

# Phospholipid flip-flop in activated platelets

## Citation for published version (APA):

Comfurius, P. (1989). *Phospholipid flip-flop in activated platelets*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19890922pc>

## Document status and date:

Published: 01/01/1989

## DOI:

[10.26481/dis.19890922pc](https://doi.org/10.26481/dis.19890922pc)

## 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.

Since long it is known that blood cells as well as other cell types possess a plasma membrane which is composed of a bilayer of phospholipids. These phospholipids are non-randomly distributed over the two halves of the bilayer, the monolayers. Choline-containing species are predominantly located in the outer monolayer, while amino-phospholipids mainly reside in the inner monolayer. This asymmetric distribution is correlated with the process of blood coagulation since several reactions of the coagulation cascade are speeded up in the presence of a suitable phospholipid surface and the lipid which is most active in stimulating clotting reactions, phosphatidylserine, is in all cells almost exclusively present in the inner monolayer. Thus, these cells are virtually ineffective in stimulating coagulation (chapter 2). One cell type, namely the blood platelet, is capable of undergoing a massive transport of the procoagulant lipid phosphatidylserine from inner to outer monolayer upon stimulation. Such a stimulation occurs when the endothelial cells, which are lining vessel walls, are damaged, thereby exposing subendothelial structures to the bloodstream. To collagen fibrils, which are present in the subendothelium, blood platelets adhere and become activated. If these platelets are at the same time triggered by the first traces of thrombin, formed as the result of initiation of the coagulation cascade, they become procoagulant. In this form they very efficiently catalyze several reactions of the coagulation cascade, resulting in a strong positive feedback. It is shown that generation of a procoagulant surface is the result of transbilayer movement (flip-flop) of phosphatidylserine (chapter 4). No protein receptors could be demonstrated to play a role in binding of clotting factors to the platelet surface, supporting the notion that the procoagulant nature of the platelet surface is determined solely by phospholipids (chapter 3). Also platelet aggregation and release reaction were shown not to be involved in the generation of procoagulant activity (chapter 5). To our present knowledge platelets can be activated to become procoagulant in two general ways: on the one hand by an increase in intracellular calcium concentration, on the other by modification of internal free SH-groups. Both phenomena appear to produce a common result: modification of the intracellular protein matrix, the cytoskeleton. When intracellular calcium increases, as for instance effected by Ca-ionophore, proteolytic digestion by the endogenous Ca-dependent enzyme calpain leads to disruption of the cytoskeletal structure. Incubation of the cells with diamide, which crosslinks free SH-groups, results in changes in the topology of the cytoskeleton. It is shown that a correlation exists between modification of the cytoskeleton and the occurrence of PS flip-flop

(chapter 7) which has been confirmed using various experimental setups.

However, although a direct interaction is demonstrated between isolated cytoskeleton and PS-vesicles in binding experiments, it appeared impossible to show a change in the binding parameters of this interaction after modifying the cytoskeleton with either calpain or diamide (chapter 8). The latter observation excludes the possibility that flip-flop of PS takes place as a mere result of changes in the cytoskeleton leading to a loss in its capacity to interact with this lipid.

This thesis ends with the presentation of a putative model which endeavours to explain the role of the cytoskeleton in both the maintenance of phosphatidylserine asymmetry in cells and the rapid loss of this asymmetric distribution by flip-flop, which is suggested to be a property unique to blood platelets.

## SAMENVATTING.

Het is reeds lang bekend dat cellen, waaronder ook de cellen die in het bloed voorkomen, omgeven worden door een plasmamembraan die is opgebouwd uit een dubbellaag van fosfolipiden. Deze fosfolipiden zijn niet willekeurig verdeeld over de twee helften van de bilaag, de monolagen. Cholinehoudende lipiden zijn voornamelijk gelokaliseerd in de buitenste monolaag, terwijl de aminohoudende fosfolipiden de meerderheid van de binnenste monolaag uitmaken. Deze asymmetrische verdeling staat rechtstreeks in verband met het bloedstollingsproces aangezien verschillende reacties van de stollingscaskade versneld worden door de aanwezigheid van een geschikt fosfolipidoppervlak en het lipid wat het meest actief is in het stimuleren van de stollingsreacties, fosfatidylserine, in alle cellen gelokaliseerd is in de binnenste monolaag. Als gevolg hiervan zijn cellen niet actief in de stolling (hoofdstuk 2). Een celtype, namelijk de bloedplaatjes, is in staat, na aktivatie, een massaal transport te bewerkstelligen van het procoagulante lipid fosfatidylserine van de binnenste naar de buitenste monolaag van de celmembraan. Een dergelijke stimulatie van het bloedplaatje treedt op wanneer de endotheelcellen, die de vaatwand bekleden, beschadigd worden. Bloedplaatjes hechten aan collageenvezels in het onderliggende subendotheel en worden daardoor geactiveerd. Als deze plaatjes tezelfdertijd worden gestimuleerd door de eerste spoortjes thrombine, die ontstaan als gevolg van het stimuleren van de stolling, worden ze procoagulant. In deze toestand zijn zij in staat zeer efficiënt verschillende reacties van de stollings cascade te stimuleren, wat resulteert in een sterke positieve terugkoppeling. Er wordt aangetoond dat het ontstaan van een procoagulant oppervlak het gevolg is van transbilaag beweging (flip-flop) van fosfatidylserine (hoofdstuk 4). Er kon geen aanwijzing worden gevonden voor een eventuele betrokkenheid van eiwit receptors in de binding van stolfactoren aan het oppervlak van bloedplaatjes, wat het idee ondersteund dat het procoagulante karakter van een celoppervlak uitsluitend wordt bepaald door de daarin aanwezige fosfolipiden (hoofdstuk 3). Ook van de aggregatie van bloedplaatjes en de releasereactie werd aangetoond dat deze niet noodzakelijk zijn voor de vorming van een procoagulant oppervlak (hoofdstuk 5).

Voor zover nu bekend is, kunnen plaatjes op twee algemene manieren geactiveerd worden zodanig dat een procoagulant oppervlak wordt gevormd: enerzijds door verhoging van de interne calciumconcentratie, anderzijds door modificatie van intracellulaire vrije SH-groepen.

Beide fenomenen blijken te leiden tot een gemeenschappelijk resultaat: de intracellulaire eiwitmatrix, het cytoskelet, wordt gemodificeerd. Als de intracellulaire calciumconcentratie toeneemt, zoals b.v. wordt veroorzaakt

door een Ca-ionophoor, zal door aktivatie van het endogene Ca-afhankelijke enzym calpaine proteolytische afbraak van cytoskelet eiwitten leiden tot ontbinding van de structuur van het cytoskelet. Inkubatie van de cellen met diamide, een reagens wat crosslinking van SH-groepen teweegbrengt, resulteert in veranderingen in de ruimtelijke structuur van het cytoskelet. Er wordt aangetoond dat er een korrelatie bestaat tussen modificatie van het cytoskelet en het optreden van PS flip-flop (hoofdstuk 7), wat onder diverse experimentele omstandigheden later bevestigd kon worden.

Toch, hoewel in bindingsexperimenten een direkte interactie gedemonstreerd wordt tussen geïsoleerd cytoskelet en PS-vesicles (hoofdstuk 8), bleek het onmogelijk een verandering in de eigenschappen van deze interactie aan te tonen na modificatie van het cytoskelet met hetzij calpaine of diamide. Deze laatste observatie sluit uit dat flip-flop van PS tijdens aktivatie van bloedplaatjes een rechtstreeks gevolg is van een verandering van de capaciteit van het cytoskelet om PS te binden.

Dit proefschrift besluit met het poneren van een model dat poogt de rol te verduidelijken van het cytoskelet in zowel het handhaven van de asymmetrische verdeling van fosfatidylserine als ook het verlies van asymmetrie, wat een fenomeen is dat mogelijk slechts in bloedplaatjes voorkomt.