

**Interplay between Cholesterol Homeostasis and Cytoskeleton Dynamics in
Multinucleated Giant Cell Formation**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Naziha Mroueh

aus Choueifat, Libanon

Köln 2023

**Interplay between Cholesterol Homeostasis and Cytoskeleton Dynamics in
Multinucleated Giant Cell Formation**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Naziha Mroueh

aus Choueifat, Libanon

Köln 2023

Gutachter:

Prof. Dr. Miroslava Uhlířová

Prof. Dr. Siegfried Roth

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ines Neundorff

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2023

ABSTRACT

Multinucleated giant cells (MGCs) are a shared feature of chronic inflammatory conditions, including tuberculosis, atherosclerosis, cancers, and foreign body reactions. Macrophages are extraordinarily plastic cells of the myeloid lineage that have a capacity to multinucleate under physiological and pathological conditions, forming osteoclasts and MGCs, respectively. Different types of MGCs have been described and are categorized according to their distinct features and functions. To date, the process underlying MGC formation has not been fully characterized. Our lab has previously demonstrated the requirement for Activating Transcription Factor 3 (ATF3) for MGC formation via cell-cell fusion in response to the anti-inflammatory cytokine Interleukin-4 (IL-4). In this thesis, we aimed to decipher the mechanisms governed by ATF3 in the formation of IL-4-induced MGCs. We focused on investigating the role of the immune response and cholesterol homeostasis, as both processes have been shown to be regulated by ATF3 in macrophages. We show that ATF3 controls MGC formation independently of the Nuclear Factor kappa-B (NF- κ B) pro-inflammatory signaling. We demonstrate that the derepression of the Cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) gene in ATF3-deficient cells and subsequent excessive 25-hydroxycholesterol (25-HC) production suppresses the mevalonate pathway, causing alteration of lipid homeostasis and protein prenylation. 25-HC treatment or pharmacological inhibition of protein prenylation interferes with MGC formation, recapitulating some aspects of ATF3 deficiency. Importantly, altered cellular morphology, actin turnover and deregulation of actin regulators were partially rescued in *Atf3^{KO}Ch25h^{KO}* cells, establishing CH25H as a regulator of the actin cytoskeleton downstream of ATF3. However, despite the remarkable rescue of cellular morphology and cholesterol levels, CH25H loss did not alleviate the cell-cell fusion defect of *Atf3^{KO}* cells, indicating an additional or parallel ATF3-dependent mechanism driving IL-4 macrophage fusion. Intriguingly, the comparative transcriptome profiling highlighted several plausible targets, including components of the MAPK signaling module, transcription factors, adhesion molecules and cytoskeleton regulators. In summary, our work demonstrates the importance of the interplay of cholesterol homeostasis, prenylation and cytoskeleton dynamics in regulating macrophage functions, controlled by ATF3.

ZUSAMMENFASSUNG

Multinukleäre Riesenzellen (MRZ) sind ein gemeinsames Merkmal chronisch-entzündlicher Erkrankungen, darunter Tuberkulose, Arteriosklerose, Krebserkrankungen und Fremdkörperreaktionen. Makrophagen sind außerordentlich plastische Zellen der myeloiden Linie, welche die Fähigkeit besitzen, unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu multinukleieren und dabei osteoklastenartige Zellen bzw. MRZ zu bilden. Verschiedene Arten von MRZ wurden beschrieben und nach ihren unterschiedlichen Merkmalen und Funktionen kategorisiert. Bis heute ist der Prozess, welcher der MRZ-Bildung zugrunde liegt, nicht vollständig charakterisiert. Unser Labor hat bereits zuvor die Notwendigkeit des aktivierenden Transkriptionsfaktors 3 (ATF3) für die MRZ-Bildung durch Zell-Zell-Fusion als Reaktion auf das entzündungshemmende Zytokin Interleukin-4 (IL-4) nachgewiesen. In dieser Dissertation zielten wir darauf ab, die Mechanismen zu entschlüsseln, die von ATF3 bei der Bildung von IL-4-induzierten MRZ gesteuert werden. Unser Fokus lag darauf, die Rolle der Immunantwort und der Cholesterin-Homöostase zu untersuchen, da gezeigt wurde, dass beide Prozesse durch ATF3 in Makrophagen reguliert werden. Wir zeigen, dass ATF3 die MRZ-Bildung unabhängig von der proinflammatorischen Signalgebung des Nukleären Faktors kappa-B (NF- κ B) kontrolliert. Wir demonstrieren, dass die Aufhebung der Repression des Cholesterin-25-hydroxylase (CH25H)-Gens in ATF3-defizienten Zellen und die anschließende übermäßige Produktion von 25-hydroxycholesterin (25-HC) den Mevalonatweg unterdrückt, was zu einer Veränderung der Lipidhomöostase und der Prenylierung von Proteinen führt. Die Behandlung mit 25-HC oder die pharmakologische Hemmung der Proteinprenylierung stören die MRZ-Bildung und bilden einige Aspekte der ATF3-Defizienz nach. Wichtig ist, dass veränderte Zellmorphologien, Wiederverwendungen von Aktin und Deregulierungen von Aktinregulatoren teilweise in *Atf3^{KO}Ch25h^{KO}*-Zellen wiederhergestellt wurden, wodurch CH25H als Regulator des Aktinzytoskeletts nach ATF3 etabliert wurde. Trotz der bemerkenswerten Verbesserung der Zellmorphologie und des Cholesterinspiegels linderte der CH25H-Verlust jedoch nicht den Zell-Zell-Fusionsdefekt von *Atf3*KO-Zellen, was auf einen zusätzlichen oder parallelen ATF3-abhängigen Mechanismus hindeutet, der die IL-4-Makrophagenfusion antreibt. Interessanterweise zeigte die vergleichende Transkriptomprofilierung mehrere plausible Ziele

auf, darunter Komponenten des MAPK-Signalmoduls, Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Zytoskelett-Regulatoren. Zusammenfassend zeigt unsere Arbeit die Bedeutung des Zusammenspiels von Cholesterin-Homöostase, Prenylierung und Zytoskelett-Dynamik bei der Regulation von Makrophagenfunktionen, die durch ATF3 gesteuert werden.