

The role of macrophage death in atherosclerosis

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Antonis Chatzigiagkos

aus Kozani, Griechenland

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde gezeigt, dass der Zelltod eine wichtige Rolle bei Homöostase und Krankheit spielt. FADD ist ein Adaptormolekül, das an der extrinsischen Apoptose beteiligt ist, und seine Abwesenheit fördert Nekroptose, eine RIPK3- und MLKL-abhängige Form des lytischen programmierten Zelltods. Zusätzlich reguliert RIPK1 beide Signalkaskaden über seine Kinaseaktivität. Makrophagen sind an der Pathogenese der Atherosklerose, der weltweit führenden Todesursache, beteiligt. Allerdings gibt es noch keine definitiven Daten darüber, wie der Tod von Makrophagen die Entwicklung der Atherosklerose beeinflusst.

In der vorgelegten Arbeit nutzten wir einen Knochenmarktransfer-Ansatz, um die Rolle des Immunzelltods bei Atherosklerose zu untersuchen. Darüber hinaus verwendeten wir ein Cre-Lox-System, um die Funktion von FADD spezifisch in RIPK3-defizienten Monozyt-abgeleiteten Zellen, wie Makrophagen, sowie die Funktion von MLKL und der RIPK1-Kinaseaktivität in Immunzellen bei Atherosklerose zu untersuchen. LDLR^{KO}-Mäuse, denen FADD und RIPK3 in Makrophagen fehlten, zeigten im Vergleich zu den Kontrollen stärkere und weiter fortgeschrittene Atherosklerose. Bei diesen Mäusen wurde eine stärkere Entzündung beobachtet, die sich als erhöhte Neutrophilie im Blut, erhöhte Akkumulation von Neutrophilen in den atherosklerotischen Läsionen und erhöhte Transkription von Ccl5-mRNA in der Aorta zeigte. Bedeutenderweise wurde keine metabolische Dysregulation bei FADD^{MO-KO}/RIPK3^{KO} Knochenmarks-Empfängermäusen beobachtet und konnte daher als der zugrunde liegende Mechanismus der erhöhten Atherosklerosebelastung bei diesen Mäusen ausgeschlossen werden. *In vitro* waren FADD^{KO}/RIPK3^{KO}-Makrophagen resistenter gegen eine Reihe von Zelltod-induzierenden Stimuli als WT- und RIPK3^{KO}-

Zellen. Im Gegensatz dazu wurden keine Unterschiede in ihrer Efferozytosefähigkeit oder Schaumzellbildungsneigung festgestellt.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Studie verwendeten robusten genetischen Krankheitsmodelle, dass die extrinsische Apoptose von Makrophagen eine schützende Wirkung bei Atherosklerose ausübt, indem Entzündungen eingeschränkt werden.

ABSTRACT

Cell death has been shown to play an important role in homeostasis and disease. FADD is an adaptor molecule involved in extrinsic apoptosis and its absence promotes necroptosis, a RIPK3- and MLKL- dependent form of lytic, programmed cell death. Additionally, RIPK1 regulates both these pathways via its kinase activity. Macrophages participate in the pathogenesis of atherosclerosis, the leading cause of death worldwide. However, definitive data on how macrophage death affects atherosclerosis development is still lacking.

Here, we utilized a bone marrow transfer approach to study the role of immune cell death in atherosclerosis. Moreover, we employed a Cre-Lox system to study the function of FADD specifically in RIPK3- deficient, monocyte-derived cells, such as macrophages, as well as the function of MLKL and the RIPK1 kinase activity in immune cells during atherosclerosis. LDLR^{KO} mice lacking FADD and RIPK3 in their macrophages exhibited increased, more advanced atherosclerosis compared to the controls. Increased inflammation was observed in these mice, presented as increased neutrophilia in the blood, increased accumulation of neutrophils in the atherosclerotic lesions and increased transcription of *Ccl5* mRNA in the aorta. Importantly, metabolic dysregulation was not observed in FADD^{MO-KO}/RIPK3^{KO} bone marrow recipient mice and could therefore be excluded as the underlying mechanism of the increased atherosclerosis burden in these mice. *In vitro*, FADD^{KO}/RIPK3^{KO} macrophages were more resistant to an array of cell death-inducing stimuli than WT and RIPK3^{KO} cells. In contrast, no differences were detected in their efferocytosis capability or foam cell formation propensity.

In summary, robust genetic models of disease used in this study reveal that macrophage extrinsic apoptosis exerts a protective effect in atherosclerosis by restricting inflammation.