

# Role of NEMO/NF- $\kappa$ B signalling in microglia and astrocytes reacting to brain injury

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln



vorgelegt von  
Esther Schilasky, geb. Engelhardt  
aus Düren, Deutschland  
Köln, 2021

## I. Abstract

Following brain injury, microglia and astrocytes acquire so-called reactive states that contribute to regulate the extent of tissue inflammation. NF- $\kappa$ B signalling has been proposed as a key regulator of neuroinflammation, glial reactivity as well as neurodegeneration. However, the mechanisms and dynamics underlying NF- $\kappa$ B activation in reactive microglia and astrocytes during brain injury remain poorly understood. By utilizing a label-free proteomic approach, we show temporal differences in glial cell activation and NF- $\kappa$ B -dependent gene expression of microglia and astrocytes following controlled cortical stab-wound (SW) injury in mice *in vivo*. Taking advantage of a GFP-p65 (NF- $\kappa$ B subunit) knock-in mouse to monitor NF- $\kappa$ B nuclear translocation at the single-cell level, we confirm that after SW injury the activation of NF- $\kappa$ B is mostly restricted to microglia and astrocytes, yet while p65 undergoes fast (1 hour) translocation in microglia, astrocytes display a response delayed by 24 hours. To reveal the selective contribution of this temporally shifted activation of NF- $\kappa$ B, we generated two mouse lines to conditionally ablate the master regulator of NF- $\kappa$ B activation (NEMO) either in microglia or astrocytes during injury. Fixed-tissue time-course experiments and longitudinal 2-photon imaging in these mice disclosed differential changes in survival and proliferation of each of the investigated cell types. While astrocyte viability and reactivity were not visibly impaired upon astrocyte-specific NEMO deletion, loss of NEMO in microglia increased hallmarks of reactivity and triggered cell death, ultimately preventing microglial pool expansion at the injury site. However, microglia-specific p65 knock-out did not result in the expected microglial loss upon injury, suggesting that NEMO sustains survival of reactive microglia via NF- $\kappa$ B -independent functions. Interestingly, neuroinflammation was increased upon microglia-specific NEMO deletion. By contrast, loss of NEMO in astrocytes attenuated neuroinflammation following acute brain injury. Together, these data reveal glial subtype-specific roles of NEMO/NF- $\kappa$ B signalling in regulating cell reactivity with important implications for neuroinflammation and tissue repair.

## II. Zusammenfassung

Nach einer Gehirnverletzung gelangen Mikroglia und Astrozyten in einen sogenannten reaktiven Status, der zur Regulierung der Entzündung des Gewebes beiträgt. Der NF- $\kappa$ B Signalweg wird als ein Hauptregulator der neuronalen Entzündung, der Reaktivität von Gliazellen und der Neurodegeneration angesehen. Jedoch sind die Mechanismen und die Dynamiken der NF- $\kappa$ B Aktivierung in reaktiven Mikroglia und Astrozyten nur wenig verstanden. Durch das Nutzen markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierung zeigen wir zeitliche Unterschiede in der Aktivierung von Gliazellen und der NF- $\kappa$ B abhängigen Genexpression von Mikroglia und Astrozyten nach einer *in vivo* kontrollierten kortikalen Stichwunden(SW)-Verletzung in Mäusen. Mit Hilfe einer GFP-p65 (NF- $\kappa$ B Untereinheit) „knock-in“ Maus, die es uns ermöglicht, die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus auf der Ebene einzelner Zellen zu beobachten, bestätigen wir, dass nach einer SW-Verletzung NF- $\kappa$ B fast ausschließlich in Mikroglia und Astrozyten aktiviert wird. Während p65 bereits nach einer Stunde in den Nukleus von Mikroglia wandert, zeigen Astrozyten eine verspätete Antwort erst 24 Stunden später. Um den selektiven Beitrag dieser zeitlich verschobenen Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu verstehen, haben wir zwei Mauslinien generiert, in denen wir den Hauptregulator der NF- $\kappa$ B Aktivierung, NEMO, spezifisch in Mikroglia oder in Astrozyten während einer Verletzung eliminiert haben. Zeitreihen Experimente in fixiertem Gewebe sowie langanhaltende 2-Photonen Mikroskopie in diesen Mäusen offenbarte unterschiedliche Veränderungen im Überleben und der Proliferation der jeweils untersuchten Zellen. Während die Viabilität und die Reaktivität von Astrozyten nach Astrozyten-spezifischer Eliminierung von NEMO nicht sichtlich beeinträchtigt war, führte der Verlust von NEMO in Mikroglia zu einem Anstieg von Reaktivitätsanzeichen. Zudem wurde Zelltod ausgelöst, was die Vermehrung von Mikroglia an der Stelle der Verletzung schließlich verhinderte. Jedoch führte ein „knock-out“ von p65 speziell in Mikroglia nicht zu dem erwarteten Verlust von Mikroglia nach Verletzung, was darauf hinweist, dass NEMO das Überleben von reaktiven Mikroglia unabhängig von NF- $\kappa$ B gewährleistet. Interessanterweise war die neuronale Entzündung nach Mikroglia-spezifischer Eliminierung von NEMO erhöht. Im Gegensatz dazu milderte der Verlust von NEMO in Astrozyten die neuronale Entzündung nach einer akuten Gehirnverletzung. Zusammenfassend zeigen diese Daten eine spezifische Funktion von NEMO/NF- $\kappa$ B in der Regulation der Zell Reaktivität in Gliazellsubtypen, was eine wichtige Auswirkung auf die neuroanle Entzündung und die Wiederherstellung des Gewebes hat.