



Doctoral Thesis

## **Detour pathways mediate functional recovery in the injured central nervous system**

**Author(s):**

Engmann, Anne Katrin

**Publication Date:**

2016

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010863158> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 23957

# Detour pathways mediate functional recovery in the injured central nervous system

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANNE KATRIN ENGMANN

MSc ETH Biology

born November 6, 1986

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner

Prof. Dr. Fritjof Helmchen, co-examiner

Prof. Dr. Hanns-Ulrich Zeilhofer, co-examiner

Prof. Dr. Olivier Raineteau, co-examiner

2016

## Summary

Although the adult central nervous system (CNS) has been shown to form an inhibitory setting for plasticity and fiber growth after injury, limited levels of spontaneous recovery have been observed in animal models and human patients after incomplete spinal cord injury (SCI). Treatment independent regaining of function in the acute phase after the lesion is mainly based on resolving of secondary injury processes, such as edema, inflammation or spinal shock. Recovery in the chronic phase after the lesion is hypothesized to be caused by local plastic adaptations within the neuronal circuitry ranging from synaptic adjustments to local fiber growth. The potential for spontaneous plastic adaptations is very variable among different regions of the CNS. **Chapter 1** of this thesis reviews the detailed characteristics of the growth-inhibitory setting of the CNS, its spontaneous plastic potential and possible experimental approaches to enhance plasticity after SCI. This first, introductory chapter also addresses the pronounced mismatch between pre-clinical research, with its numerous experimental treatment strategies for enhancing fiber growth in animal models, and the clinical situation, where no causative therapies for SCI patients, besides rehabilitative training, are in use so far. Several possible explanations for this translational gap are discussed, the most important ones being shortcomings on the side of experimental studies, mainly suitability of animal and lesion models, problems apparent in clinical studies, patient selection and outcome measures, and the issue of missing causative data for correlative pre-clinical findings. In contrast to the corticospinal tract system, which can be found in vertebrates and is mainly involved in voluntary motor control and skilled movements, descending projections from the brainstem are evolutionarily very conserved and have been shown to play a major role in general posture, balance, muscle tone and over ground locomotion. Regenerative neuroscience of the last decades has mainly focused on plasticity originating from the cortex. Only in the last years interest in bulbospinal projections and their plastic potential has picked up again. This is mainly due to the finding that after incomplete SCI crude motor functions, like locomotor performance, show good recovery while skilled movements often stay heavily impaired. In **chapter 2** of this thesis, we describe a study investigating the spontaneous plastic potential of severed bulbospinal projections originating from the *Nucleus Reticularis Gigantocellularis* (NRG), a part of the reticular formation. The data presented in chapter 2 suggest that following SCI this brainstem nucleus is specifically plastic. Axotomized fibers start to locally sprout rostral to a C4 unilateral hemisection and re-wire onto intraspinal circuits. Combinatorial injections of different neuroanatomical tracers revealed close-apposition like structures being formed between newly formed NRG sprouts and a pool of C3/C4 propriospinal neurons. Those propriospinal neurons

in turn also react with a pronounced level of plasticity upon axotomy, increasing the number of midline-re-crossing fibers, thereby forming a bridge around the lesion, relaying NRG output to denervated target areas in the lower spinal cord. **Chapter 3** focuses on the question if the close-apposition like structures between reticulospinal fibers and propriospinal neurons observed in chapter 2 are indeed true synaptic connections. A retrograde mono-transsynaptic tracing approach, based on the modified rabies tracing technique published by the Callaway laboratory, was employed to answer this question. The findings of chapter 2 and 3 of this thesis and a study published by Zörner and Bachmann *et al.* in 2014 on the spontaneous plastic potential of spared NRG fibers following a C4 unilateral hemisection, indicate that the NRG displays two independent types of plastic adaptation after SCI: Spared NRG fibers start to grow in a compensatory fashion over the midline (compensatory plasticity) while directly axotomized NRG projections locally sprout and reconnect to intraspinal circuits (regenerative plasticity). Animals suffering from a C4 unilateral hemisection show surprising levels of recovery in hind limb locomotor function. The relevance and relative contribution of the two different types of NRG plasticity for functional recovery, however was not clear so far. In a study presented in **chapter 4**, we therefore set out to answer this question by applying an intersectional viral vector approach, introducing the chemogenetic receptor hM4Di selectively either in compensatory or regenerative or a combination of both types of NRG sprouting. The results from this study indicate that compensatory NRG sprouts are mainly involved in recovery of hindlimb function, while regenerative NRG sprouting seems to be important for regaining strength velocity, and timing of the fore limbs after spinal cord injury. The technical challenges experienced in the project presented in chapter 4 made the lack of a suitable toolbox to selectively manipulate neuronal activity in deep CNS structures in a non-invasive manner very obvious. The currently available methods for neuromodulation, like lesioning, opto- and chemogenetics, all have pronounced limitations, rendering them unsuitable for non-invasive activation or inhibition of regions located deep within the brain or spinal cord. Selective but non-invasive means of neuromodulation would enable causative research on the relevance of plastic adaptations following SCI for the observed functional recovery. Causative knowledge would increase the robustness of the potential treatment approaches manifold and additionally would enable experimental and clinical researchers to distinguish between beneficial and potentially detrimental effects, thereby increasing the chance for a successful translation of novel therapies into the clinical situation. In **chapter 5** we present a study aiming at establishing a new technical approach for neuromodulation: A combination of transgenetically overexpressed modified temperature-sensitive ion channels and specifically targeted magnetic nanobeads could be used to manipulate membrane potentials upon application of an alternating magnetic field. This project still is in an early phase and we here show the groundwork generating and validating modified channel variants and specifically targeted nanobeads *in vitro* and *in vivo* and establishing suitable behavioral assays to subsequently test the proposed magnetogenetic toolbox in an *in vivo* application. This thesis concludes with **chapter 6** by discussing the significance of the acquired data, highlighting remaining open questions and by suggesting potential new experiments and future directions.

## Zusammenfassung

Das adulte zentrale Nervensystem (ZNS) zeichnet sich durch eine wachstums-hemmende Umgebung aus, welche plastische Prozesse und Faserwachstum nach einer Rückenmarksverletzung sehr stark beeinträchtigt. Dennoch können sowohl im Tiermodell als auch bei Querschnitt gelähmten Patienten spontane Erholungsprozesse beobachtet werden. Das Therapie unabhängige Wiedererlangen von motorischen und sensorischen Fähigkeiten in der akuten Phase nach einer Läsion kann vor allem durch Vorgänge erklärt werden, welche mit sekundären Läsionseffekten zusammen hängen: Kurz nach der initialen Verletzung kommt es zu einer Reduzierung von Entzündungsprozessen, Ödeme werden abgebaut und der spinale Schock wird überwunden. In der chronischen Phase nach einer Rückenmarksschädigung hingegen spielen vor allem plastische Effekte eine Rolle. Der Begriff Plastizität beinhaltet eine Fülle an verschiedensten Vorgängen, welche von lokalen Veränderungen in den Netzwerken über Faserwachstum bis hin zu synaptischen Anpassungen reichen. Das Potential für spontane Erholung der verschiedenen Regionen im ZNS ist sehr verschieden und hängt vor allem von der Empfänglichkeit der Neurone für wachstums-hemmende Signale ab. Im **ersten Kapitel** dieser Doktorarbeit haben wir eine Übersicht über die spezifischen Eigenschaften der wachstums-hemmenden Umgebung im ZNS, das Potential verschiedenster ZNS Regionen zu spontaner Plastizität sowie experimentelle Strategien um das plastische Potential nach eine Verletzung des Rückenmarks zu verbessern, zusammen gestellt. In diesem Übersichtsartikel gehen wir auch auf die offensichtliche Diskrepanz zwischen der experimentellen Forschung und der momentanen Situation in der Klinik ein. Obwohl verschiedenste experimentelle Ansätze für eine Verbesserung der plastischen neuronalen Eigenschaften nach Läsion vorhanden sind und untersucht werden, gibt es bisher in der klinischen Realität, abgesehen von rehabilitativen Training, noch keine zugelassenen Therapien für Rückenmarksverletzung. Wie die detaillierten Ausführungen in Kapitel 1 zeigen, führen wir dies vor allem auf Versäumnisse auf der experimentellen (Probleme in der Relevanz von Tier- und Läsionsmodellen) und der klinischen Seite (Probleme bei der Auswahl der Patienten und der Messkriterien) sowie das Fehlen von kausalen Daten in prä-klinischen Studien zurück. Im Gegensatz zu kortiko-spinalen Bahnen, welche bei Wirbeltieren vorhanden und vor allem für die bewusste Kontrolle von Bewegung sowie die Feinmotorik verantwortlich sind, sind absteigende Bahnen aus dem Hirnstamm evolutionär stark konserviert und können auch schon bei Reptilien gefunden werden. Projektionen aus dem Hirnstamm, vor allem der retikulären Formation, spielen bekanntermassen eine massgebliche Rolle für die Kontrolle von Haltung, Balance und Muskeltonus sowie für die Generierung und Kontrolle von Lokomotion. Das Feld der regenerativen Neurobiologie hat sich in den letzten

Jahrzehnten vor allem auf plastische Vorgänge in den kortikalen Projektionen beschränkt. Erst seit einigen Jahren ist das Interesse an bulbospinalen Verbindungen und deren plastischem Potential nach Verletzungen wieder erwacht. Das neu-erweckte Interesse basiert vor allem auf der Erkenntnis, dass sich die grobe Lokomotion nach Rückenmarksverletzungen spontan wesentlich besser erholt als die Kontrolle der Feinmotorik. Das **zweite Kapitel** dieser Doktorarbeit widmet sich einer Studie, welche das plastische Potential von durchtrennten Fasern aus dem *Nucleus reticularis gigantocellularis* (NRG) im Detail untersucht. Die Daten dieser Studie zeigen, dass der NRG, welcher zur retikulären Formation gehört, nach einer Läsion besonders plastisch reagiert: Die axotomierten Fasern oberhalb der Läsion fangen an sich lokal zu verzweigen und bilden neue Verbindungen zu propriospinalen Neuronen welche in den spinalen Segmenten C3 und C4 lokalisiert sind. Die propriospinalen Neurone hingegen zeigen selber plastische Veränderungen: Nach einer inkompletten zervikalen Halbseitenläsion zeichnen sie sich durch ein erstaunliches Mass an Plastizität aus. Die gekappten Fasern fangen an stark auszuwachsen und bilden rück-kreuzende Verbindungen in die graue Materie unterhalb der Läsion. Diese Fasern, welche zweifach über die Mittellinie kreuzen, bilden damit eine Art Umgehungsstrasse um die Läsion welche potenziell Informationen aus dem NRG in die tiefer liegende Areale des Rückenmarks weiterleiten kann. Die Frage, ob es sich bei den beschriebenen Kontaktpunkten zwischen plastischen Fasern aus dem NRG und propriospinalen Zellkörpern tatsächlich um Synapsen handelt, adressieren wir im **dritten Kapitel** dieser Arbeit. Mit der Hilfe von mono-transsynaptischen viralen Vektoren konnten wir zeigen, dass sich zwischen den beiden genannten neuronalen Systemen Synapsen ausbilden, welche auch sechs Wochen nach der Läsion noch vorhanden sind. Die Ergebnisse der Studien aus Kapitel 2 und 3 dieser Arbeit, sowie aus einer Arbeit von Zörner und Bachmann *et al.*, welche 2014 publiziert wurde, zeigen, dass der NRG mit zwei unterschiedlichen Formen der Plastizität auf eine inkomplette Rückenmarksverletzung reagiert: Nicht betroffene Fasern wachsen nach einer zervikalen Halbseitenläsion im lumbalen Rückenmark über die Mittellinie (kompensatorische Plastizität), während durchtrennte NRG Fasern lokal wieder auswachsen und auf propriospinale Netzwerke verschalten (regenerative Plastizität). Ratten mit einer solchen Läsion, zeichnen sich durch eine erstaunliche Erholung der Hinterbeinfunktion aus. Die Bedeutung der beiden verschiedenen Plastizitätsformen für diese funktionale Erholung der Tiere ist allerdings bisher unbekannt und wurde in dem Projekt, welches im **vierten Kapitel** dieser These ausgeführt ist, mit Hilfe von chemogenetischen Methoden untersucht. Mit der Hilfe von adenoassoziierten Viren brachten wir in dieser Studie den chemogenetischen Rezeptor hM4Di selektiv entweder in kompensatorische oder regenerative NRG Fasern ein und ermöglichten dadurch eine spezifische Inaktivierung der einen oder anderen Form der Plastizität. Inhibition der beiden Plastizitätsformen zeigt, dass kompensatorische NRG Fasern vor allem für die Erholung der Hinterbeinfunktion wichtig sind, wohingegen regenerative NRG Fasern eine grosse Rolle in der Wiedergewinnung der Funktion der Vorderbeine spielen. Die technischen Schwierigkeiten welchen wir in Kapitel 4 dieser Arbeit ausgesetzt waren, zeigten deutlich, dass neue Techniken um neuronale Aktivität auch in tiefen Regionen des ZNS möglichst nicht-invasiv aber spezifisch modulieren zu können, dringend benötigt werden. Moderne methodischen Ansätze, wie

Opto- oder Chemogenetik, haben klare Limitationen, z.B. die beschränkte Penetrationstiefe von Licht oder die fehlende räumliche und zeitliche Spezifität von Chemogenetik, welche sie für den Einsatz im Rückenmark und für Fragen der regenerativen Neurobiologie unbrauchbar machen. Das detaillierte Wissen über kausale Zusammenhänge zwischen neuroanatomischen, plastischen Veränderungen und funktionaler Erholung nach einer Verletzung des ZNS, würde den Fortschritt in der therapeutischen, regenerativen Neurobiologie massiv beschleunigen, da die Forscher in der Lage wären korrelative Zusammenhänge zu testen und zwischen Erholungs-fördernden und -hemmenden Effekten zu unterscheiden. Dies wiederum würde die Erfolgsaussichten neuer Therapieansätze in klinischen Studien sehr stark erhöhen. Im **fünften Kapitel** dieser Arbeit präsentieren wir einen neuen methodischen Ansatz für nicht-invasive aber spezifische Neuromodulation: Eine Kombination aus Temperatur-sensitiven Ionenkanälen und Antikörper-dekorierten Eisenoxid Nanopartikeln, welche, unter dem Einfluss von alternierenden Magnetfeldern, zu einer De- oder Hyperpolarisation der Zielzellen führt. Da dieses Projekt noch am Anfang steht, zeigen wir im Rahmen dieser Doktorarbeit vor allem die Generierung und Validierung der benötigten genetischen Konstrukte und Nanomaterialien in Zellen und im Tiermodell, sowie die Etablierung von geeigneten Verhaltenstests mit welchen eine erfolgreiche Neuromodulation gezeigt werden kann. Die vorliegende Doktorarbeit schliesst mit **Kapitel sechs** ab, in welchem die Signifikanz der erarbeiteten Ergebnisse sowie potentielle weiterführende Projekte und offene Fragestellungen diskutiert werden.