
The role of DNA damage in mediating innate immune response in macrophages

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Universität zu Köln



vorgelegt von

Aakanksha Bansal

aus Meerut, India

Koln, Aug 2019

Summary

The DNA damage response (DDR) has been reported to be involved in diverse macrophage functions, suggesting the interplay and overlap between the DDR and innate immune response. Moreover, studies show that conventional chemotherapeutics targeting specifically neoplastic cells, modulate the density and function of immune contexture in the tumor microenvironment (TME), thereby directly affecting therapeutic outcomes. Despite a plethora of studies linking DDR with macrophages, the reprogramming of macrophages in response to DNA damage remains obscure. Therefore, I addressed whether DDR could prime macrophages, thus altering the functional orientation of macrophages. To study macrophages' response to genotoxic stress, the phenotypes of DNA damage-primed macrophages were characterized. The data demonstrate that DNA damage priming of macrophages causes a fundamental phenotypic shift, involving changes in histone organization and modification, metabolic pathways, followed by altered cell surface receptor repertoire and functional reprogramming. The DNA damage-primed macrophages secrete less interleukin 6 (IL6) in response to lipopolysaccharide (LPS) and phagocytose more *E.coli* bioparticles compared to naïve macrophages. The M_{DDR} also acquire a senescence phenotype (Senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and senescence-associated beta-galactosidase staining (SA-β Gal) positive), as they differentiate and exhibit enhanced expression of cell surface markers such as *cd206* and PD-L1, enhanced oxygen consumption rate (OCR) along with altered actin cytoskeleton and cell morphology.

Furthermore, to dissect the molecular mechanisms underlying adaptive response to DNA damage in macrophages, the phosphoproteomics approach was used, which emphasized the role of ATM and histone modifications in mediating functional phenotypes of DNA damage-primed macrophages. The histone deacetylase inhibitor and ATM kinase inhibitor reversed the hampered secretion of IL6 in endotoxin tolerance assay and enhanced uptake of *E.coli* bioparticles in phagocytosis assay in M_{DDR}. Interestingly, the histone deacetylation inhibition did not affect SA- β Gal staining of M_{DDR}. In contrast, inhibition of ATM promptly inhibited the SA- β Gal staining and further drove M_{DDR} towards apoptosis, implying that ATM is the key kinase orchestrating survival and functions of macrophages in response to DNA damage. Collectively, this study shows that DNA damage response activation is sufficient to prime the macrophage and modulate its function.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass die DNA-Schadensantwort (DDR) an verschiedenen Makrophagenfunktionen beteiligt ist, was auf das Zusammenspiel und die Überlappung zwischen der DDR und der angeborenen Immunantwort hindeutet. Darüber hinaus zeigen Studien, dass früher entwickelte konventionelle Chemotherapeutika, bei denen festgestellt wurde, dass sie neoplastische Zellen ansprechen, die Dichte und Funktion der Immunkontextur der Mikroumgebung des Tumors (TME) anpassen, wodurch sie einen direkten Einfluss auf das therapeutische Ergebnis nehmen. Trotz einer Fülle von Studien, die DDR mit Makrophagen in Verbindung bringen, bleibt die Neuprogrammierung von Makrophagen als Reaktion auf DNA-Schäden unklar. Daher habe ich mich mit der Frage befasst, ob DDR Makrophagen prägen und so die funktionelle Orientierung dieser verändern kann. Um die Reaktion von Makrophagen auf genotoxischen Stress zu untersuchen, wurden die funktionellen Phänotypen von Makrophagen, welche DNA-Schäden erlitten haben, charakterisiert. Die erfassten Daten zeigen, dass die DNA-Schadensantwort von Makrophagen eine grundlegende phänotypische Veränderung verursacht hat, welche Veränderungen in der Histonorganisation und -modifikation und den Stoffwechselwegen früh in der Differenzierung bewirkt, gefolgt von einem veränderten Oberflächenrezeptor-Repertoire und einer funktionellen Neuprogrammierung. Die durch DNA-Schäden veränderten Makrophagen scheiden weniger Interleukin 6 (IL6) als Reaktion auf Lipopolysaccharide (LPS) aus und phagozytieren mehr *E. coli* Biopartikel als naive Makrophagen. Außerdem erwerben die M0-Makrophagen einen Senezenz-Phänotyp (Senescence-associated

heterochromatin foci (SAHF) und senescence-associated beta-galactosidase staining (SA-βGal Färbung positiv) während sie differenziert werden und zeigen eine verstärkte Expression M2 assoziierter Zelloberflächenmarker wie z.B. *cd206* und PD-L1, M2-ähnlicher Stoffwechseleigenschaften wie verstärkter Sauerstoffsverbrauchsrate (OCR) zusammen mit verändertem Aktin-Zytoskelett und Zellmorphologie. Um die molekularen Mechanismen weiter zu untersuchen, die der adaptiven Reaktion auf DNA-Schäden in Makrophagen zugrunde liegen, wurde ein Phospho-Proteomics-Ansatz verwendet, welcher die Rolle von ATM- und Histon-Modifikationen bei der Vermittlung von funktionellen Phänotypen von Makrophagen, die mit DNA-Schäden vorbehandelt wurden, betont. Dieser Ansatz wurde weiter verfolgt, indem chemische Inhibitoren in die Experimente mit funktionellen Assays einbezogen wurden. Die Histon-Deacetylase und der ATM-Kinase-Inhibitor kehrten die beeinträchtigte Sekretion von IL6 im Endotoxin-Toleranz-Assay um und verringerten die verstärkte Aufnahme von *E. coli*-Biopartikeln im Phagozytose-Assay im M_{DDR} . Interessanterweise hatte die Histondeacetylierungshemmung keinen Einfluss auf die SA-β-Gal-Färbung von M_{DDR} . Die ATM-Hemmung hemmte nicht nur die SA-β-Gal-Färbung, sondern trieb M_{DDR} in Richtung Apoptose. Dies impliziert, dass ATM die Schlüsselkinase ist, die das Überleben und die Funktionen der polarisierten Makrophagen als Reaktion auf DNA-Schäden koordiniert. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Aktivierung der DNA-Schadensantwort ausreicht, um die Makrophagen zu aktivieren und ihre Funktionspolarisation zu modulieren.
