

DISS. ETH NO. 25103

**THE SPINAL TRANSCRIPTOME AFTER CORTICAL  
STROKE AND ITS IMPACT ON SPROUTING AND  
“SIDE-SWITCH” OF CONTRALESIONAL  
CORTICOSPINAL FIBERS**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
JULIA KAISER  
Master of Science, University of Heidelberg  
born July 8, 1987  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Martin E. Schwab  
Prof. Dr. Nicole Wenderoth  
Prof. Dr. Csaba Földy

2018

# SUMMARY

Stroke leads to severe neurological disability, often affecting motor and sensory systems. Thus, stroke survivors often face a majorly decreased quality of life. Treatment options for chronic stroke patients are limited, in part because of the lack of knowledge about the pathophysiological processes underlying the limited spontaneous recovery that can be observed within the first weeks after the insult. In response to cortical injury, the brain shows a high degree of plasticity to restore or compensate for lost behavioral functions in humans and in animal models. This is evidenced by the remapping of functions to related areas. In rodents, increased compensatory sprouting has been observed on several levels along the neuraxis such as the brainstem and the spinal cord. This structural plasticity most likely is a key element of functional recovery, however, the mechanisms that shape the rewiring are incompletely understood. The present work aims at understanding tissue-derived factors and molecular mechanisms, which may influence the intrinsic neuronal growth capacity on the spinal level after cortical stroke.

In **Chapter 1**, we summarize the anatomical substrate of skilled motor movements across mammalian species with the corticospinal tract (CST) emerging as the major supraspinal command system in primates and humans. Ablation of the CST leads to structural changes within this circuitry required for skilled motor movements. Reparative and compensatory reorganization of the CST system can be strengthened by rehabilitative training. The presented findings suggest the existence of an underlying region-specific molecular machinery. **Chapter 2** summarizes the current knowledge about the extrinsic and intrinsic molecular mechanisms shaping structural plasticity after stroke with a focus on the time line of major events such as (1) trigger of growth (2) branching of axon collaterals (3) axon elongation / pathfinding (4) synapse formation / target interaction (5) synapse refinement by strengthening of active synapses and elimination of weak synapses.

In **Chapter 3**, we aimed to address the anatomical and molecular changes in the stroke-denervated spinal hemicord and how they relate to plastic changes of the contralesional CST. We show a reorganization of contralesional CST axonal arbors in the cervical stroke-denervated spinal hemicord. RNA-Sequencing of their target area at time points matching the previously defined key phases of structural plasticity revealed a time point specific differential gene expression. Two major phases emerged: An early inflammatory phase within the first week after stroke, as well as a highly dynamic phase at four to six weeks after injury,

during which upregulation of growth-promoting genes may influence rewiring of sprouting corticospinal motor neurons (CSMNs). We showed that three of these differentially regulated genes, Semaphorin 6a, Netrin G2 and TGF- $\beta$ 1, all of which were up-regulated at 28 days after injury, could represent potential modulators of the stroke-induced structural plasticity based on their potential to rescue neurite outgrowth in a growth-inhibitory setup *in vitro*. A number of additional genes have been found to be differentially regulated in this mRNA expression screen that may provide novel candidates as modulators of the different phases and processes leading to stroke recovery.

In **Chapter 4**, we further addressed the potential influence of the early immune response on stroke recovery. We found an early activation of spinal microglia after cortical stroke specifically in the projection area of the lesioned CST. Transgenic reduction of the CX3C fractalkine receptor 1, a chemokine involved in neuron-microglia communication, led to a decreased recovery rate in a fine motor-related behavioral task, while the stroke lesion size was unaffected. This may suggest a positive involvement of microglia on functional recovery after stroke.

In summary, fiber growth and structural plasticity can be observed on spinal levels, in particular the intermediate laminae, within six weeks after cortical stroke in adult mice. Early inflammatory responses may trigger a favorable tissue environment for axonal sprouting of the contralesional CSMNs after stroke. At later phases of the recovery, the stroke-denervated spinal grey matter may present an orchestrated growth-promoting environment to new, re-innervating contralesional CST branches. The transcriptomic data set described here will serve as a resource to uncover underlying molecular mechanisms for key steps leading to stroke recovery, that may ultimately lead to novel neuroregenerative treatment options also for stroke patients.

# ZUSAMMENFASSUNG

Der Schlaganfall und seine Folgen zählen zu den führenden Ursachen von schwerwiegenden neurologischen Defiziten. Durch das Versagen von motorischen und sensorischen Systemen wird die Lebensqualität für den Patienten oft stark eingeschränkt. Die Behandlungsmöglichkeiten insbesondere in chronischen Stadien sind sehr limitiert. Dies ist zu großen Teilen darauf zurückzuführen, dass die Pathophysiologie der spontanen funktionellen Regeneration, die innerhalb der ersten Wochen nach dem Eintreten eines Schlaganfalls zu beobachten ist, bisher nur lückenhaft verstanden ist. Ein Grundelement dieser Regeneration ist eine anatomische Plastizität in Gehirnregionen, die funktionell mit den Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) verwandt sind, welche durch den ischämischen Insult geschädigt wurden. Die Neurone in diesen Regionen bilden durch Aussprossen neue Nervenfasern und stellen so neue Verbindungen innerhalb des Gehirns, des Hirnstamms oder des Rückenmarks her. Die genauen Mechanismen, wie diese erhöhte Plastizität auf molekularer Ebene zustande kommt, sind nach heutigem Stand der Wissenschaft jedoch nur wenig verstanden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich aus diesem Grund mit den Faktoren innerhalb des ZNS, die dieses Aussprossen initiieren und lenken können. Die hier erarbeiteten Resultate tragen zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei, die die funktionelle Erholung nach einem Schlaganfall steuern.

In **Kapitel 1** beschreiben wir die anatomischen Grundlagen der Feinmotorik von Ratten und Primaten und wie diese sich durch einen ischämischen Insult verändern. Hierbei wird besonders der Kortikospinaltrakt (KST) als wichtiges supraspinales Kontrollsystem hervorgehoben. Eine Läsion des KST führt in Nagern zu einer anatomischen Umstrukturierung und einer Neubildung von Schaltkreisen, die durch rehabilitative Übungen gezielt gestärkt werden können. In **Kapitel 2** legen wir den heutigen Wissensstand um die molekularen Grundlagen dieser anatomischen Plastizität dar. Der Zeitverlauf dieses regenerativen Faserwachstums kann in verschiedene Phasen unterteilt werden: (1) Wachstumsanstoß, (2) Aussprossen von Kollateralen aus dem Axon des kompensierenden Neurons, (3) Wachstum und Wegfindung zu den Zielzellen, (4) Synapsenbildung mit der Zielzelle, (5) Feinjustierung des neu gebildeten Schaltkreises durch Stärken von nützlichen und Entfernungen von hinderlichen Synapsen.

**Kapitel 3** fasst unsere Ergebnisse über die molekularen Veränderungen in der durch den Schlaganfall denervierten Hälfte des zervikalen Rückenmarks zusammen, einer Region, in der eine Umstrukturierung des kontraläsionalen KST zu beobachten

ist. Dieses Areal wurde mit Hilfe einer Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten, die den oben definierten Phasen der anatomischen Plastizität entsprechen, untersucht. Es konnte eine sehr spezifische zeitliche Expressionsmodulation verschiedener Gene beobachtet werden. Auf Basis dieser Transkriptom-Analyse wurden molekular zwei wesentliche Phasen definiert, die das Gewebe für die neu innervierenden Nervenfasern bereitstellt: Eine frühe inflammatorische Phase innerhalb der ersten Woche nach dem Schlaganfall, und eine spätere Phase zwischen vier und sechs Wochen nach dem Schlaganfall, in der wachstumsfördernde Gene verstärkt exprimiert werden. Diese Faktoren können möglicherweise das Aussprossen der kontraläsionalen KST Neurone beeinflussen. Für drei dieser Gene, Semaphorin 6a, Netrin G2 und TGF- $\beta$ 1, die vier Wochen nach dem Schlaganfall im denervierten Rückenmark verstärkt exprimiert werden, konnten wir mittels *in vitro* Experimenten eine mögliche Rolle als Wachstumsmodulatoren bestätigen. Zusätzliche vermehrt exprimierte Gene aus unserem etablierten Datensatz könnten als weitere Kandidaten dienen, die in den verschiedenen Phasen einen modulatorischen Einfluss auf die Regeneration nach Schlaganfall haben. In **Kapitel 4** gehen wir auf die möglichen Einflüsse der beobachteten frühen Inflammationsantwort in der denervierten Hälfte des zervikalen Rückenmarks auf Reparationsprozesse nach Schlaganfall ein. Eine frühe Aktivierung der spinalen Mikroglia nach einem kortikalen Schlaganfall wurde innerhalb des Areals beobachtet, in das Nervenfasern des degenerierenden KST vor dem Insult projiziert haben. Eine reduzierte Expression des Fraktalkin Rezeptors CX3CR1, der in die Neuronen-Mikroglia Verständigung involviert ist, führte in heterozygoten knock-out Mäusen zu einer verlangsamten Verbesserung der Feinmotorik des Vorderbeins nach Schlaganfall, ohne dass ein Einfluss auf die Läsionsgröße festgestellt wurde. Dies deutet auf eine positive Rolle der Mikroglia für die Regeneration nach Schlaganfall hin.

Zusammenfassend konnten wir im Zeitverlauf von sechs Wochen nach einem induzierten Schlaganfall in der Maus eine Umstrukturierung der axonalen Projektion des kontraläsionalen KST innerhalb des zervikalen Rückenmarks, insbesondere in den prämotorischen Schichten der grauen Substanz, nachweisen. Eine frühe inflammatorische Reaktion innerhalb dieses Gebietes könnte den Weg für eine erfolgreiche Regeneration ebnen. Zu späteren Zeitpunkten stellt die durch den Schlaganfall denervierte Hälfte des zervikalen Rückenmarks eine wachstumsfördernde Umgebung für einwachsende Axone des kontraläsionalen KST dar. Der in dieser Arbeit etablierte Transkriptom-Datensatz wird in zukünftigen Studien als wichtiges Hilfsmittel dienen, um grundlegende Fragen über die Gewebereparatur und Faserregeneration nach Schlaganfall zu beantworten. Dies ermöglicht hoffentlich, in der Zukunft neue neuroregenerative Behandlungsmöglichkeiten für Patienten in chronischen Stadien entwickeln zu können.