, G. (2017). *Factor VII-activating protease: Unraveling the release and regulation of dead cell nuclear dumps*. [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**

**Portfolio**

**Curriculum Vitae**

**Dankwoord**

## FACTOR VII-ACTIVATING PROTEASE: UNRAVELING THE RELEASE AND REGULATION OF DEAD CELL NUCLEAR DAMPS

### ENGLISH SUMMARY

During inflammation, extensive cell death occurs in the body as a result of toxins that are excreted by pathogens, or the activity of immune cells, mainly neutrophils, that combat pathogens by excreting anti-microbial proteins. In homeostasis, dead cells are cleared through phagocytosis by macrophages or neighboring cells. However, when the extent of cell death is higher than the clearance capacity of the body, intracellular molecules that have pro-inflammatory properties are released from dying cells into the extracellular environment. This group of pro-inflammatory molecules is known as damage-associated molecular patterns (DAMPs). Histones, double-stranded (dsDNA), and high-mobility group B1 (HMGB1), which form chromatin in the nucleus of living cells, are well known DAMPs. Despite the well-established understanding of the pro-inflammatory effects of DAMPs, it is not entirely clear how the release of DAMPs is regulated when dead cells are not cleared. In 2008, our group demonstrated that upon incubation of late apoptotic /secondary necrotic cells with plasma, 70-80% of the chromatin of these cells was released into the extracellular environment. One plasma protein was found to be responsible for this release: Factor VII-activating protease (FSAP). FSAP was shown to be activated upon incubation with late apoptotic and necrotic cells, and its activity resulted in the release of chromatin from late apoptotic cells. Moreover, plasma-purified FSAP was equally efficient as FSAP in plasma, and a neutralizing monoclonal anti-FSAP antibody was able to completely inhibit the release of chromatin by blocking the activation of FSAP in plasma. In this thesis, we have further unraveled the mechanism by which FSAP releases chromatin from dead cells.

In the nucleus of cells, DNA is organized in nucleosome complexes. A nucleosome consists of a protein core which is formed by an octamer of four histone subtypes, around which ~147 bp DNA is wrapped 1.67 times. In literature, little discrimination is made between the different forms in which histones may circulate; *i.e.* (DNA)-free histones or histones as part of a nucleosome complex. In **Chapter 2** we have provided an overview of the currently known extracellular effects of free histones and dsDNA, and have

compared these to the effects of nucleosomes. Given that the extracellular effects of histones, dsDNA, and nucleosomes are markedly different, it is important to recognize techniques that in their detection differentiate between these molecules in body fluids. Therefore, we have discussed the various assay methods currently available to detect histones, DNA, or nucleosomes in body fluids.

In **Chapter 3** we investigated whether FSAP in serum is involved in the release of chromatin from necrotic cells. We demonstrated that chromatin was released from necrotic cells through the cooperative activity of FSAP and DNase I in serum. During chromatin release from these cells, histone H1 was cleaved by FSAP, which preceded the fragmentation of chromatin by DNase I into oligo-nucleosome fragments.

Patients that suffer from systemic lupus erythematosus (SLE), have circulating antibodies directed against nuclear antigens such as histones, DNA, and nucleosomes. Given that FSAP releases chromatin from late apoptotic cells, and defective clearance of apoptotic cells has been implicated in disease pathogenesis, we investigated in **Chapter 4** whether chromatin release by FSAP is impaired in SLE patient sera. We found that the release of chromatin from late apoptotic cells was impaired in sera that were drawn during high disease activity, but not in sera drawn during low disease activity, and healthy donor sera. We subsequently demonstrated that the anti-nuclear antibodies that were present in high levels during high disease activity inhibited the release of chromatin from late apoptotic cells by FSAP. Finally, we showed that this inhibition was mediated by the ability of antibodies to cross-link antigens. Possibly, the formation of large immune complexes in late apoptotic cells hindered chromatin release by FSAP.

We previously established that FSAP degrades histone H1, and others found that histone H3 is also a substrate of FSAP. Given that histones are cytotoxic, we investigated in **Chapter 5** whether FSAP degrades all histone subtypes, and thereby protects against histone cytotoxicity. We showed that FSAP in serum was activated upon incubation with histones, and that these histones were subsequently degraded by FSAP, which protected against histone cytotoxicity. Histones that were part of a nucleosome complex were not cytotoxic, and did not induce strong activation of FSAP. Moreover, only histone H3 was partly cleaved in nucleosomes by FSAP. Circulating histones

are often implicated as important mediators of disease in inflammatory conditions, including sepsis. As free histones induced the activation of FSAP, and were subsequently degraded, we investigated the presence of free histones in the circulation in inflammatory disease. We specifically isolated free histones and nucleosomes from the serum of baboons that had been challenged with *E. coli*, and from serum of meningococcal disease patients. We found that free histones were not detectable in the sera of both the baboons and the meningococcal disease patients. All histones appeared to be part of nucleosomes. Moreover, histone H3 in the isolated nucleosomes was cleaved.

Given that FSAP degrades histones and that HMGB1, like histones, is a DNA binding protein with potent pro-inflammatory properties, we investigated in **Chapter 6** whether FSAP degrades HMGB1. We observed that activated plasma-purified FSAP indeed degraded HMGB1, but that FSAP in serum was not activated upon incubation with HMGB1. FSAP in serum is activated upon incubation with necrotic cells, and we demonstrated that HMGB1 that was released from necrotic cells was degraded by FSAP. Notably, degradation of HMGB1 by FSAP impaired HMGB1-mediated chemotaxis of 3T3 fibroblasts, which suggested that FSAP indeed mediated the pro-inflammatory effects of HMGB1. During major liver surgery, increased levels of HMGB1 were previously found in patients that had been exposed to ischemia-reperfusion (I/R) injury, when compared with patients that had not been exposed to I/R injury. We found that the levels of complexes formed by FSAP and alpha-2-antiplasmin (AP), a readout for FSAP activation, were also increased in patients that had been exposed to I/R injury. Furthermore, the decrease in HMGB1 (DHMGB1) levels observed between t=1 and t= 6 h after surgery correlated with FSAP-AP levels at t=1 h. These results support a role for FSAP in the regulation of HMGB1 levels *in vivo*.

Previous studies demonstrated that FSAP may bind to histones and that this binding results in the activation of FSAP. Furthermore, the auto-activation of FSAP may be potentiated by binding of FSAP to RNA. FSAP also binds to necrotic and late apoptotic cells, which results in the activation of FSAP. However, it is not known which molecules in dead cells play a role in the binding and activation of FSAP. Therefore, in **Chapter 7** we investigated the role of histones and RNA in dead cells in the binding and activation of FSAP. By means of confocal microscopy, imaging flow cytometry, and conventional

flow cytometry, we demonstrated that the binding of FSAP in serum to late apoptotic cells was markedly decreased when RNA had been digested prior to incubation with serum. Moreover, digestion of DNA, which results in the liberation of histones from chromatin, markedly increased the binding of FSAP to cells. In line with these results, the activation of FSAP was decreased upon RNA digestion, whilst FSAP activation was increased upon DNA digestion. We then fractionated late apoptotic cells to identify the cellular component responsible for the activation of FSAP. We found that only molecules present in the nucleus induced the activation of FSAP. The activation of FSAP induced by non-chromatin bound molecules was strongly inhibited upon RNA digestion, whilst the activation induced by chromatin bound molecules, mostly consisting of histones, was only sensitive to proteinase K incubation. Using purified histones and RNA we then demonstrated that RNA alone is not able to induce the activation of FSAP in serum whilst histones alone potently induce FSAP activation. However, we also found that RNA was able to significantly potentiate the activation of FSAP induced by histones. These results suggest that RNA and histones play cooperative roles in the activation of FSAP induced by dead cells.

Lastly, the results described in these thesis were summarized and discussed in **Chapter 8**. In conclusion, we show that FSAP regulates the release and degradation of important nuclear DAMPs from dead cells. Our results support an important role for FSAP in the regulation of inflammation in situations where the homeostatic clearance of dying cells has been compromised.

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Tijdens ontstekingsreacties vindt er in het lichaam veel celdood plaats ten gevolge van toxines die door pathogenen worden uitgescheiden of door de activiteit van immuuncellen, met name neutrofielen, die pathogenen bestrijden door het uitscheiden van anti-microbiële eiwitten. In homeostase worden dode cellen opgeruimd via fagocytose door macrofagen of door cellen die aan de stervende cel grenzen. Echter, als de hoeveelheid dode cellen tegen de grenzen aanloopt van de opruimcapaciteit van het lichaam, dan kunnen er intracellulaire moleculen vrijkomen die pro-inflammatoire eigenschappen hebben. Deze moleculen worden ook wel “damage-associated molecular patterns” (DAMPs) genoemd. Onder andere histonen, dubbelstrengs DNA (dsDNA) en high-mobility group B1 (HMGB1), die in de nucleus van een levende cel het chromatine vormen, behoren tot de DAMPs. Ondanks de gedegen kennis over de pro-inflammatoire effecten van deze moleculen is het niet geheel duidelijk hoe het vrijkomen van DAMPs gereguleerd wordt als dode cellen niet opgeruimd worden. In 2008 heeft onze groep beschreven dat incubatie van laat-apoptotische/secundair necrotische cellen in plasma leidt tot het vrijkomen van 70-80% van al het chromatine van deze cellen in de extracellulaire omgeving. Eén plasma-eiwit bleek verantwoordelijk voor het vrijkomen van chromatine: Factor VII-activerende protease (FSAP). FSAP raakte geactiveerd in plasma tijdens incubatie met laat-apoptotische of necrotische cellen en maakte vervolgens het chromatine van laat-apoptotische cellen vrij. Bovendien bleek plasma-gezuiverd FSAP net zo efficiënt te zijn in het vrijmaken van chromatine uit laat apoptotische cellen als FSAP in plasma en een monoklonale antistof die de activatie van FSAP remt bleek het vrijkomen van chromatine in plasma volledig te kunnen blokkeren. In dit proefschrift hebben wij het mechanisme waarmee FSAP chromatine vrijmaakt uit dode cellen verder ontrafeld.

In de celkern van levende cellen wordt het DNA georganiseerd in nucleosomen. Een nucleosoom bevat een eiwitkern die gevormd wordt door een octameer van vier verschillende histonsubtypes, waar omheen ~147 bp DNA 1.67 keer gewonden is. In de literatuur wordt weinig onderscheid gemaakt tussen de verschillende vormen waarin histonen in de circulatie voor zouden kunnen komen, oftewel als vrij histon of als onderdeel van een nucleosoom complex. In **hoofdstuk 2** hebben wij een literatuuroverzicht

gegeven van de verschillende effecten die extracellulaire histonen en DNA afzonderlijk van elkaar kunnen hebben, en hebben die effecten vergeleken met de huidige bekende extracellulaire effecten van nucleosomen. Aangezien deze moleculen verschillende effecten mediëren, is het belangrijk ze van elkaar te kunnen onderscheiden. Daarom hebben we tevens beschreven met welke verschillende technieken histonen, DNA of nucleosomen in lichaamsvloeistoffen gemeten kunnen worden.

In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of FSAP in serum betrokken is bij het vrijmaken van chromatine uit necrotische cellen. We hebben daar aangetoond dat chromatine uit necrotische cellen vrijgemaakt wordt door de gezamenlijke activiteit van FSAP en DNase I in serum. Tijdens het vrijkomen van chromatine uit deze cellen bleek histon H1 te worden gedegradeerd door FSAP en werd het chromatine van necrotische cellen door Dnase I tot oligonucleosoom fragmenten afgebroken.

Patiënten die lijden aan systemische lupus erythematosus (SLE), hebben antistoffen in de circulatie die gericht zijn tegen nucleaire antigenen zoals histonen, DNA en nucleosomen. Omdat FSAP chromatine uit laat-apoptotische cellen verwijdert, en daarmee mogelijk de opruiming van dit chromatine bevordert, hebben we in **hoofdstuk 4** onderzocht of het vrijmaken van chromatine door FSAP onderdrukt is in de sera van SLE patiënten. We hebben gevonden dat het vrijmaken van chromatine uit laat-apoptotische cellen geremd is in sera die afgenomen waren van patiënten tijdens hoge ziekte-activiteit. In sera die afgenomen waren tijdens lage ziekte-activiteit was het vrijmaken van chromatine uit laat-apoptotische cellen vergelijkbaar met gezonde donoren. We hebben vervolgens laten zien dat de anti-nucleaire antistoffen die in deze patiënten circuleren een remmend effect hebben op het vrijmaken van chromatine uit laat-apoptotische cellen door FSAP. We hebben ontdekt dat de remmende werking van deze antistoffen toegeschreven kan worden aan de eigenschap van deze antistoffen om antigenen in de kern van dode cellen te crosslinken, zodat ze niet door FSAP vrijgezet konden worden.

Omdat FSAP histon H1 degradeert en beschreven is dat histon H3 ook door FSAP gedegradeerd kan worden, hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht of FSAP alle histon subtypes degradeert en of deze degradatie beschermt tegen de cytotoxiciteit van histonen. We hebben laten zien dat FSAP in serum geactiveerd raakt tijdens de incubatie met histonen en dat deze histonen



vervolgens afgebroken worden door FSAP. Deze afbraak beschermt tegen de cytotoxiciteit van histonen. Histonen die onderdeel zijn van een nucleosoom complex bleken niet cytotoxisch, induceerden minder sterke FSAP activatie, en alleen histon H3 werd in het nucleosoom afgebroken. Circulerende vrije histonen worden in de literatuur vaak beschreven als belangrijke mediators van ontsteking, bijvoorbeeld tijdens sepsis. Omdat vrije histonen in serum FSAP activatie induceren en vervolgens afgebroken worden door FSAP, hebben we onderzocht of vrije histonen aanwezig waren in de sera van bavianen die een lethale dosis *E. coli* toegediend hebben gekregen en in de sera van patiënten die aan meningokokken sepsis lijden. Wij konden geen vrije histonen detecteren in zowel de bavianen als de patiënten, alle histonen in de onderzochte sera waren onderdeel van een nucleosoom complex. Daarnaast was histon H3 geknipt in de geïsoleerde nucleosomen.

Omdat FSAP vrije histonen afbreekt en HMGB1 net als histonen een DNA-bindend eiwit is met sterke pro-inflammatoire effecten, hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of FSAP HMGB1 afbreekt. We hebben geobserveerd dat actief FSAP HMGB1 afbreekt, maar in tegenstelling tot histonen raakt FSAP in serum niet geactiveerd tijdens incubatie met HMGB1. Het is bekend dat FSAP geactiveerd raakt tijdens incubatie met necrotische cellen en we hebben vervolgens aangetoond dat het HMGB1 dat vrijkomt uit necrotische cellen door FSAP in serum afgebroken wordt. De afbraakfragmenten van HMGB1 vertoonden geen chemotactische activiteit meer op muis 3T3 fibroblasten, wat suggereert dat FSAP de functie van HMGB1 in serum reguleert. Tijdens grote leveroperaties komt HMGB1 vrij uit dode cellen en uit een vorige studie is gebleken dat deze HMGB1 levels hoger waren in patiënten met ischemie-reperfusie (I/R) schade dan in patiënten zonder I/R schade. We hebben gevonden dat FSAP activatie levels ook hoger zijn in patiënten met I/R schade dan in patiënten zonder I/R schade en dat de hoogte van FSAP activatie op  $t = 1$  uur na de operatie correleerde met de afname van HMGB1 levels tussen  $t = 1$  uur en  $t = 6$  uur na de operatie. Deze resultaten ondersteunen een rol voor FSAP in de regulatie van HMGB1 levels *in vivo*.

Uit voorgaande studies is gebleken dat FSAP aan vrije histonen bindt en dat dit leidt tot de activatie van FSAP in serum. Daarnaast kan de (auto)-activiteit van FSAP gepotentieerd worden door binding van FSAP aan RNA. Ook bindt FSAP in serum aan laat-apoptotische en necrotische cellen en dit leidt

tot de activatie van FSAP. Omdat het niet bekend is welke moleculen in dode cellen verantwoordelijk zijn voor de binding en activatie van FSAP, hebben we in **hoofdstuk 7** de rol van histonen en RNA in de binding van FSAP door dode cellen onderzocht en gekeken welke rol zij spelen in de activatie van FSAP door dode cellen. We hebben door middel van confocale microscopie, imaging flow-cytometrie en conventionele flow-cytometrie laten zien dat FSAP vooral in het cytoplasma van laat-apoptotische cellen bindt en dat deze binding verdwijnt als de cellen voorbehandeld waren met RNase. Als de cellen voorbehandeld waren met DNase, wat histonen vrijzet uit chromatine, bleek de binding van FSAP verhoogd te zijn. In lijn met de gevonden binding van FSAP, was de activatie van FSAP na RNase voorbehandeling sterk verlaagd, terwijl deze juist verhoogd was na DNase voorbehandeling. RNA en histonen lijken dus een belangrijke rol te spelen bij de binding en activatie van FSAP door dode cellen. Na fractionering van laat-apoptotische cellen vonden wij dat alleen moleculen aanwezig in de celkern de activatie van FSAP konden induceren. De activatie geïnduceerd door niet-chromatine gebonden kernmoleculen werd gedeeltelijk verlaagd na RNase behandeling, terwijl de activatie geïnduceerd door chromatine-gebonden moleculen alleen gevoelig was voor behandeling met proteïnase K. Aangezien het belangrijkste gedeelte van de chromatine-gebonden eiwitten wordt gevormd door histonen, suggereren deze resultaten dat histonen belangrijk kunnen zijn voor de activatie van FSAP door dode cellen. In verdere experimenten bleek dat RNA in gezuiverde vorm geen FSAP activatie kon induceren in serum, maar wel de activatie geïnduceerd door histonen kon potentiëren. Histonen lijken een belangrijke rol te spelen in de inductie van FSAP activatie, en deze activatie lijkt te worden versterkt door de aanwezigheid van RNA.

Tot slot zijn alle resultaten van deze thesis in **hoofdstuk 8** samengevat en besproken. Wij hebben laten zien dat FSAP de vrijlating en de afbraak van belangrijke nucleaire DAMPS uit dode cellen reguleert. Onze resultaten ondersteunen een belangrijke rol voor FSAP in de regulatie van ontsteking tijdens situaties waarin de homeostatische opruiming van dode cellen gecompromitteerd is.

## LIST OF PUBLICATIONS

Stephan F\*, **Marsman G\***, Bakker LM, Bulder I, Stavenuiter F, Aarden LA, Zeerleder S.

Cooperation by Factor VII-activating protease (FSAP) and DNase I in release of nucleosomes from necrotic cells. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Mar;66(3):686-93

Keizer MP, Pouw RB, Kamp AM, Patiwaël S, **Marsman G**, Hart MH, Zeerleder S, Kuijpers TW & Wouters D

TFPI inhibits lectin pathway of complement activation by direct interaction with MASP-2

*Eur J Immunology* 2014;45:544-50

**Marsman G\***, Stephan F\*, de Leew K, Bulder I, Ruinard JT, de Jong J, Westra J, Bultink IEM, Voskuyl AE, Aarden LA, Luken BM, Kallenberg CGM, Zeerleder S.

FSAP-mediated nucleosome release from late apoptotic cells is inhibited by autoantibodies present in SLE. *Eur J Immunol* 2016;46:762-71

**Marsman G**, Zeerleder S, Luken BM

Histones, cell-free DNA, or nucleosomes: the immunity of extracellular chromatin unraveled

*Manuscript accepted for publication in Cell Death & Disease*

**Marsman G**, von Richthofen H, Bulder I, Lupu F, Hazelzet JA, Luken BM & Zeerleder S.

DNA and Factor VII-activating protease protect against the cytotoxicity of histones

*Submitted for publication*

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

*Cooperation of Factor VII-activating protease and serum Deoxyribonuclease I in release of nucleosomes from necrotic cells*

Arthritis Rheumatol. 2014 Mar;66(3):686-93

F. Stephan: study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript, final approval of the manuscript.

G. Marsman: study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript, final approval of the manuscript.

L.M. Bakker: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

I. Bulder: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

F. Stavenuiter: acquisition of data, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

L.A. Aarden: study concept and design, supervision of data analysis and interpretation, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

S. Zeerleder: study concept and design, supervision of data analysis and interpretation, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

*FSAP-mediated nucleosome release from late apoptotic cells is inhibited by autoantibodies present in SLE*

Eur J Immunol 2016;46:762-71

G. Marsman: study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript, final approval of the manuscript.

F. Stephan: study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript, final approval of the manuscript.

K. de Leeuw: acquisition of data, final approval of the manuscript.

I. Bulder: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

J.T. Ruinard: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

J. de Jong: acquisition of data, final approval of the manuscript.

J. Westra: study concept and design, acquisition of data, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

I.E.M. Bultink: study concept and design, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

A.E. Voskuyl: study concept and design, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

L.A. Aarden: study concept and design, supervision of data analysis and interpretation, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

B.M. Luken: study concept and design, supervision of data analysis and interpretation, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

C.G.M. Kallenberg: study concept and design, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

S. Zeerleder: study concept and design, supervision of data analysis and interpretation, critically reviewing the manuscript, final approval of the manuscript.

**PHD PORTFOLIO**

Name PhD student: Gerben Marsman  
 PhD period: 1 Okt 2011 – 30 Sept 2015  
 Promotors: Prof. Dr. SS Zeerleder  
 Prof. Dr. SM van Ham  
 Co-promotor: Dr. BM Luken

| <b>Courses</b>  | <b>Year</b> | <b>ECTS</b> |
|---|-------------|-------------|
| Scientific English Writing  | 2013        | 3           |
| Advanced Immunology   | 2012        | 2.9         |
| European Network of Immunology – Advanced Immunology Summerschool | 2012        | 1.75        |
| Apoptosis and targetable processes                                | 2011        | 2           |

| <b>Seminars, workshops &amp; master classes</b>   | <b>Year</b> | <b>ECTS</b> |
|---|-------------|-------------|
| Department meetings   | 2011-2015   | 5           |
| Journal club  | 2011-2015   | 2.5         |
| Landsteiner lectures and guest speaker seminars   | 2011-2015   | 5           |
| Gordon Research Seminar – Apoptotic cell Recognition & Clearance. Biddeford, Maine, The United States<br>Oral (2015)<br>Poster (2013) | 2015, 2013  | 2           |
| Sanquin Spring Seminar  | 2015        | 0.5         |
| Sanquin Science day, Posters  | 2014, 2012  | 1.5         |
| Masterclass Bjorn Dahlback<br>(Department of Translational Medicine, Lund University, Malmö, Sweden)                                  | 2015        | 0.2         |

| <b>Seminars, workshops &amp; master classes</b>   | <b>Year</b> | <b>ECTS</b> |
|---|-------------|-------------|
| Masterclass Arturo Zychlinsky<br>(Department of Cellular Microbiology, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany)                       | 2014        | 0.2         |
| Masterclass Paul Frenette<br>(Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine, New York, New York, The United States)                         | 2014        | 0.2         |
| Masterclass Jose Lopez<br>(Hematology and Biochemistry, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington, The United States)              | 2014        | 0.2         |
| Masterclass Ron Germain<br>(Laboratory of Systems Biology, National Institute for Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, The United States) | 2014        | 0.2         |
| Masterclass Søren Moestrup<br>(Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark)   | 2013        | 0.2         |
| Masterclass Klaus Preissner<br>(Department of Biochemistry, University of Giessen, Germany)   | 2013        | 0.2         |
| Masterclass James Huntington<br>(Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge, The United Kingdom)                                       | 2012        | 0.2         |
|   |             |             |
| <b>(Inter)national conferences</b>  | <b>Year</b> | <b>ECTS</b> |
| 7 <sup>th</sup> International Symposium DAMPS & HMGB1. Bonn, Germany<br>Oral  | 2015        | 1           |
| Gordon Research Conference – Apoptotic cell Recognition & Clearance. Biddeford, Maine, The United States<br>Poster (2013, 2015)                           | 2015, 2013  | 4           |

| <b>(Inter)national conferences</b>   | <b>Year</b>         | <b>ECTS</b> |
|--|---------------------|-------------|
| 9 <sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity<br>Nice, France<br>Oral   | 2014                | 2           |
| Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVVI).<br>Lunteren Symposium. Lunteren, The Netherlands<br>Posters            | 2014,2012           | 1           |
| Nederlandse Vereniging voor Immunologie (NVVI).<br>Winterschool. Noordwijkerhout, The Netherlands<br>Posters           | 2014,2013,2012,2011 | 2           |
| 24 <sup>th</sup> International Society on Thrombosis and<br>Haemostasis Congress. Amsterdam, The Netherlands<br>Poster | 2013                | 1           |
| Interactive Infection & Immunity retreat (Triple I).<br>Kameryck, The Netherlands<br>Orals                             | 2013, 2012          | 1           |
| 56 <sup>th</sup> Gesellschaft für Thrombose- und<br>Hämostaseforschung (GTH). St. Gallen, Switzerland<br>Poster        | 2012                | 1           |
| <b>Teaching</b>  | <b>Year</b>         | <b>ECTS</b> |
| Master Student: Helen J. von Richthofen (8 months)   | 2014-2015           | 2.5         |
| Bachelor Students UvA (6 weeks):<br>Daan Panneman, Juliette Postma   | 2013                | 1           |
| Practical course assistant – Immunology (Bachelor<br>Course)   | 2013,2012           | 1           |
| <b>Awards &amp; Prizes</b>   | <b>Year</b>         |             |
| ImmunoTools Award (€2500,-)  | 2014                |             |
| In-house Sanquin Seminar award (Runner-up)   | 2013                |             |



## CURRICULUM VITAE

Gerben Marsman werd op 1 december 1985 geboren te Zwolle. Hij groeide op in Hoorn, waar hij in 2004 zijn middelbare school diploma behaalde op het OSG West-Friesland. In datzelfde jaar begon hij aan zijn bachelor opleiding Biomedische wetenschappen aan de Universiteit van Amsterdam (UvA). Tijdens zijn bachelor volgde hij een korte stage aan het Nederlands Kanker Instituut (NKI) en schreef een miniscriptie over mantelcel lymfomen. Direct na zijn bachelor begon hij in 2007 aan de Medical Biology track van de



master Biomedical Sciences. Tijdens zijn master liep hij stage bij Dr. Maaike Stam en Prof. dr. Roel van Driel in de Nuclear Organisation Group (NOG) van de UvA, waar hij onderzoek deed naar het paramutatie systeem in mais en dat systeem probeerde over te zetten naar het *Arabidopsis Thaliana* plantmodel. Een tweede stage volgde hij op de afdeling Immunopathologie van Sanquin Research onder begeleiding van Dr. Jelle de Wit en Prof. dr. Marieke van Ham. In deze stage onderzocht hij de fagocytose van Salmonella door B-cellen en onderzocht hij hoe verschillende vormen van co-stimulatie een B-cel respons kunnen beïnvloeden. Ook schreef hij een scriptie onder begeleiding van Prof. dr. Marieke van Ham en Dr. Theo Rispens waarin hij de rol van immunoglobuline G4 tijdens de inductie van immuun tolerantie nader onderzocht. In 2011 ronde hij zijn master *cum laude* af en in datzelfde jaar begon hij onder begeleiding van Dr. Sacha Zeerleder, Prof. dr. Marieke van Ham, Prof. dr. Lucien Aarden en later ook Dr. Brenda Luken aan zijn promotieonderzoek op de afdeling Immunopathologie van Sanquin Research. Tijdens dit promotieonderzoek onderzocht hij het mechanisme waarmee Factor VII-activerend protease (FSAP) chromatine uit dode cellen vrijmaakt en gedeeltelijk afbreekt. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in het proefschrift dat hier voor u ligt.

**DANKWOORD**

Als dit de eerste woorden zijn die je leest, dan heeft het dankwoord-syndroom jou ook te pakken gehad. Shame on you! Blader maar even terug naar het begin. Maar anders: **Bedankt!** Want zonder jou had ik hier niet zo voldaan gezeten! Het waren vier fantastische jaren die ik zonder de mensen om mij heen, waaronder jij, niet op zo'n mooie manier had kunnen beleven. Ondanks het feit dat veel mensen betrokken zijn geweest bij het voltooien van deze academische opgave wil ik hieronder een aantal mensen in het bijzonder bedanken.

Sacha, mijn promotor, bedankt dat je me welkom heette in jouw groep en mij de vrijheid gaf mijn (soms ;- ) gekke ideeën uit te voeren. Ik heb enorm veel geleerd van jouw manier van denken, altijd weer vanuit een nieuw perspectief, jouw altijd kritische blik en jouw volhardendheid. Ook (of misschien juist) bij felle tegenstand. Je bleef me altijd stimuleren en uitdagen, en daarvoor heel veel dank! Als ik in Amsterdam ben gaan we zeker die gin-tonic drinken! Pröschtli!

Marieke, mijn promotor, jij hebt aan de basis gestaan van mijn wetenschappelijke carrière. Al tijdens mijn master-stage en thesis heeft jouw enthousiasme voor wetenschap en educatie mij enorm geïnspireerd en gestimuleerd. Ik ben dankbaar dat ik bij jou op de afdeling mijn PhD heb mogen doen en zowel op de werkvloer als daarnaast ben jij iemand die de wereld echt een stukje beter (en vrolijker!) maakt.

Brenda, mijn copromotor, zonder jou was dit boekje nooit zo snel afgekomen. Bedankt voor de begeleiding de afgelopen jaren en de enorme inzet die je tijdens de afronding had. Je bleef me altijd stimuleren om het net nog wat beter te doen en ook in de late uurtjes stond je altijd paraat!

Ingrid, bedankt voor de oerdegelijke opleiding en het vele werk in het lab. Van jou heb ik echt ongelooflijk veel geleerd. Jouw kritische blik heeft me altijd gestimuleerd vraagtekens te zetten bij behaalde resultaten en jouw nuchterheid spreekt boekdelen.

Lucien, bedankt voor alle wijsheid, creativiteit en gezelligheid. Jouw denkwijze in en over de wetenschap heeft mij sterk geïnspireerd en gemotiveerd en ik ben zeer dankbaar dat je er nog tot het einde van mijn PhD bij wilde zijn.

Femke, dankzij jou heb ik een vliegende start in het project gehad, waarvoor ik je erg dankbaar ben.

Marein, bedankt voor de gezellige periode in onze groep. Zowel binnen als buiten lab lagen wij als lange latten echt op één lijn.

Helen, je was de ideale master-student en zonder jou was ons histon-stuk nooit geworden wat het nu is. Wellicht tot in Berlijn!?

Kristof, dank voor de Vlaamse gezelligheid! NETs zijn cool, en ik hoop nog eens een goede duvel of kabouter met je te drinken.

Mijn paranimfen: Richard en Koen:

Richard, je bent een optimist, een echte wetenschapper en goede vriend. Jouw doorzettingsvermogen (of is het koppigheid ;-)) en jouw passie voor de wetenschap zijn een inspiratie. Daarnaast kan niemand zo goed eiwitten laten verdwijnen. Als 'bejaarde-AIO's' (wie had dat ooit gedacht?) hebben we veel kunnen delen het laatste jaar en ik hoop dat we dat in toekomst blijven doen. Bedankt voor de vele correcties (die #@\$% spaties!) in het manuscript, als ruil zit Factor H er uiteraard in ;-).

Koen, we kennen elkaar nu al bijna twintig jaar en we hebben veel grote momenten in ons leven gedeeld. Ik ben dankbaar dat ik jou met jouw humor, creativiteit en principes als goede vriend heb. Soms heeft de wetenschap een beetje humor nodig: "They've done studies, you know. 60 percent of the time, it works every time."

Gerard, bedankt voor jouw onvoorwaardelijke enthousiasme voor de wetenschap en een altijd-luisterend oor. Na 'een bakkie' lagen er weer meer ideeën op tafel (uiteraard ook slechte, but I'm not pointing fingers here ;-)) dan welletjes in een plaat. Je bent een onmisbaar persoon voor het lab, al zal de ELISA-wasser het daar niet altijd mee eens zijn ;-).

Jolanda, als jonge Bachelor student heb je met jouw enthousiasme een diepe indruk op mij gemaakt en zonder jou was ik nooit in de immunologie en op Sanquin beland. Je enthousiasme is aanstekelijk en je passie voor educatie is goud waard. Dank voor alle mooie jaren als practicum-assistent op het Science Park!

Fatima, zonder jou zou de afdeling ophouden te bestaan, je staat altijd paraat voor iedereen. Bedankt voor alle goede zorgen en al het geregeld omtrent mijn promotie en verdediging.

Alle AIO's (oud en nieuw): Jelle (bedankt voor mijn fantastische laatste master-

stage, een betere begeleider/Boney M. had ik me niet kunnen wensen), Pauline, Martine, Mateusz, Mischa, Lotte, Femke, Iwan, Sonja, Laura, Richard, Anouk, Willem, Sanne, Peter-Paul, Karin, Anna & Anna, Anno, Astrid, Mieke, Saskia, Twan, Inge, Lea. Bedankt voor alle gezelligheid! We zijn vanuit U0 (sinds wanneer zijn 40 AIO's in één ruimte een goed idee?), via de AIO-cave op U1 in de tuin van U2 geëindigd, wanneer gaat het dak eraf!? Zonder jullie was het AIO leventje maar saai geweest, de playbackshows kaal, de vrijdagmiddagen droog (don't do it Laura!), de pop-quizen te nuchter en star wars nog steeds even goed (sorry). Ik hoop de meesten van jullie nog regelmatig te zien in Nederland, maar de deur staat hier altijd open voor jullie!

De rest van de afdeling: Theo, Robbert, Anja, Gertjan, Diana, Rob, Dörte, Irma, Henk, Karien, Annelies, Marja, Mieke, Laura, Ninotska, Miranda, Margreet, Marlieke, Tineke, Angela, Simone, Pleuni, Dorina, Gijs, Ellen en Kaoutar, bedankt! Jullie vormen een warme en fijne afdeling!

Mijn ouders, Jan en Francine, bedankt voor de vrijheid en de onvoorwaardelijke steun en liefde die jullie mij altijd hebben gegeven. Mijn zusje en broertje, Judith en Casper: mensen zijn nog altijd verbaasd als ze horen dat we alle drie de biomedische wetenschappen in zijn gedoken. Al wonen we allemaal in verschillende landen, we blijven elkaar inspireren en ik weet dat we er altijd voor elkaar zullen zijn. Wellicht ooit nog een Marsman, Marsman & Marsman stukje schrijven? ;-).

Tot slot, Lena, als er zoiets bestaat als een paranimf, dan ben jij mijn hoofdnimf. Jij hebt ervoor gezorgd dat de laatste periode van mijn PhD de leukste was die iemand zich kan wensen. Dank voor al jouw steun, jouw inspiratie, jouw humor en jouw relativering. Op naar ons volgende avontuur!