



Doctoral Thesis

PKC γ and CCK expressing neurons in the spinal processing of somatosensory information

Author(s):

Haueter, Sabine

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010616057> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

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. 23257

**PKC γ and CCK expressing neurons in the spinal
processing of somatosensory information**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SABINE HAUETER

Master of Science ETH in Biology

born on 28.06.1985

citizen of Langnau im Emmental

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Hanns Ulrich Zeilhofer

Prof. Dr. Thorsten Buch

Prof. Dr. Isabelle Mansuy

2016

Thesis summary

Chronic pain is a major cause of disability worldwide and is defined as pain lasting longer than two months and persisting after the initial source has vanished. Phenotypically, it is characterized by an altered pain perception that includes hyperalgesia (abnormally increased sensitivity to a painful stimulus), allodynia (an innocuous stimulus is perceived as painful) and spontaneous pain occurring in the absence of any sensory stimulation. The generation and maintenance of these responses is due to maladaptive peripheral and central changes, which include several features. One widely accepted mechanism is the disinhibition of pain processing circuits of the spinal dorsal horn. The loss of inhibition enables the input of low threshold mechanoreceptors (LTMs) to engage and activate nociceptive pathways. However, to what extent dorsal horn interneurons contribute to the modality specific somatosensory processing is only incompletely known. Both the excitatory and inhibitory dorsal horn interneurons are extremely heterogeneous regarding their distinct molecular markers, morphologies and firing patterns. Protein Kinase γ (PKC γ) immunoreactive (IR) neurons are located at the border between lamina II and III and are under tonic glycinergic inhibition, which is diminished under neuropathic pain states. The location of IR PKC γ neurons suggests, they might receive primarily input from fibers carrying innocuous input. Under neuropathic pain conditions the inhibition is reduced and innocuous stimuli are able to activate pain specific pathways thus accounting for hyperalgesia and allodynia.

A critical role of the PKC γ enzyme in neuropathic pain has already been established by using PKC γ deficient mice. However, the exact integration of PKC γ expressing interneurons in the dorsal horn neuronal circuit and their role in sensory processing has remained elusive. First aim of the thesis was to generate a PKC γ ^{iCre} mouse line allowing the modulation of the activity, the ablation and the elucidation of the connectivity of PKC γ expressing neurons. In the generated PKC γ ^{iCre} mouse line the expression of PKC γ was precisely analyzed by using a highly sensitive *in situ* hybridization. Signals of PKC γ mRNA transcripts were found throughout the superficial dorsal horn, but neurons with high number of transcript signals were located at the border of laminae II and III, where also the strongly IR PKC γ positive neurons were found. However, the number of PKC γ mRNA transcripts (97 ± 7) positive neurons outnumbered the IR PKC γ (17 ± 2) by the factor 5.7. This finding was underpinned by the more abundant eGFP expression after intraspinally injected viral vectors carrying a Cre dependent eGFP cassette. Here, only around $21 \pm 2\%$ of eGFP labeled cells were PKC γ immunoreactive and only $53 \pm 4\%$ eGFP positive neurons colocalized with Lmx1 β a marker for excitatory interneurons. Interestingly, around $19 \pm 1\%$ eGFP expressing neurons co-express Pax2, a marker of inhibitory interneurons. By using viral vectors harboring a Cre dependent Diphtheria Toxin subunit A (flex.DTA) cassette, the PKC γ -Cre expressing neurons were selectively and locally ablated. After ablation of PKC γ expressing neurons, mice developed a significantly decreased response rate to non-nociceptive (brush) and nociceptive (pinprick) mechanical stimuli compared to non-ablated control mice. Furthermore, the ablated animals had a significantly increased latency to noxious cold, whereas the sensitivity to heat (Hargreaves test) remained intact. After ablation of PKC γ neurons, mice did not develop allodynia or hyperalgesia after a chronic constriction injury of the neuropathic pain.

An exclusively excitatory population of interneurons in the deeper dorsal horn is characterized by the expression of the neuropeptide cholecystinin (CCK). The most dorsally located CCK neurons overlapped with the IR PKC γ neurons. Immunohistochemical analysis of double transgenic CCK^{Cre};Rosa26^{tdTomato} mice revealed that the vast majority of IR PKC γ neurons were

coexpressed with reporter red fluorescent protein tdTomato and $27 \pm 2\%$ of all tdTomato positive neurons were immunoreactive for PKC γ . In addition, two other distinct subsets of CCK interneurons were revealed through the analysis of an additional marker. $29 \pm 2\%$ of the CCK neurons expressed tdTomato but not c-Maf and PKC γ . A third population expressed the transcription factor c-Maf ($44 \pm 2\%$) in tdTomato positive neurons. Only few CCK neurons coexpressed PKC γ and c-Maf. To assess the role of CCK interneurons in somatosensory processing, double transgenic CCK^{Cre};Rosa26^{tdTomato} mice were intraspinally injected with a viral vector (AAV.flex.DTA), which led to a targeted ablation of CCK interneurons. These mice became progressively insensitive to noxious cold between day 5 and 18 after virus injection. TRPM8 – a cation channel activated by cold temperatures (8-30°C) and the cold-mimetic icilin – is expressed in a distinct subpopulation of sensory neurons. To assess whether CCK interneurons are receiving input from TRPM8 expressing fibers, CCK interneuron ablated mice received a subcutaneous injection of icilin into the plantar surface of the paw corresponding to the injection site. The CCK interneuron ablated animals exhibited a significant reduced response to icilin compared to control injected animals. Taken together, these results demonstrate that CCK neurons might be an important component in the cold sensing circuit.

In another project, I describe my contribution to the recently published work about spinal glycinergic interneurons. In GlyT2::Cre mice, the local ablation of glycinergic neurons by viral vectors harboring a flex.DTA cassette induced a robust neuropathic pain model. The resulting neuropathic pain proved to be irresponsive to morphine and gabapentin, drugs with known efficacy against many other neuropathic pain syndromes. By using a Cre dependent Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD, flex.hM3Dq-mCherry), the role of activated glycinergic neurons could be studied in normal and neuropathic conditions. The activation of glycinergic neurons by these receptors produced a significant reversal of neuropathic pain sensitization. This result demonstrated that inhibitory interneurons retain their inhibitory capability also in neuropathic disease states. Further, the activation of glycinergic neurons in naïve mice led to a desensitization to noxious mechanical, cold and thermal stimuli.

Taken together this thesis demonstrated that the combination of viral vectors, Cre dependent expression cassettes and various Cre mouse lines allows the analysis of genetically defined neuronal population in the spinal somatosensory processing.

Zusammenfassung

Chronische Schmerzen sind eine der Hauptursachen für Invalidität weltweit. Schmerz gilt als chronisch, wenn er anhält, auch nachdem die eigentliche Ursache verschwunden ist und der Schmerz somit keine biologische Funktion mehr erfüllt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist gekennzeichnet durch eine veränderte Schmerzwahrnehmung verschiedener Reize: Hyperalgesie (übermäßige Reaktion und erhöhte Schmerzempfindlichkeit auf einen normalerweise schmerzhaften Reiz), Allodynie (Schmerzempfinden auf Reize, die üblicherweise keine Schmerzen auslösen) und spontaner Schmerz ohne dass eine Berührung oder Stimulation stattgefunden hat. Der Generierung und Erhaltung dieser Reaktionen liegt eine fehlerhafte Anpassung an periphere und zentrale Veränderungen zugrunde. Eine bedeutende Rolle spielt dabei die Enthemmung schmerzspezifischer Schaltkreise im spinalen Hinterhorn. Dieser Hemmungsverlust auf zellulärer Ebene erlaubt den Zugang von niederschwellig aktivierten Mechanorezeptoren zu nozizeptiven Nervenbahnen. Es ist jedoch unklar in welchem Ausmass die Interneuronen im Hinterhorn in einer modalitätenspezifischen somatosensorischen Prozessierung involviert sind. Inhibitorische und exzitatorische Interneuronen im Hinterhorn sind sehr heterogen in Bezug auf molekulare Marker, Morphologien und Feuermustern. Immunoreaktive PKC γ -Neurone findet man vor allem an der ventralen Grenze von Lamina II und III und stehen im Normalfall unter tonischer glyzinerger Hemmung, die in einem chronischen Schmerzzustand jedoch vermindert ist. Aufgrund der Lage dieser immunoreaktiven PKC γ -Neuronen kann vermutet werden, dass sie vor allem Informationen von Fasern bekommen, die harmlose Reize transportieren. In einem chronischen Schmerzzustand findet eine Verminderung der Hemmung statt, was dann zu einer Aktivierung von schmerzleitenden Bahnen durch harmlose Reize führt und schlussendlich als Hyperalgesie, Allodynie oder spontaner Schmerz wahrgenommen wird.

Den PKC γ -exprimierenden Neuronen ist, aufgrund der Analyse von Mausmutanten mit fehlendem PKC γ -Protein, bereits eine wichtige Rolle in neuropathischen Schmerzen zugesprochen worden. Jedoch ist die genaue Einbindung dieser Neuronen in die Schaltkreise des Hinterhorns, sowie ihre Rolle in der sensorischen Prozessierung bis dato unklar. Ziel dieser Arbeit war es, zwei Mauslinien zu generieren, welche die spezifische Ablation, aber auch Modulation der neuronalen Aktivität ermöglichen sollen. Zudem sollte die Analyse der Konnektivität dieser PKC γ -exprimierenden Neuronen in die Schaltkreise möglich sein. In der generierten PKC γ ^{iCre} Mauslinie wurde die Expression von PKC γ mithilfe einer hochsensitiven in situ-Hybridisierung untersucht. Signale von PKC γ -mRNA-Transkripten wurden im gesamten superfizialen Hinterhorn gefunden. Neurone mit einer hohen Anzahl an Transkripten waren vor allem an der Grenze von Laminae II und III lokalisiert, dort wo auch die PKC γ -immunoreaktiven Neuronen gefunden wurden. Dabei wurden 5.7-mal mehr Neurone positiv für PKC γ -mRNA-Transkripte (97 ± 7) als positiv für PKC γ -Immunoreaktivität (17 ± 2) gefunden. Dieser Befund wurde unterstützt durch die Tatsache, dass nach intraspinaler Injektion eines Virus mit einer Cre-abhängigen eGFP-Kassette, in deutlich mehr Neuronen eGFP exprimiert wurden als PKC γ -Immunoreaktivität festgestellt wurde. Nur etwa $21 \pm 2\%$ der eGFP-positiven Zellen waren auch immunoreaktiv für PKC γ . Gut die Hälfte der eGFP-markierten Neuronen war positiv für den exzitatorischen Marker Lmx1 β , während $19 \pm 1\%$ der Neuronen inhibitorisch (Pax2-positiv) waren. Mithilfe eines viralen Vektors, der die Cre-abhängige Diphtherietoxin Fragment-A Kassette trägt, wurden die PKC γ -exprimierenden Neuronen selektiv und lokal ablatiert. Die

Mäuse mit ablatierten PKC γ Neuronen entwickelten – verglichen mit den Kontrolltieren - eine signifikante Reduktion der Reaktionsrate auf nicht-nozizeptive (Pinsel) und nozizeptive mechanische Reize (Nadelstiche). Ausserdem hatten die Tiere nach Ablation der PKC γ -Neuronen eine signifikant erhöhte Reaktionszeit auf Kältereiz, während die Sensitivität für Wärme (Hargreaves Test) intakt blieb. Ein Neuropathie-Modell (Chronic Constriction Injury; CCI) führte nur bei den Kontrolltieren zu Hyperalgesie und Allodynie.

In dieser Arbeit wurde zudem eine ausschliesslich exzitatorische Gruppe von Interneuronen im tieferen Hinterhorn analysiert, die charakterisiert ist durch die Expression des Neuropeptids Cholecystokinin (CCK). Die am weitesten dorsal gelegenen CCK-Interneuronen überlappen mit den immunoreaktiven PKC γ -Neuronen. Die immunohistochemische Analyse von doppelt transgenen CCK^{Cre};Rosa26^{tdTomato}-Mäusen zeigte, dass die grosse Mehrheit der immunoreaktiven PKC γ -Neuronen mit dem roten Fluoreszenzprotein (tdTomato) des Reporters kolokalisieren, während $27 \pm 2\%$ aller tdTomato-positiven Neuronen auch immunoreaktiv für PKC γ sind. Zudem wurden bei der Analyse von zusätzlichen Markern, zwei weitere unterschiedliche Gruppen gefunden. Erstens waren etwa $29 \pm 2\%$ nur tdTomato-positiv und zweitens exprimierten etwa $44 \pm 2\%$ der tdTomato-positiven Neuronen zusätzlichen den Transkriptionsfaktor c-Maf. Um die Rolle der CCK-Interneuronen in der somatosensorischen Prozessierung abschätzen zu können, wurden die doppelt transgenen Mäuse mit einem viralen Vektor, der das Cre-abhängige Diphtherietoxin Fragment-A trägt, intraspinal injiziert. Diese Mäuse entwickelten nach 5 Tagen eine Desensibilisierung auf Kältereiz, die sich bis 18 Tage nach der Operation noch weiter intensivierte. Der Kationenkanal (TRPM8), der durch kalte Temperaturen (8 bis 30 °C) und dem Agonist Iclin aktiviert wird, findet man auf einer spezifischen Gruppe von sensorischen Afferenzen. Um zu testen, ob CCK-Interneuronen Signale von TRPM8-exprimierenden Fasern erhalten, wurde der TRPM8-Agonist Iclin subkutan in die Unterseite der Hinterpfote injiziert. Tatsächlich verbrachten die ablatierten Mäuse im Vergleich mit den Kontrolltieren signifikant weniger Zeit mit Lecken und Beissen der injizierten Pfote. Zusammenfassend kann man sagen, dass die CCK-Interneuronen eine wichtige Komponente im Schaltkreis für die Kältewahrnehmung spielen können.

In einem weiteren Kapitel beschreibe ich meine Beteiligung an einer kürzlich publizierten Studie über spinale glyzinerge Interneurone. In GlyT2::Cre-Mäusen führte die lokale Ablation von glyzinergen Neuronen zu einem sehr stabilen neuropathischen Schmerzmodell. Analgetika wie Morphin, Gabapentin, HZ-166 und Muscimol, die als effiziente Behandlungsmöglichkeiten von neuropathischen Schmerzzuständen beschrieben werden, wurden in diesem Schmerzmodell getestet. Jedoch führte keiner der Wirkstoffe zu einem signifikanten analgetischen Effekt. Um die Eigenschaften der glyzinergen Neuronen in einem neuropathischen Schmerzzustand zu untersuchen, wurden GlyT2::Cre-Mäuse intraspinal mit einem viralen Vektor injiziert, der den Cre-abhängigen *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug* (DREADD) transportiert. In naiven Mäusen hatte die Aktivierung des Rezeptors eine Desensibilisierung auf Wärme- und Kältereize sowie auf schädliche mechanische Reize zur Folge. Die Aktivierung der glyzinergen Neuronen durch den Rezeptor in Mäusen mit neuropathischen Schmerzen führte zu einer signifikanten Reduktion des neuropathischen Schmerzzustandes. Dieses Resultat zeigte, dass die inhibitorischen Neuronen auch unter neuropathischen Bedingungen ihre inhibitorischen Eigenschaften beibehalten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Kombination von viralen Vektoren, Cre-abhängigen Expressionskassetten und verschiedener Cre-Mauslinien die Analyse von genetisch definierten neuronalen Populationen in spinalen somatosensorischen Prozessen ermöglicht.