

Heng Yeng Wong

Dr. med.

**iPLA2 $\beta$  deficiency in hepatocytes from male mice leads to an increase in phosphatidylethanolamine externalization on the plasma membrane**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktormutter: Prof. (apl.) Dr. med. Uta Merle

Calcium-independent group VIA phospholipase A2 (iPLA2 $\beta$ ) plays an important role in phospholipid remodeling, homeostasis as well as apoptosis. Studies have shown that on endothelial cells and myeloma cells, phosphatidylethanolamine (PE) redistributes to the outer leaflet of the plasma membrane upon exposure to low levels of oxidative stress. However, the correlation of iPLA2 $\beta$  deficiency on PE and the response to oxidative stress in hepatocytes is still unknown. Previously, we have shown that total PE in the whole liver of male iPLA2 $\beta$  KO mice increased markedly as compared to wild-type mice, but this was not found in female mice. Hence, we investigated if this is the case for in-vitro hepatocytes, if the amount of PE externalized on the outer membrane leaflet is also increased and if PE externalization is affected by oxidative stress and apoptosis.

Hepatocytes were isolated from female and male WT and KO mice at 5-12 weeks old and subsequently treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadione or CD95/FasL antibody. An assay to detect externalized PE on adherent hepatocytes in vitro by using Duramycin-NHS-Biotin (DLB) as a probe which has a high affinity to PE was developed. DLB was then coupled with AlexaFlour-488 streptavidin for detection and the results were analyzed using FACS. Oxidative stress levels were measured using flow cytometry of dichlorofluorescein (DCFH). The extent of PE externalization with hepatocyte injury was correlated by luminescence assays of apoptosis markers like cleaved caspase 3/7.

We found that iPLA2 $\beta$  deficiency increased the levels of DLB-streptavidin and DCFH positive hepatocytes in male but not in female mice. Thus, iPLA2 $\beta$ -deficient hepatocytes from male mice showed increased externalized PE and oxidative stress. Upon treatment of male hepatocytes with 50  $\mu$ M menadione to generate ROS or with 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the levels of externalized PE were further increased to about the same extent for both WT and KO cells. When treated with CD95/FasL

antibody for 6 h, WT hepatocytes from male mice showed a strong increase in caspase 3/7 activities, which were attenuated in KO hepatocytes. Externalized PE levels were however not altered by apoptosis induction in both WT and KO cells.

In conclusion, we here reported that iPLA2 $\beta$  deficiency increased basal oxidative stress and PE externalization in male but not female hepatocytes. Induced oxidative stress triggered an increase in PE externalization for both male and female hepatocytes, suggesting a critical role of oxidative stress in this process. Furthermore, PE externalization was correlated with oxidative stress but not apoptosis. Our results provide insights on the influence of iPLA2 $\beta$  deficiency on oxidative stress-mediated PE externalization in a sex-dependent manner. The increase in externalized PE in KO and oxidant-treated WT or KO hepatocytes from male mice, but not females, may serve as cellular receptors for interaction with external signals, such as those from immune cells, bacteria and microorganisms. Further studies are necessary to identify the functions of externalized PE in iPLA2 $\beta$ -deficient hepatocytes.

Das Enzym Calcium unabhängige Phospholipase A2 iPLA2 $\beta$  spielt eine wichtige Rolle beim Umbau von Phospholipiden, bei der Homöostase sowie bei der Apoptose. Studien haben gezeigt, dass sich Phosphatidylethanolamin (PE) auf Endothelzellen und Myelomzellen bei geringem oxidativem Stress auf das äußere Plasmamembran umverteilen. Das Fehlen von iPLA2 $\beta$  und ihre Wirkung auf PE und der Reaktion auf oxidativen Stress in Hepatozyten bleibt aber noch unbekannt. Zuvor haben wir gezeigt, dass männlicher Mäuse, denen iPLA2 $\beta$  fehlte, ein erhöhte gesamte PE in der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen haben, dies wurde jedoch bei weiblichen Mäusen nicht gefunden. Aus dieser Gründe sollte in dieser Studie untersucht werden, ob die Menge an an externalisiertem PE bei in vitro Hepatozyten ebenfalls erhöht werden würde und ob die Externalisierung von PE durch oxidativen Stress und Apoptose beeinflusst werden würde.

Hepatozyten wurden aus weiblichen und männlichen Kontroll- und Knockout-Mäusen im Alter von 5 von 12 Wochen isoliert und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Menadion oder CD95/FasL Antikörper behandelt. Zum Nachweis von externalisiertem PE auf Hepatozyten in vitro wurde Duramycin-NHS-Biotin (DLB) verwendet, weil es hohe Affinität zu PE besitzt. Die Kopplung von DLB mit AlexaFluor 488 Streptavidin wurde dann mit FACS analysiert. Oxidativer Stress wurde durch Durchflusszytometrie von Dichlorfluorescein (DCFH) gemessen. Das Ausmaß der Externalisierung von PE und Apoptose wurde durch Lumineszenztests von Caspase 3/7 korreliert.

Es konnte gezeigt werden, dass fehlende iPLA2 $\beta$  die Spiegel von DLB-Streptavidin- und DCFH-positiven Hepatozyten bei männlichen Mäusen erhöhte, aber nicht bei weiblichen Mäusen. Damit stellten Hepatozyten von männlichen Mäusen mit fehlendem iPLA2 $\beta$  vermehrte externalisierte PE und oxidativen Stress dar. Stimulation der Hepatozyten aus männlicher Mäusen mit 50uM Menadion zur Erzeugung von ROS oder mit 50uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Erhöhung an externalisiertem PE sowohl für WT- als auch für KO-Zellen. Nach der Stimulation mit CD95/FasL Antikörper für 6 Stunden zeigten WT-Hepatozyten einen starken Anstieg der Aktivität von Caspase 3/7, die in KO-Hepatozyten abgeschwächt waren. Die Externalisierung von PE wurden jedoch durch induzierte Apoptose nicht verändert.

Diese Ergebnisse konnte zeigen, dass das Fehlen von iPLA2 $\beta$  den basalen oxidativen Stress und die Externalisierung von PE in Hepatozyten von männlichen Mäusen erhöht. Im Gegensatz dazu wurde das nicht in Hepatozyten von weiblichen Mäusen beobachtet. Induzierter oxidativer Stress löste eine Zunahme der Externalisierung von PE sowohl für männliche als auch für weibliche

Hepatozyten aus, was vermutlich auf eine entscheidende Rolle von oxidativem Stress in diesem Prozess hinweist. Die Externalisierung von PE korrelierte mit oxidativem Stress, jedoch nicht mit Apoptose. Unsere Ergebnisse liefern ein Einblick in den Einfluss von fehlendem iPLA2 $\beta$  auf die Externalisierung von PE mit oxidativem Stress in einer geschlechtsabhängiger Weise. Es wird postuliert, dass der Anstieg von externalisiertem PE als zelluläre Rezeptoren für die Interaktion mit externen Signalen dienen könnte, beispielsweise von Immunzellen, Bakterien und Mikroorganismen. Weitere Studien sind noch erforderlich, um die genaue Funktionen von externalisiertem PE in KO-Hepatozyten zu identifizieren.