

**Giants of immunity:  
Uncovering a role for Atf3 in Multinucleated Giant Cell  
formation**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

**Andreia Cláudia Pereira Correia**

aus Penalva do Castelo, Portugal

Köln 2019

## Abstract

The primary function of the innate immune system is to elicit immediate defense response against external insults, while setting the ground for the action of adaptive immunity. Macrophages are innate immune cells characterized by their fascinating plasticity in responding to environmental cues. These cells populate most of the tissues in the body, where they contribute to immune surveillance and the maintenance of tissue homeostasis.

Circulating monocytes represent a source of new tissue-resident macrophages, while they are also recruited to sites of injury where they mediate the inflammatory process. During inflammation, the primary function of macrophages is phagocytosis; engulfment and degradation of dead cells, cellular debris, pathogens and foreign particles. However, presence of non-degradable inert or living substances, such as implanted biomaterials or resistant bacteria, may trigger a foreign body response. The persistent immune challenge and associated stress responses leads to chronic inflammation, which involves simultaneous destruction and repair of the injured tissue driven by continuous recruitment of immune cells and activation of complex pro- and anti-inflammatory signaling networks. Macrophages emerge as key mediators of chronic inflammation, governing the formation of compact immune aggregates that surround and isolate the foreign body, called granulomas. During granuloma formation macrophages can undergo multinucleation, generating various types of Multinucleated giant cells (MGCs). Intriguingly, the molecular mechanisms that underlie differentiation of MGC remain unclear.

In this study, we show that MGC formation in response to IL-4 relies on dynamics of the cellular cytoskeleton and involves acytokinetic division and cell-cell fusion. We identify the essential role for the stress inducible bZIP transcription factor Atf3 in orchestrating the process of macrophage fusion downstream of IL-4. We show that Atf3 expression rises in response to IL-4 and its activity controls the mechanotransduction machinery of the cells. Specifically, we demonstrate Atf3 role in regulating actin cytoskeleton dynamics and organization which is necessary for cell migration and formation of membrane protrusions including force-generating podosomes. Moreover, through regulation of Lamin A/C expression Atf3 emerges as a key regulator of nucleoskeleton structure and composition. Importantly, the alterations to cell and nuclear morphology of *Atf3*-deficient macrophages, associated with genomic instability, are very reminiscent of laminopathies. While required for IL-4-driven MGC formation via fusion, Atf3 appears dispensable for macrophage multinucleation driven by TLR2 which primarily relies on acytokinetic cell division.

Collectively, we define Atf3 as an integral regulator of the mechanotransduction machinery and mechanical homeostasis in macrophages. By orchestrating cyto- and nucleo-skeleton functions Atf3 acts as a guardian of genome stability during cell fusion, upon IL-4 stimulation. This study uncovers a new layer of Atf3-mediated transcriptional regulation in macrophages, modulated by mechanical cues. On the other hand, Atf3 links transcription-mediated immune responses with cytoskeletal function, therefore establishing a new connection between environmental cues and chromatin regulation that might contribute for macrophage plasticity.

## Zusammenfassung

Die primäre Funktion des angeborenen Immunsystems ist es, eine unmittelbare Abwehrreaktion gegen äußere Bedrohungen auszulösen sowie die Grundlage für ein Handeln der adaptiven Immunität zu schaffen. Makrophagen sind angeborene Immunzellen, die eine beeindruckende Plastizität bei der Anpassung an Umwelteinflüsse aufweisen. Diese Zellen sind dazu in der Lage die meisten der Gewebe im Körper zu besiedeln, um dort zur Immunüberwachung und Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase beizutragen.

Zirkulierende Monozyten bilden die Quelle für neue, gewebsansässige Makrophagen, können jedoch darüber hinaus zu Orten von Verletzungen rekrutiert werden, um dort Entzündungsprozesse zu vermitteln. Während einer Entzündung besteht die Hauptfunktion von Makrophagen in der Phagozytose – der Aufnahme und dem Abbau von abgestorbenen Zellen, Ablagerungen, Pathogenen und Fremdstoffen. Allerdings kann die Anwesenheit nicht-abbaubarer inerte oder lebender Substanzen wie zum Beispiel implantierter Biomaterialien oder resistenter Bakterien eine Fremdkörperreaktion auslösen. Eine ständige Aktivierung des Immunsystems und der dazugehörigen Stressantworten führt zu chronischen Entzündungen, bei denen verletztes Gewebe durch die fortwährende Rekrutierung von Immunzellen sowie der Aktivierung von pro- und anti-entzündlichen Signalnetzwerken gleichzeitig zerstört als auch wieder repariert wird. Dies wird durch die kontinuierliche Rekrutierung von Zellen und die Aktivierung komplexer pro- und antiinflammatorischer Signalnetzwerke erreicht.

Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung chronischer Entzündungen, da sie die Bildung kompakter Immunaggregate, auch Granulome genannt, steuern, welche den Fremdkörper umgeben und isolieren. Während der Granulomentstehung können Makrophagen einen Vorgang der Mehrkernbildung durchlaufen, bei welchem verschiedene Typen mehrkerniger Riesenzellen entstehen. Bemerkenswerterweise, bleiben die molekularen Mechanismen, welche der Differenzierung der mehrkernigen Riesenzellen zugrunde liegen, jedoch weiterhin unklar.

In dieser Studie zeigen wir, dass die Entstehung mehrkerniger Riesenzellen als Antwort auf IL-4 wesentlich von der Dynamik des Zytoskeletts abhängt und azytokinetische Zellteilung als auch Zell-Zell-Fusionen erfordert. Wir ermitteln, dass dem stressinduziertem bZIP Transkriptionsfaktor Atf3 eine entscheidende Rolle bei der Organisation des Vorgangs der IL4-nachgelagerten Makrophagenfusion zukommt. Wir zeigen, dass die Atf3 Expression als Antwort auf IL-4 ansteigt und dass seine Aktivität die Mechanotransduktionsmaschinerie der Zellen kontrolliert. Insbesondere, zeigen wir, dass Atf3 eine Rolle bei der Regulation der Dynamiken und

Organisation des Aktinzytoskeletts spielt, welche für die Zellmigration und die Bildung von Membranprotrusionen, einschließlich krafterzeugender Podosomen, erforderlich ist. Darüber hinaus tritt Atf3 durch die Regulation von Lamin A/C als ein Schlüsselregulator der Nukleoskelettstruktur und -komposition hervor. Dabei ist auffallend, dass die Veränderungen der Zell- und Zellkern-Morphologie in Atf3-defizienten Makrophagen, welche mit genomischer Instabilität verbunden sind, sehr an Laminopathien erinnern. Während Atf3 für die IL4-getriebene Bildung von mehrkernigen Riesenzellen durch Fusion erforderlich ist, scheint es für die Mehrkernbildung von Makrophagen durch TLR2, welche vornehmlich azytokinetische Zellteilung benötigt, entbehrlich zu sein.

Zusammenfassend, definieren wir Atf3 als einen integralen Regulator der Mechanotransduktionsmaschinerie und der mechanischen Homöostase in Makrophagen. Durch die Steuerung von zyto- und nukleoskeletalen Funktionen, dient Atf3 als Hüter der Genomstabilität während der IL-4 stimulierten Zellfusion. Diese Studie deckt eine neue Ebene der Atf3-vermittelten Transkriptionsregulation in Makrophagen auf, die durch mechanische Signale moduliert wird. Darüber hinaus, verknüpft Atf3 transkriptionsvermittelte Immunantworten mit der Funktion des Zytoskeletts und stellt so einen neuen Zusammenhang zwischen Umgebungssignalen und der Chromatinregulation her, welches zur Plastizität von Makrophagen beitragen könnte.

