

Cell membrane biology during apoptosis: the role of annexin A5

Citation for published version (APA):

Kenis, H. (2005). *Cell membrane biology during apoptosis: the role of annexin A5*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2005

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

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

When we started the work presented in this thesis, it was unknown if and how binding of annexin A5 would affect the cell membrane dynamics during apoptosis. The data described in this thesis suggest that the typical cell membrane changes that occur during apoptosis, such as membrane blebbing and rapid exposure of PS, may play a role in thrombus formation, and may also be crucial in the removal of apoptotic cells from tissue. Based on observations that show enhanced thrombus formation occurring in patients with anti-phospholipid antibodies and that demonstrate a high frequency of arterial and venous thrombosis occurring in patients with anti-annexin A5 antibodies, we hypothesized that there exist a relation between the levels of annexin A5 and the risk of cardiovascular diseases. In addition, since PS exposure is an essential mechanism in phagocytosis of apoptotic cells, we hypothesized that annexin A5 - PS interaction influences the removal and engulfment of apoptotic cells. In this thesis, we took a stepwise approach to investigate the influence of annexin A5 binding to the apoptotic plasma cell membrane.

In **CHAPTER 2** we obtained more insight in the physiological significance of annexin A5 in cardiovascular diseases by a genetic approach. Genetic alterations are often associated with diseases. Since annexin A5 is an anticoagulant protein with an antithrombotic activity *in vivo*, a possible role for annexin A5 in the antithrombotic arm of the haemostatic balance has been proposed. Accordingly, genetically caused defects of annexin A5 may be a genetic risk factor for thrombotic disorders. Therefore, we screened the annexin A5 gene for mutations in patients with venous thrombosis. The screening revealed several mutations under which the C-1T mutation. To obtain more insight into the relevance of this mutation in thrombotic disorders, we validated this mutation in two large case-control studies, of venous thrombosis and myocardial infarction. We found no risk of venous thrombosis for the T-variant, but a slightly increased risk of myocardial infarction, especially in young men. Interestingly, we found that the presence of the thrombophilia factors, factor V Leiden or the prothrombin 20210A mutation, increased the risk of myocardial infarction for the T allele carriers about three-fold, indicating the existence of a relationship between annexin A5 and arterial thrombosis. The molecular basis of this relationship remains to be investigated but it is unlikely that this involves

circulating annexin A5, because we found no association between the various alleles and annexin A5 levels.

The next chapters were aimed to unravel the role of annexin A5 in cell membrane biology during apoptosis. In **CHAPTER 3**, we attempted to define whether PS externalization in the heart occurs before or after the point of no return in the cell death program by using the annexin A5 imaging technique. It has always been thought that once the process of cell suicide has passed a certain point, it is irreversible. However, by using a brief cardiac ischemia protocol *in vivo* we observed that annexin A5 binds to cells in the ischemic area, but that these cells do not die in the subsequent days. In addition, we observed that the binding of annexin A5 to these cells was associated with activation of caspase 3, which is thought to be one of the key executioners of apoptosis. Yet, these data indicate that cardiomyocytes can recover from the initiation of apoptosis, if reperfusion is restored rapidly enough, which provide an entirely novel concept to rescue mammalian cells. Moreover, the PS exposure persists at least 24 hours after the brief ischemic insult, making it possible to identify patients at risk, who are admitted the first 24 hours after an episode of chest pain. Another observation was that the cardiomyocytes, which were triggered by a short ischemic episode, bound and internalized annexin A5. In **CHAPTER 4**, we unraveled the mechanism of the annexin A5-induced internalization by performing *in vitro* studies of Jurkat cells executed to undergo apoptosis in the presence of annexin A5. Based on these data, we demonstrated that annexin A5 binds to the cell surface expressed phosphatidylserine and subsequently induces its own internalization due to the crystallization of annexin A5 at the cell membrane. A pinocytic pathway is activated involving pinocytic vesicle closure, detachment from the plasma membrane and cytoskeleton-dependent trafficking in the cytosol of the cell. These data confirmed the *in vivo* observations in the brief ischemia/reperfusion model. Now, to further understand whether the internalization of annexin A5 would have some influence on the phagocytosis of apoptotic cells, we developed a flow cytometric-based phagocytosis assay (**CHAPTER 5**). Our results showed that annexin A5 only partially inhibits phagocytosis when present at the time of macrophage-apoptotic cell interaction. On the other hand, when Jurkat cells process through apoptosis in the presence of annexin A5, a more than two-fold increase in inhibition was observed. This could not only be explained by the inhibition of apoptotic body formation since mutants of annexin A5 which inhibited apoptotic body formation were not able to inhibit phagocytosis. Our data indicate that neither shielding of PS, which acts as a trigger for the uptake of apoptotic cells by macrophages nor the inhibition of apoptotic bodies formation is sufficient to inhibit phagocytosis.

Together with our previously reported data that annexin A5 but not M23 internalizes PS-containing membrane patches, we hypothesize that the inhibitory action of annexin A5 is not based on the physical shielding of PS but on the internalization of the PS-expressing membrane patch that harbors a complex collection of "eat me" signals.

FINAL CONCLUSION

The data described in this thesis provide novel insights into the role of annexin A5 in the membrane biology during apoptosis. Annexin A5 affects the cell membrane biology of PS exposing cells not only by binding but subsequently internalizing membrane patches which contain potential proteins/receptors involved in several membrane-associated processes, such as blood coagulation and phagocytosis. These findings may provide a dual approach for the use of annexin A5 in the clinic: as a diagnostic tool to detect apoptotic cell death and as a therapeutic agent and/or targeting tool to deliver cardio-protective (myocardial infarction) or cell death inducing (cancer) drugs to the site of cell death.

SAMENVATTING

Bij de aanvang van dit onderzoek was het nog onbekend of de binding van annexine A5 aan de celmembraan tijdens apoptose een invloed heeft op de dynamiek van de celmembraan. De resultaten beschreven in dit proefschrift suggereren dat de typische celmembraanveranderingen die optreden tijdens apoptose, zoals membraan uitstulping, en expositie van fosphatidylserine (PS) aan het celoppervlak, niet alleen een rol spelen tijdens de bloedstolling maar ook tijdens de opruiming van dode cellen in het weefsel. Gebaseerd op het feit dat patiënten met anti-fosfolipide antilichamen een verhoogde kans hebben op de vorming van bloedklonters en dat patiënten met anti-annexine A5 antilichamen een verhoogd risico op arteriële en veneuze trombose hebben, leidde tot onze hypothese dat er een relatie bestaat tussen de hoeveelheid annexine A5 in de circulatie en het risico op cardiovasculaire aandoeningen. Vermits PS een belangrijke rol speelt bij de opruiming van dode cellen, vermoeden wij dat de interactie van annexine A5 met PS een invloed zal hebben op de opruiming van dode cellen. In dit proefschrift hebben we stapsgewijs de binding van annexine A5 aan de celmembraan tijdens apoptose onderzocht.

In **HOOFDSTUK 2** hebben we getracht meer inzicht te krijgen in de fysiologische betekenis van annexine A5 met name in cardiovasculaire aandoeningen door middel van gen mutatie analyse. Genetische defecten zijn vaak de oorzaak van bepaalde ziekten. Aangezien annexine A5 een antistollingseiwit is met een anti-trombotische activiteit *in vivo* is een mogelijke rol voor annexine A5 in de anti-trombotische arm van de hemostatische balans weggelegd. Met als gevolg dat annexine A5 een potentiële genetische risico factor kunnen zijn in trombotische aandoeningen. Om dit te onderzoeken hebben we het annexine A5 gen gescreend op mutaties in patiënten met veneuze trombose. De screening leverde verscheidene mutaties op waaronder de C-1T mutatie. Om meer inzicht te krijgen in de relevantie van deze mutatie hebben we deze mutatie verder gevalideerd in twee grote case-control studies van veneuze trombose en myocard infarct. We hebben geen risico voor veneuze trombose voor de T-variant gevonden maar wel een licht verhoogd risico op het krijgen van een myocard infarct, vooral bij jonge mannen. Bovendien hebben we een drievoudig verhoogd risico gevonden voor myocard infarct voor de T-variant in aanwezigheid van andere trombofilie factoren, zoals factor V Leiden en de

prothrombine 20210A mutatie. De moleculaire basis voor deze relatie moet nog verder onderzocht worden maar het is onwaarschijnlijk dat circulerend annexine A5 hierbij betrokken is, gezien we geen verband gevonden hebben tussen de verschillende allelen en de annexine A5 spiegels in het bloed.

In de volgende hoofdstukken hebben we de rol van annexine A5 in de celmembranen biologische tijdens apoptose onderzocht. In **HOOFDSTUK 3** hebben we met behulp van de annexine A5 imaging techniek getracht te bepalen of PS externalisatie in het hart gebeurt vóór of na het 'point of no return' in het celdoodprogramma. Men heeft altijd al vermoed dat wanneer het celdoodprogramma een bepaald punt heeft gepasseerd het onomkeerbaar is. Wij hebben aangetoond dat na een korte periode van ischemie annexine A5 bindt aan cellen in het ischemische gebied en dat deze cellen in de daaropvolgende dagen niet dood gaan. Bovendien hebben we aangetoond dat de binding van annexine A5 aan deze cellen gepaard gaat met de activatie van caspase 3, een van de "executioners" van het celdoodprogramma. Deze data tonen aan dat hartspiercellen kunnen herstellen van celdood wanneer de bloedtoevoer maar snel genoeg hersteld wordt. De PS expositie duurt minstens 24 uur na een korte periode van ischemie. Dit maakt het mogelijk om patiënten met een verhoogd risico te identificeren die gehospitaliseerd zijn binnen de 24 uur na een periode van pijn op de borst. Een andere waarneming is dat cardiomyocyten die getriggerd zijn door een korte ischemische periode annexine A5 binden en internaliseren. In **HOOFDSTUK 4** hebben we het mechanisme van de annexine A5 gemedieerde internalisatie ontrafeld met behulp van *in vitro* studies in Jurkat cellen die geïnduceerd zijn tot celdood in aanwezigheid van annexine A5. We hebben aangetoond dat annexine A5 bindt aan het celoppervlak van PS exposerende cellen en vervolgens geïnternaliseerd wordt door de twee-dimensionale crystallisatie van annexine A5 op de celmembranen. Een pinocytotische route is geactiveerd die leidt tot de vorming van een pinocytotisch vesikel gevolgd door afsnoering van het vesikel van de plasmamembraan en cytoskeleton-afhankelijk transport door het cytosol van de cel. Deze resultaten bevestigen de bevindingen van de *in vivo* ischemie/reperfusie studies. Om na te gaan of de internalisatie van annexine A5 een invloed heeft op de opruiming van dode cellen hebben we een flow cytometrische fagocytose assay ontwikkeld (**HOOFDSTUK 5**). Onze resultaten tonen aan dat annexine A5 de opruiming van dode cellen maar gedeeltelijk remt indien aanwezig tijdens de macrofaag-dode cel interactie. Daarnaast hebben we aangetoond dat wanneer annexine A5 aanwezig is tijdens de initiatie van het celdoodprogramma de opruiming van dode cellen voor meer dan de helft wordt geremd. Deze remming was niet te verklaren door de

remming van apoptotische body vorming omdat mutanten van annexine A5 die de apoptotische body vorming verhinderen niet in staat waren de opruiming van dode cellen te remmen. Op basis van deze waarnemingen stellen we vast dat afschermen van PS door annexine A5 en de remming van de vorming van apoptotische lichamen niet voldoende is om de opruiming van dode cellen te remmen. Samen met onze eerdere beschreven resultaten dat annexine A5 PS positieve membraan patches internaliseert, vermoeden wij dat het remmende effect van annexin A5 niet enkel gebaseerd is op het afdekken van PS maar ook op de internalisatie van PS exposerende membraan patches die een complex gamma van "eat me" signalen bevatten.

ALGEMENE CONCLUSIE

De resultaten beschreven in deze thesis geven ons nieuwe inzichten in de rol van annexine A5 in de membraan biologie tijdens apoptose. Annexine A5 heeft een invloed op de celmembraan biologie van PS exposerende cellen niet alleen door er aan te binden maar ook door membraan patches te internaliseren die mogelijk belangrijke eiwitten en/of receptors bevatten die betrokken zijn bij verscheidene membraan geassocieerde processen zoals bijvoorbeeld de bloedstolling en de opruiming van dode cellen.

Onze resultaten leiden tot een tweeledige toepassing voor annexine A5 in de kliniek: als een diagnosticum voor de detectie van dode cellen en als een therapeuticum en/of targeting agent om schermende of celdood inducerende geneesmiddelen af te leveren op de plaats van celdood.

