

# Morphological aspects of the loss of phospholipid asymmetry of the cell membrane

## Citation for published version (APA):

Stuart, M. C. A. (1998). *Morphological aspects of the loss of phospholipid asymmetry of the cell membrane*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19981030ms>

## Document status and date:

Published: 01/01/1998

## DOI:

[10.26481/dis.19981030ms](https://doi.org/10.26481/dis.19981030ms)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## Summary

The cell membrane separates the interior from the exterior of the cell. Communication of the cell with the outside world goes via the cell membrane, uptake of nutrients as well as the receiving signals. The cell membrane of all cells have a common architecture. Phospholipids, the building blocks, form a bilayer in which proteins are embedded. There are different classes of phospholipids which are not symmetrical distributed over the two halves of the membrane. The choline phospholipids (phosphatidylcholine, PC and sphingomyelin, Sph) are predominantly located in the outer half of the lipid bilayer. From the amino-phospholipids is phosphatidylethanolamine (PE) predominantly and phosphatidylserine (PS) exclusively located in the inner half of the lipid bilayer. This asymmetric distribution is maintained by the aminophospholipid translocase. However, the asymmetric distribution of phospholipids over the plasma membrane can be partially or completely abolished when cell are stimulated (loss of phospholipid asymmetry). Loss of membrane phospholipid asymmetry is accompanied by a number of biochemical and morphological alterations in the stimulated cell. The most important morphological alteration is the formation of membrane blebs, which are pinched off from the membrane. An overview of the loss of membrane asymmetry is given in chapter 1. In this thesis three models are investigated with respect to their morphological alterations and to the loss of membrane asymmetry. The aim of these studies was to investigate the relation between morphological changes and previously described biochemical alterations.

The perspectives and limitations of cryo-electron microscopy are outlined in chapter 2 and illustrated on liposomes and whole cells (blood platelets). Furthermore loss of membrane asymmetry is visualised with a combination of cryo-electron microscopy and cytochemical labelling of PS with coated gold particles. Cryo-electron microscopy was found to be very suitable for the observation of aqueous suspensions of phospholipids and to trap fast changes such as phase changes. For the observation of complete cells the specimen penetration by the electron beam was a limiting factor, not the resolution. The use of higher acceleration voltages (e.g. 300 kV instead of 120 kV) could overcome this problem. Dynamic changes of the structure of cells could be (physically) fixed as was demonstrated by the activation of blood platelets. Activated platelets form many membrane blebs which are pinched off from the membrane. Localisation of the loss of membrane asymmetry by coagulation factor Va coupled to gold particles could only be performed when concessions were made to the speed of the method. Furthermore the localisation of PS in this way was difficult to reproduce due to instability of the Va-gold complex. The results however, clearly show a local difference in PS exposition. Membrane vesicles are densely labelled whereas the platelet itself was not labelled.

Annexin V, a phospholipid binding protein with a high affinity for PS, is a suitable probe for the detection of loss of membrane asymmetry at the electron microscopic

---

level. However all binding studies used optimal conditions whereas we wanted to use annexin V at more physiological conditions. We therefore had to look for a method to characterise the binding properties at physiological conditions. In chapter 3 annexin V binding to membranes with various composition was studied. Hollow glass beads (2-20  $\mu\text{m}$ ) were coated with phospholipid bilayers. With the use of fluorescent annexin V binding could be measured in a flow cytometer. Annexin V binding to PC bilayers was found to increase rapidly with increasing amounts of PS (2-5%). As from about 6% PS the binding reaches a plateau. The addition of PE to the bilayer renders the system to be more sensitive for PS. Sphingomyelin has no effect on the binding of annexin V to the phospholipid bilayer. Cholesterol on the other hand has a negative influence on the binding of annexin V.

In chapter 4 is a method described for vitrification (rapid cooling without the formation of ice crystals) of activated blood platelets in the presence of annexin V. After freeze substitution and embedding in a plastic sections were made on which annexin V can be localized with immuno cytochemistry. Platelets activated with calcium ionophore, a strong activator, loose their membrane asymmetry almost instantly, as seen by labelling of all the membranes. Platelets activated with thrombin (coagulation factor IIa) in combination with thapsigargin, a calcium ATPase inhibitor, only loose their membrane asymmetry on vesicles derived from and pinched off from the plasma membrane. The cellular material could be divided into three sub-populations; intact platelets, "empty" remnants from activated platelets and micro-vesicles. The micro-vesicles and the empty remnants were always found positively labelled, whereas in the intact platelets the asymmetric distribution of phospholipids remained intact. Blood platelets have an extended internal network of cell membrane invaginations (open canalicular system). Upon activation micro-vesicles were found trapped in the open canalicular system. The microvesicles had lost their membrane asymmetry whereas the membrane from which these micro-vesicles are derived maintained the asymmetric distribution of phospholipids.

The second model of cell activation is the programmed suicide (apoptosis) of thymocytes. Apoptosis was induced by treating the thymocytes with dexamethasone. The course of the apoptosis was followed by flow cytometry with fluorescent annexin V as a marker for the loss of membrane asymmetry. Simultaneously the accessibility of the nucleus for propidium iodide was measured. Morphological changes were again studied in combination with the ultrastructural localisation of the loss of membrane asymmetry (chapter 5). As a result of the apoptotic process micro-vesicles are pinched off from the membrane with lost membrane asymmetry. The thymocytes remain there asymmetric distribution of phospholipids until the nucleus changes dramatically. At that moment the cell membrane becomes positively labelled for annexin V. Later in the apoptotic process the thymocytes disintegrate into apoptotic bodies.

The third model describes the loss of phospholipid asymmetry of myocytes as the result of an ischemic period (chapter 6). Both at light an electron microscopic level loss of membrane asymmetry of the myocytes was observed. Although it is known that myocytes partially loose their PE asymmetry during early stages of ischemia, no annexin V binding could be detected on the cells. Only membrane derived vesicles showed annexin V binding during early stages of ischemia. After prolonged ischemia

---

the myocytes loss their membrane integrity and an overall annexin V binding was observed.

In conclusion, loss of membrane phospholipid asymmetry is a local phenomenon, restricted to micro-vesicles, during the early stages of cell activation.

---

## Samenvatting

De celmembraan vormt de afscheiding tussen binnen en buiten de cel. Ieder contact van de cel met de buiten wereld verloopt via de celmembraan, of het nu gaat om opname van voedingsstoffen of het ontvangen van signalen. De membranen van alle cellen zijn opgebouwd volgens hetzelfde basis principe. Fosfolipiden, de basis bouwstenen, vormen een dubbel-laag (bilaag) waarin eiwitten zijn ingebed. Er bestaan verschillende klassen van fosfolipiden en deze zijn niet symmetrisch over de twee helften van de membraan verdeeld. Zo komen de choline fosfolipiden (phosphatidylcholine, PC en sphingomyeline) komen voornamelijk voor in de buitenste helft van de lipiden bilaag. Van de amino-fosfolipiden (phosphatidylserine, PS en phosphatidylethanolamine, PE) komt PE voornamelijk en PS uitsluitend voor in de binnenste helft van de lipiden bilaag. Deze asymmetrische verdeling wordt in stand gehouden door amino-fosfolipiden translocase. Echter, door cel-activatie kan de asymmetrische verdeling van de verschillende fosfolipiden klassen verstoord raken, we spreken dan van verlies van membraanasymmetrie. Verlies van membraanasymmetrie gaat gepaard met een groot aantal biochemische en morfologische veranderingen in de geactiveerde cel. De belangrijkste morfologische verandering is de vorming van membraanvesikels, die afgesnoerd worden. Een overzicht van membraanasymmetrie en verlies van membraanasymmetrie wordt in hoofdstuk 1 gegeven. In dit proefschrift wordt bij een aantal modellen van cel-activatie gekeken naar de morfologische veranderingen en naar het verlies van membraanasymmetrie. Het doel is een verband te leggen tussen de morfologische veranderingen en eerder beschreven biochemische veranderingen.

In hoofdstuk 2 worden de mogelijkheden en de grenzen van cryo-elektronen-microscopie beschreven aan de hand van een liposoom en een hele cel (bloedplaatjes) model. Tevens wordt een eerste poging ondernomen om verlies van membraanasymmetrie zichtbaar te maken in een combinatie van cryo-elektronenmicroscopie en cytochemische labeling van PS met behulp van gecoate goud bolletjes. Cryo-elektronenmicroscopie blijkt uitermate geschikt voor de observatie van waterige oplossingen van fosfolipiden en voor het vast leggen van snelle veranderingen zoals fase veranderingen. Voor het bekijken van hele cellen is niet zozeer het oplossend vermogen een beperkende factor als wel de doordringbaarheid van het (dikke) preparaat voor elektronen. Het gebruik van hogere versnel spanningen (300 kV in plaats van 120 kV) kan hiervoor uitkomst bieden. Ook dynamische structuur veranderingen kunnen goed worden vast gelegd zoals gedemonstreerd wordt aan de hand van de activatie van bloed plaatjes. Geactiveerde bloed plaatjes vormen grote hoeveelheden membraan vesikels die afgesnoerd worden. Lokalisatie van verlies van membraan asymmetrie met behulp van stol factor Va, dat sterk bind aan membraan oppervlakken met PS, gekoppeld aan goudbolletjes bleek alleen mogelijk indien concessies gedaan werden aan de snelheid van de methoden. Bovendien was deze methoden moeilijk reproduceerbaar door instabiliteit van het Va-goud complex. De

---

resultaten die verkregen zijn laten duidelijk lokale verschillen zien in PS expositie. Met name de membraan vesikels zijn sterk gelabeld terwijl het plaatje zelf niet gelabeld is.

Annexine V, een fosfolipiden bindend eiwit met een hoge affiniteit voor PS, bleek een geschikte probe voor het opsporen van verlies van membraanasymmetrie op electronenmicroscopisch niveau. Aangezien alle bekende bindings studies uitgaan van optimale bindings condities en niet van fysiologische condities, moest gezocht worden naar een mogelijkheid om onder fysiologische omstandigheden de bindings-eigenschappen te meten. In hoofdstuk 3 wordt de binding van annexine V aan membraan oppervlakken van verschillende samenstelling gemeten. Dit gebeurt door kleine holle glasbolletjes van 2-20  $\mu\text{m}$  te coaten met een (fosfo)lipiden dubbel-laag. Met behulp van fluorescerende annexine V kan vervolgens in een flow cytometer de binding worden gemeten aan deze glasbolletjes. Annexine V binding aan PC bilagen blijkt snel toe te nemen bij toenemende hoeveelheden PS (2-5%). Vanaf ongeveer 6 % PS wordt een plateau in de binding bereikt. Toevoeging van PE aan de bilaag heeft tot gevolg dat het systeem nog gevoeliger op PS reageert. Sphingomyeline heeft geen effect op de binding van annexine V. Cholesterol daaren tegen heeft een nadelige invloed op de binding van annexine V aan bi-lagen.

In hoofdstuk 4 wordt beschreven hoe geactiveerde bloedplaatjes in aanwezigheid van annexine V worden gevitriciseerd (heel snel afgekoeld, zonder vorming van ijs-kristallen). Na vries-substitutie en inbedding in een plastic kunnen van de cellen ultradunne coupes worden gemaakt waarop via immuno-cytochemie annexine V kan worden gelokaliseerd. Wanneer de plaatjes geactiveerd zijn met ionofoor, een zeer krachtige activator, blijken de cellen zeer snel hun membraanasymmetrie te verliezen, wat in de electronenmicroscop gezien wordt als labeling op de membranen. Indien de plaatjes worden geactiveerd met thrombine (stol-factor IIa) in combinatie met de calcium ATPase remmer thapsigargine blijken tijdens de begin fasen van de activatie uitsluitend de afgesnoerde membraanvesikels gelabeld. Verder kan het celpreparaat duidelijk in drie sub-populaties worden onderverdeeld; te weten, min of meer intacte plaatjes, lege achterblijfsels van (uit-)geactiveerde plaatjes en afgesnoerde microvesikels. De microvesikels en de lege achterblijfsels werden ten alle tijden positief bevonden, terwijl de min of meer intacte plaatjes hun membraanasymmetrie behouden hadden (niet gelabeld). Bloedplaatjes bezitten een uitgebreid en vertakt inwendig netwerk van insnoeringen van de celmembraan (; het open canaliculaire systeem). Na activatie werden ook in dit deel van de celmembraan afgesnoerde vesikels gevonden en deze microvesikels bleken hun membraanasymmetrie verloren te hebben. De membraan van het plaatje waarvan de vesikels kennelijk afkomstig zijn had de asymmetrische verdeling van fosfolipiden behouden.

Het tweede model van cel activatie is de "milde" geprogrammeerde zelfdood (apoptose) van thymocyten (lymfocyten afkomstig uit de zwezerik). Apoptose werd geïnduceerd bij thymocyten door deze te behandelen met dexamethasone. Het verloop van de apoptose (kinetiek) kon met behulp van een flow cytometer gevolgd worden aan de hand van verlies van membraan asymmetrie door middel van fluorescerend annexine V. Simultaan werd gemeten of de celkernen van buitenaf gelabeld konden worden met propidium iodide, een kleuring die aangeeft of de celmembraan functioneel is. Morfologische veranderingen werden bestudeerd in combinatie met de

---

eerder genoemde immunocytochemie voor de (ultrastructurele-)lokalisatie van verlies van membraanasymmetrie (hoofdstuk 5). Als gevolg van de apoptose snoeren de thymocyten membraanvesikels af die hun membraanasymmetrie verloren hebben. De thymocyt zelf behoudt de asymmetrische verdeling van fosfolipiden tot dat ook de kern sterk verandert. Op dat moment wordt ook de celmembraan van de thymocyt positief gelabeld. In een later stadium begint de cel te desintegreren tot apoptotische bodies.

Het derde en laatst gehanteerde model beschrijft het verlies van membraan asymmetrie in hartspiercellen (hoofdstuk 6) als gevolg van een zuurstof loze periode (na gebootsste ischemie). Zowel op licht- als elektronenmicroscopische niveau werd gekeken naar het verlies van membraanasymmetrie met behulp van annexine V. Hoewel bekend is dat myocyten in de vroege fasen van nagebootste ischemie hun fosphatidylethanolamine asymmetrie gedeeltelijk verliezen vindt er aan de cel geen annexine binding plaats. Tijdens deze vroege fasen vindt uitsluitend annexine binding plaats aan door de membraan afgesnoerde vesikels die ook hun fosphatidylserine asymmetrie verloren hebben. Na langdurige ischemie verliezen de cellen hun integriteit en vind er aan de hele celmembraan binding van annexine V plaats.

Concluderend kunnen we stellen dat het verlies van membraanasymmetrie tijdens de vroege fasen van de stimulatie van de onderzochten cellulaire systemen strikt lokaal is en beperkt blijft tot kleine (elektronenmicroscopisch waarneembare) afgesnoerde membraanvesikels.