

# Generation of procoagulant activity in blood cells : studies on the process of lipid scrambling

## Citation for published version (APA):

Wolfs, J. L. N. (2009). *Generation of procoagulant activity in blood cells : studies on the process of lipid scrambling*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20090910jw>

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## DOI:

[10.26481/dis.20090910jw](https://doi.org/10.26481/dis.20090910jw)

## 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**

## Summary

The plasma membrane of eukaryotic cells consists of two monolayers that differ in phospholipid composition. The outer leaflet comprises the majority of the choline-containing phospholipids, phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM), whereas the aminophospholipids, phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) are almost exclusively present in the inner leaflet. The importance of this asymmetric lipid distribution can be deduced from the fact that the cell spends energy for its maintenance, since changes in the lipid composition of the membrane surface may have important physiological consequences. Lipid asymmetry is maintained by at least two different transport proteins: 1. the aminophospholipid translocase, responsible for a specific inward directed transport of the aminophospholipids, PS and PE, and 2. the so-called floppase, a protein that facilitates outward directed lipid transport. The latter is not selective with respect to the polar headgroup of the lipids and transport occurs with a much longer  $t_{1/2}$  than that of the aminophospholipid translocase. Spontaneous transbilayer movement of phospholipids is extremely slow with a  $t_{1/2}$  ranging from hours to days. As a consequence, lipid asymmetry is relatively stable and the activity of the aminophospholipid translocase is mainly required to restore lipid asymmetry that is compromised by membrane fusion processes during exo- and endocytosis. Another protein, called scramblase, facilitates migration of lipids across the plasma membrane in both directions, irrespective of the polar headgroup of the lipid molecule. Phospholipid scramblase is inactive in quiescent cells. Calcium ions play a pivotal role in collapse of membrane lipid asymmetry: scramblase is activated by a sustained elevation of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, whereas the aminophospholipid translocase under these conditions is inhibited.

The most prominent feature of a collapse of transbilayer lipid asymmetry is the exposure of PS at the exofacial surface of the plasma membrane. Surface-exposed PS, in particular in blood platelets, is crucial for normal haemostasis. PS-containing membranes provide a catalytic surface (procoagulant surface) for the assembly of enzyme complexes (a.o. the prothrombinase complex) of the coagulation cascade, thus accelerating fibrin formation to ensure a localised control of the haemostatic process. In addition to this important physiological function restricted to blood coagulation, surface exposed PS serves a broader function as a recognition signal

for the removal of apoptotic cells and in facilitating cell-cell interactions as part of fusion processes developing tissues.

Because of its critical dependence on the presence of PS, and its convenience to measure, the prothrombinase activity (procoagulant activity) is routinely used to detect PS exposure. However, the prothrombinase assay measures PS exposure in total cell suspensions. This implies that an increased prothrombinase activity may be caused either by an increased PS exposure in each cell of the suspension or by an increase in the number of cells that expose PS (or a combination of both). In **chapter 2**, we have studied the platelet procoagulant response in more detail with respect to the level of PS exposure per platelet using flow cytometry. The results of these studies indicate that after activation with various agonists, two platelet fractions can be distinguished, a PS-positive fraction and a PS-negative fraction. The extent of PS exposure in the PS-positive fraction is comparable to that of platelets activated with  $\text{Ca}^{2+}$  - ionophore (i.e. maximal PS-exposition). The size of the PS-exposing fraction appears to be dependent on the type of agonist. This size increases with time and is proportional to the procoagulant activity of the total suspension. Our studies also revealed that in the subfraction of PS-exposing platelets, scramblase is fully active whereas translocase activity is completely inhibited. Translocase activity was only present in the platelet fraction that did not expose PS. Platelets with an intermediate PS exposure, positioned between that of control and  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore stimulated platelets, could not be observed. These observations do not support the hypothesis that a gradual shift in the balance between translocase and scramblase activity is responsible for the extent of PS exposure and consequently the platelet procoagulant activity. In **chapter 3** we describe the influence of erythrocyte morphology on the scrambling process. Simultaneous to lipid scrambling, treatment of erythrocytes with  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore initiates a number of other phenomena such as cell shrinkage, morphological changes, membrane blebbing and shedding of microvesicles, small cell fragments surrounded by plasma membrane. The morphological changes involve a transition from a biconcave shape to an echinocyte shape, characterized by spiculated protrusions. A possible explanation for this change in shape is based on the 'coupled bilayer hypothesis' proposed by Sheetz and Singer, stating that a change in lipid mass between the two leaflets of a membrane induces bending of the membrane. According to this principle, a mass excess in the outer leaflet causes the membrane to exfoliate resulting in formation of spikes

(echinocyte), whereas a mass excess in the inner leaflet results in invagination of the membrane leading to formation of stomatocytes. Previous studies, in which the rates of inward and outward movement of various lipids during the scrambling process were measured, have demonstrated that the rate of outward movement of aminophospholipids exceeds that of the inward movement of sphingomyelin. This difference in rate of inward and outward lipid migration leads to a mass excess in the outer leaflet of the membrane resulting in formation of echinocytes and subsequent shedding of microvesicles. Based on the foregoing, it was hypothesized that compounds (pharmaca) which incorporate in the outer leaflet (so-called crenators) or in the inner leaflet (cup formers) may affect the scrambling process. Two possibilities seem likely: on the one hand, incorporation of material in the inner leaflet may generate a driving force accelerating aminophospholipids to migrate outward, whereas an excess of mass in the outer leaflet may inhibit aminophospholipids to gain access to the outer leaflet. On the other hand, shedding of microvesicles could be rate limiting to the scrambling process; in this view, echinocytes treated with  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore will lose lipid asymmetry more readily because of their 'natural ability' to form microvesicles, whereas in stomatocytes this process will be delayed due to the mass excess in the inner leaflet. To investigate which of these two alternatives is the most probable, we have used various crenators and cupformers and studied the rate of scrambling measured as development of a procoagulant surface. It was found that in comparison to normocytes, rate of lipid scrambling was enhanced in echinocytes and decreased in stomatocytes. We conclude that the process of microvesicle formation rather than a mass imbalance between the monolayers of the plasma membrane determines the rate of lipid scrambling.

$\text{Ca}^{2+}$  uptake in erythrocytes not only activates the scrambling process, but also causes opening of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channels, the so-called Gardos channels. In **chapter 4** we investigated the possible role of intracellular  $\text{K}^+$  ions on the scramblase activity and the corresponding procoagulant response. Activation of the scramblase in platelets requires a sustained elevation of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. It was demonstrated that inhibition of the  $\text{K}^+$  efflux by means of a high extracellular  $\text{K}^+$  concentration or the presence of selective blockers of the Gardos channel, caused a significant decrease (30-50%) of the procoagulant response of platelets stimulated with collagen and thrombin. This inhibition could be abolished by addition of valinomycin, a  $\text{K}^+$  ionophore, which

makes the plasmamembrane permeable for  $K^+$  ions. Interestingly, the impaired procoagulant response of platelets from a patient with Scott syndrome was partially restored upon incubation with valinomycin.

**Chapter 5** continues on the importance of  $K^+$  efflux on the scrambling activity. Simultaneous measurement of the  $K^+$  efflux and the rate of lipid scrambling in erythrocytes in the presence and absence of Gardos channel blockers, suggest a direct modulating effect of  $K^+$  ions on the scramblase activity. Valinomycin enhances the  $Ca^{2+}$ -induced lipid scrambling and abolishes the inhibition by  $K^+$  channel blockers. Experiments in which the intracellular  $K^+$  concentration was manipulated by means of valinomycin show a clear correlation between the intracellular  $K^+$  concentration and the rate of lipid scrambling. When varying the intracellular  $K^+$  concentration from 0-140 mM, the rate of lipid scrambling decreases by approximately 50%. In addition, studies with closed isolated erythrocyte membranes, so-called resealed ghosts, revealed that this inhibitory effect of  $K^+$  ions is direct and significantly stronger than in intact erythrocytes. Moreover, the results described in chapter 5 showed that lipid scrambling in resealed erythrocyte ghosts can occur independent of cell shrinkage and formation of microvesicles, processes which appear to be strongly associated in intact red blood cells. Summarizing, we conclude that the high intracellular  $K^+$  concentration in non-stimulated cells suppresses the scramblase activity. Elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  upon stimulation not only activates the scramblase, but also opens Gardos channels resulting in  $K^+$  efflux and subsequent loss of the intrinsic inhibitory effect of this ion on the scramblase activity.

Finally, **chapter 6** discusses the results described in this thesis in the broader context of the current literature on this subject.

## **Samenvatting**

## Samenvatting

De plasmamembraan van eukaryote cellen is opgebouwd uit twee monolagen die van elkaar verschillen in lipidensamenstelling. De buitenste monolaag bestaat voornamelijk uit de choline- houdende fosfolipiden, fosfatidylcholine (PC) en sphingomyeline (SM), terwijl de aminofosfolipiden, fosfatidylserine, (PS) uitsluitend en fosfatidylethanolamine (PE), grotendeels voorkomen in de binnenste monolaag. Het belang van deze asymmetrische lipidenverdeling is af te leiden uit het feit dat de cel energie besteedt aan het handhaven hiervan en zeker, omdat veranderingen in lipidensamenstelling van het membraanoppervlak gevolgen hebben voor het functioneren van verschillende fysiologische processen. De asymmetrische lipidenverdeling wordt in stand gehouden door minstens twee transporteiwitten: 1. een translocase, verantwoordelijk voor een specifiek naar binnen gericht transport van de aminofosfolipiden, PS en PE, en 2. een zogenaamd floppase, een eiwit dat transport van lipiden van binnen naar buiten faciliteert. Dit transport is niet specifiek met betrekking tot het soort lipide en verloopt veel langzamer dan dat door de aminofosfolipidentranslocase. Spontane transbilag beweging van fosfolipiden verloopt zeer traag met halfwaardetijden uiteenlopend van uren tot dagen. Als gevolg hiervan is de asymmetrische lipidenverdeling relatief stabiel en is de aminofosfolipiden translocatie voornamelijk bedoeld om de verdeling te herstellen wanneer deze verstoord is, bijvoorbeeld als gevolg van fusieprocessen tijdens exo- en endocytose. Een ander eiwit, scramblase genaamd, faciliteert migratie van lipiden in beide richtingen over de membraan. Het fosfolipiden scramblase is in rustende cellen inactief. Calcium ionen spelen een centrale rol in het opheffen van de normale lipidenverdeling: scramblase wordt geactiveerd door een blijvend hoge intracellulaire  $Ca^{2+}$  concentratie, terwijl aminofosfolipidentranslocase onder zulke condities wordt geremd.

Het meest opvallende kenmerk van het instorten van de asymmetrische lipidenverdeling is het beschikbaar komen van PS in de buitenste monolaag van de plasmamembraan. Oppervlaktegeexposeerd PS, met name in bloedplaatjes speelt een belangrijke rol in de bloedstolling, omdat PS-houdende membranen een katalytisch oppervlak (procoagulant oppervlak) vormen, waarop verschillende enzymcomplexen (o.a. het protrombinasecomplex) uit de bloedstollingscascade kunnen worden geassembleerd, waardoor een snelle fibrinevorming wordt gegarandeerd. Hierdoor wordt een



plaats-gebonden controle van het hemostase proces gewaarborgd. Daarnaast dient oppervlakte-geëxposeerd PS als herkenningssignaal voor het verwijderen van apoptotische cellen en vormt het onderdeel van cel-cel interacties tijdens fusieprocessen. Omdat de activiteit van het protrombinasecomplex eenvoudig te meten is en in hoge mate afhankelijk is van de aanwezigheid van PS, wordt deze activiteit (procoagulant activiteit) veelal gebruikt om PS expositie te detecteren. Echter, de protrombinase activiteitsmeting betreft een zogenaamde 'bulk'-meting. Dat betekent dat een verhoogde activiteit veroorzaakt kan worden zowel door een toename van de hoeveelheid geëxposeerd PS per cel als door een toename van de hoeveelheid PS-exponerende cellen. In **hoofdstuk 2** hebben wij de procoagulante respons van bloedplaatjes nader bestudeerd op het niveau van PS-expositie per bloedplaatje. Dit werd gedaan met behulp van flow cytometrie. Uit ons onderzoek blijkt dat na activatie met de diverse agonisten er twee plaatjesfracties kunnen worden onderscheiden: een PS-positieve fractie en een PS-negatieve fractie. De mate van PS-expositie in de PS-positieve fractie komt overeen met die welke wordt waargenomen na activatie van plaatjes met  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofoor (i.e. maximale PS-expositie). De grootte van de PS-exponerende fractie blijkt afhankelijk te zijn van de gebruikte agonist. De omvang van de PS-exponerende fractie neemt toe in de tijd en is evenredig met de procoagulant activiteit van de plaatjessuspensie.

Voorts blijkt uit ons onderzoek dat, in de plaatjesfractie die PS exposeert, scramblase volledig aangeschakeld is en de translocase volledig uitgeschakeld is. Translocase activiteit werd uitsluitend waargenomen in die fractie die geen PS exposeert. Er werden geen plaatjes waargenomen met een intermediaire PS expositie, gelegen tussen die van de controle en van  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofoor gestimuleerde plaatjes. Op grond van deze bevindingen moet de hypothese, dat een graduele verschuiving in de balans tussen scramble- en translocase activiteit bepalend is voor de mate van PS-expositie en daarmee de procoagulante activiteit van het plaatje, worden verworpen. In **hoofdstuk 3** wordt de invloed van de morfologie van erythrocyten op het scramble-proces bestudeerd. Wanneer erythrocyten met  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofoor worden behandeld treden tegelijk met lipidenscrambling en PS-expositie een aantal andere processen op zoals celkrimp, vormverandering, en membraanblebbing, i.e. het afsnoeren van microvesikels, kleine, door plasmamembraan omgeven, celfragmenten. Deze vormverandering betreft de overgang van biconcaaf naar echinocyt, waarbij de cel gekenmerkt wordt door

stekelvormige uitstulpingen. Een mogelijke verklaring voor deze vormverandering is gebaseerd op een hypothese van Sheets en Singer, de zogenaamde 'coupled bilayer hypothesis', die stelt dat verandering in lipidenmassa tussen beide helften van de bilayer leidt tot verandering in membraankromming. Volgens dit principe veroorzaakt het opbouwen van een massa-overmaat in de buitenste monolaag uitstulping van de membraan en de vorming van 'spikes' (echinocyt-vorming), terwijl een massa-overmaat in de binnenste monolaag zorgt voor instulping (stomatocyt-vorming). Eerdere studies van de snelheden van uitwaartse en inwaartse bewegingen van de plasmamembraanlipiden, tijdens het scramble-proces in erythrocyten (en bloedplaatjes), lieten zien dat de snelheid van inwaartse beweging van sphingomyeline kleiner is dan de snelheid van uitwaartse beweging van aminofosfolipiden.

Dit snelheidsverschil leidt tot massa-overschot in de buitenste monolaag van de membraan met als gevolg vorming van echinocyten en afsnoeren van microvesikels. Op grond hiervan werd verondersteld dat factoren die in de buitenste monolaag (crenators) of binnenste monolaag (cupformers) van de plasmamembraan worden geïncorporeerd, het scramble-proces zouden kunnen beïnvloeden. Hierbij lijken er twee mogelijkheden te bestaan, enerzijds kan incorporatie van materiaal in de binnenste monolaag de uitgaande beweging van PS bevorderen, terwijl een surplus aan materiaal in de buitenste monolaag de migratie van PS van binnen naar buiten tegen werkt. Anderzijds bestaat de mogelijkheid dat de vorming van microvesikels tijdens het scramble-proces snelheids-limiterend is. In deze optiek zullen echinocyten, behandeld met  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofoor, hun lipiden-asymmetrie gemakkelijker verliezen aangezien zij 'aanleg' hebben tot microvesikel-vorming, terwijl in stomatocyten dit proces vertraagd zal zijn als gevolg van massa-overschot in de binnenste monolaag. Om te weten te komen welke van deze twee alternatieven het waarschijnlijkst is, hebben we diverse bekende crenators en cupformers gebruikt. De snelheid van scrambling werd bepaald aan de hand van de ontwikkeling van een procoagulant-oppervlak, gemeten met behulp van de protrombinase reactie. Aangetoond werd dat, in vergelijking met normocyten, echinocyten een verhoogde scramble-snelheid vertonen, terwijl stomatocyten een verlaagde scramble-snelheid laten zien. Concluderend kunnen we zeggen dat de snelheid van lipidenscrambling meer bepaald wordt door het vermogen tot microvesikel-vorming dan door een massa-imbalans tussen de twee monolagen van de membraan. Bekend is dat  $\text{Ca}^{2+}$  opname in erythrocyten, niet alleen scramblase activeert,

maar ook  $\text{Ca}^{2+}$ -gevoelige  $\text{K}^+$  kanalen (Gardoskanalen) in deze cellen stimuleert. In **hoofdstuk 4** onderzochten we de mogelijke rol van intracellulaire  $\text{K}^+$  ionen op de scramblase activiteit en daarmee de ontwikkeling van de procoagulant respons. Bij plaatjes vereist het activeren van de scramblase een blijvende verhoging van de intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie. Aangetoond werd dat bij plaatjes remming van de  $\text{K}^+$  efflux door hoog extracellulair kalium of door selectieve Gardoskanaalblokkers tijdens activatie met collageen/trombine gepaard gaat met een duidelijke afname (30-50%) van de procoagulante respons. Deze remming van procoagulante respons kon worden hersteld met valinomycine, een kaliumionofoor, die de membraan selectief permeabel maakt voor  $\text{K}^+$  ionen. De defecte procoagulante respons, na collageen/trombine activatie van plaatjes van een patient met het Scott syndroom, bleek gedeeltelijk hersteld te kunnen worden door preincubatie met valinomycine.

In **hoofdstuk 5** zijn we verder ingegaan op de betekenis van de  $\text{K}^+$  efflux op de scramble activiteit. Simultane metingen van de  $\text{K}^+$  efflux en de snelheid van lipiden- scrambling, gemeten aan de ontwikkeling van een procoagulant oppervlak in aan en afwezigheid van van Gardoskanaalblokkers in erythrocyten, suggereren het bestaan van een direct modulerend effect van  $\text{K}^+$  -ionen op de scramble-snelheid. Valinomycine versnelt de  $\text{Ca}^{2+}$  -geïnduceerde lipidenscrambling in erythrocyten en heft de remmende werking van de  $\text{K}^+$  -kanaalblokkers op.

Experimenten waarbij de intracellulaire  $\text{K}^+$  -concentratie met behulp van valinomycine werd gemanipuleerd tonen een duidelijke relatie tussen de intracellulaire  $\text{K}^+$  -concentratie en de scramble-snelheid. Wanneer de intracellulaire  $\text{K}^+$  -concentratie verhoogd wordt van 0 tot 140 mM neemt de scramble-snelheid met ca 50% af. Voorts tonen onze studies met resealed ghosts, geïsoleerde gesloten erythrocyten membranen, aan dat de remmende werking van  $\text{K}^+$  -ionen rechtstreeks is en beduidend sterker dan in intacte erythrocyten. Bovendien laten de resultaten beschreven in **hoofdstuk 5** zien dat lipidenscrambling in resealed ghosts kan optreden onafhankelijk van celkrimp en vorming van microvesicles, processen die in intacte erythrocyten sterk geassocieerd blijken te zijn. Samenvattend kunnen we zeggen dat in niet geactiveerde cellen de hoge intracellulaire  $\text{K}^+$  -concentratie onderdrukkend werkt op het scramble-proces. Verhoging van de intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  -concentratie veroorzaakt activatie van de scramblase maar tevens opening van de Gardoskanalen als gevolg waarvan de cel  $\text{K}^+$  -ionen verliest en het

intrinsiek remmend effect van deze ionen op de scramblase activiteit vermindert. In **hoofdstuk 6**, tenslotte, worden de in dit proefschrift beschreven resultaten besproken in de bredere context van de meest relevante publicaties over dit onderwerp.