

Identification of a Spinal Inhibitory Interneuron Population Critical for Stress-Induced Analgesia

Doctoral Thesis

Author(s):

Haenraets, Karen

Publication date:

2017

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000248157>

Rights / license:

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

IDENTIFICATION OF A SPINAL INHIBITORY INTERNEURON POPULATION CRITICAL FOR STRESS-INDUCED ANALGESIA

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KAREN HAENRAETS

MSc ETH in Biology

born November 5, 1985
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Hanns Ulrich Zeilhofer, examiner

Prof. Dr. Martin E. Schwab, co-examiner

I. SUMMARY

Pain is an experience with an important physiological function and beneficial for survival. Retraction from noxious stimuli can avert physical harm and recuperative behaviors such as immobilization promote healing after injuries. On the other hand, in potentially life threatening situations, it can be beneficial for survival to suppress pain. Descending pathways mediate this top-down control of pain. Key central nervous system (CNS) regions and neurotransmitter systems have been identified in these pathways, but the precise circuit, including the identity of involved neuron populations, remains elusive.

The functional analysis of pain circuits has long been hampered by the inability to identify and manipulate its cellular components. In the laboratory of Prof. Zeilhofer, we established a surgical procedure in mice: intraspinal injections of recombinant adeno associated viruses (rAAVs) (Haenraets et al., in revision). This technique enables the precise temporal and spatial delivery of any rAAV-encoded protein to cell populations.

To further increase the specificity of virus-mediated transgene delivery, we studied the impact of serotypes and promoters on neural transduction. We analyzed transduction at the injection site itself, as well as of distant neurons sending only projections to the injection site, such as neurons of the brain stem, cortex or the dorsal root ganglia (DRG). We found that all serotypes were able to transduce distant, connected neurons. However, by using the hSyn1 promoter, retrograde transduction, i.e. transduction of axons and axon terminals, was greatly reduced. Therefore, using this promoter provides a means to avoid the concurrent expression of effector proteins in DRG or supraspinal neurons when targeting the spinal cord. Conversely, retrograde transduction of supraspinal sites targeting the spinal cord can be enhanced up to 20-fold by using the recently developed AAV2retro serotype (Haenraets et al., 2017).

We employed these techniques to analyze the function of spinal interneurons marked by the expression of the transcription factor Gbx1, which had previously been suggested as a genetic marker of a subset of inhibitory dorsal horn neurons. We characterized Gbx1-expressing neurons in the adult mouse dorsal horn and found that Gbx1 neurons constitute a heterogeneous subset of inhibitory interneurons in laminae I to IV. We concluded that Gbx1 is a suitable driver for selective transgene expression in this subpopulation of inhibitory interneurons and therefore generated and characterized a Gbx1^{iCre} mouse line.

Subsequently, we injected Cre-dependent rAAV vectors containing hSyn1 promoter-controlled expression cassettes into the spinal cord of adult Gbx1^{iCre} mice. We manipulated the activity of spinal Gbx1 neurons using targeted expression of the pharmacogenetic receptors hM3Dq and hM4Di for neuron activation and inhibition, respectively. While inhibition of spinal Gbx1 neurons had little effect on the responses to acute noxious stimuli, activation markedly reduced responses to noxious mechanical, cold and heat stimuli.

This finding lead to the hypothesis that supraspinal input is required to recruit spinal Gbx1 neurons to mediate analgesia. To test this hypothesis, we used pharmacogenetic inhibition of Gbx1 neurons in

combination with swim stress. We found that temporary loss of function of Gbx1 neurons entirely prevented swim stress-induced analgesia, showing that Gbx1 neurons are indeed necessary for stress-induced analgesia.

We identified several brain areas that supply descending projections onto spinal Gbx1 neurons. The large majority of input originated from inhibitory neurons of the rostral ventromedial medulla (RVM). We confirmed these brainstem neurons to provide functional synaptic input onto spinal Gbx1 neurons. We therefore propose that this inhibitory RVM-spinal cord pathway controls Gbx1 neurons, a spinal inhibitory interneuron population crucial for stress-induced analgesia (Haenraets et al., in preparation).

HAENRAETS, K., ALBISETTI, G. W., FOSTER, E. & WILDNER, H. in revision. Manipulating genetically defined neurons of the mouse spinal cord by intraspinal injection of recombinant AAV. *J Vis Exp*.

HAENRAETS, K., FOSTER, E., JOHANNSEN, H., KANDRA, V., FREZEL, N., STEFFEN, T., JARAMILLO, V., PATERNA, J. C., ZEILHOFER, H. U. & WILDNER, H. 2017. Spinal nociceptive circuit analysis with recombinant adeno-associated viruses: the impact of serotypes and promoters. *J Neurochem*, 142, 721-733.

HAENRAETS, K., GANLEY, R. P., SCHALBETTER, S., LUZI, F., FUCHS, M., YANG, L., JOHANNSEN, H., WILDNER, H. & ZEILHOFER, H. U. in preparation. Identification of a spinal inhibitory interneuron population critical for stress-induced analgesia.

II. ZUSAMMENFASSUNG

Schmerzen haben eine wichtige physiologische Funktion und sichern das Überleben. Schädlichen Einflüssen auszuweichen ist essentiell um physischem Schaden vorzubeugen und schonendes Verhalten fördert die Heilung nach Verletzungen. Andererseits kann es in potentiell lebensgefährlichen Situationen von Nutzen sein Schmerzen zu unterdrücken. Absteigende Schmerzbahnen vermitteln diese Top-down-Kontrolle des Schmerzes. Entscheidende Regionen des Zentralnervensystems (ZNS) und wichtige Neurotransmitter-Systeme für diese Kontrolle wurden identifiziert, aber die genauen Schaltkreise, einschließlich der Identität spezifischer Neuronenpopulationen, sind nach wie vor unbekannt.

Die funktionelle Analyse von neuronalen Schmerznetzen wurde lange dadurch behindert, dass ihre zellulären Komponenten nicht identifiziert und manipuliert werden konnten. Wir haben eine Operationstechnik an Mäusen, intraspinale Injektionen von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (rAAVs), im Labor von Prof. Zeilhofer etabliert (Haenraets et al., eingereicht). Diese Technik ermöglicht die zeitlich und räumlich präzise Applikation eines beliebigen rAAV-kodierten Proteins. Das Protein kann hierdurch spezifisch in bestimmten Zellpopulationen exprimiert werden.

Um die Spezifität weiter zu erhöhen, untersuchten wir den Einfluss von Serotypen und Promotoren auf die Transduktion von Neuronen. Wir haben die Transduktion von Neuronen an der Injektionsstelle, als auch von solchen in weiter entfernten Regionen (Hirnstamm, Kortex und Spinalganglien), die zu der Injektionsstelle projizieren, analysiert. Wir stellten fest, dass alle Serotypen Neuronen in entfernten Regionen transduzieren können. Durch Verwendung des hSyn1-Promotors kann jedoch die retrograde Transduktion, d.h. die Transduktion über Axone und Axonterminals, stark reduziert werden. Daher stellt die Verwendung dieses Promotors ein geeignetes Mittel dar, um zu verhindern, dass das Effektorprotein abgesehen von Rückenmarkneuronen auch in Spinalganglien oder in supraspinalen Nervenzellen exprimiert wird. Andererseits kann die Effizienz der retrograden Transduktion von supraspinalen Neuronen, die auf das Rückenmark projizieren, durch Verwendung des kürzlich entwickelten AAV2retro-Serotyps um das 20-fache erhöht werden (Haenraets et al., 2017).

Wir verwendeten diese Techniken, um die Funktion von spinalen Interneuronen zu untersuchen, die durch die Expression des Transkriptionsfaktors Gbx1 gekennzeichnet sind. Gbx1 wurde zuvor als genetischer Marker einer Untergruppe von inhibitorischen Hinterhornneuronen vorgeschlagen. Wir charakterisierten Gbx1-exprimierende Neuronen im Hinterhorn der erwachsenen Maus und fanden heraus, dass Gbx1-Neuronen eine heterogene Untergruppe von inhibitorischen Interneuronen in den Laminae I-IV bilden. Wir folgerten, dass der Gbx1 Locus dafür geeignet ist, ein Transgen selektiv in dieser Subpopulation von inhibitorischen Interneuronen zu exprimieren. Daher generierten wir eine Gbx1^{Cre}-Mauslinie und charakterisierten diese. Wir injizierten Cre-abhängige rAAV-Vektoren, die hSyn1-Promotor-kontrollierte Expressionskassetten enthielten, in das Rückenmark dieser Mäuse. Dies ermöglichte die Manipulation der Aktivität von spinalen Gbx1-Neuronen, durch gezielte Expression der pharmakogenetischen Rezeptoren

hM3Dq und hM4Di. Die Inhibierung der spinalen Gbx1-Neuronen (über hM4Di) hatte nur einen geringen Einfluss auf die Reaktionen der Tiere auf akute schädliche Reize. Dagegen reduzierte die Aktivierung (über hM3Dq) die Reaktionen auf schädliche mechanische, kalte und heiße Stimuli deutlich. Dies deutet darauf hin, dass supraspinaler Input für die Rekrutierung von Gbx1-Neuronen erforderlich ist, um Analgesie herbeizuführen. Für die Überprüfung dieser Hypothese verwendeten wir die pharmakogenetische Inhibierung von Gbx1-Neuronen in Kombination mit Schwimmstress. Wir stellten fest, dass ein temporärer Funktionsverlust der Gbx1-Neurone, die durch Schwimmstress verursachte Analgesie vollständig verhinderte.

Wir identifizierten mehrere Gehirnareale, von denen absteigende Projektionen auf spinale Gbx1-Neurone ausgehen. Der Grossteil stammte von inhibitorischen Neuronen der rostralen ventromedialen Medulla (RVM). Wir konnten verifizieren, dass diese Hirnstammzellen funktionale Synapsen mit spinalen Gbx1-Neuronen bilden. Daher schlagen wir vor, dass diese inhibitorische RVM-Rückenmarksverbindung dazu dient Gbx1-Neuronen zu kontrollieren, welche eine spinale inhibitorische Interneuronpopulation darstellen, die kritisch für die stressinduzierte Analgesie sind (Haenraets et al., in Vorbereitung).

HAENRAETS, K., ALBISETTI, G. W., FOSTER, E. & WILDNER, H. in revision. Manipulating genetically defined neurons of the mouse spinal cord by intraspinal injection of recombinant AAV. *J Vis Exp*.

HAENRAETS, K., FOSTER, E., JOHANNSEN, H., KANDRA, V., FREZEL, N., STEFFEN, T., JARAMILLO, V., PATERNA, J. C., ZEILHOFER, H. U. & WILDNER, H. 2017. Spinal nociceptive circuit analysis with recombinant adeno-associated viruses: the impact of serotypes and promoters. *J Neurochem*, 142, 721-733.

HAENRAETS, K., GANLEY, R. P., SCHALBETTER, S., LUZI, F., FUCHS, M., YANG, L., JOHANNSEN, H., WILDNER, H. & ZEILHOFER, H. U. in preparation. Identification of a spinal inhibitory interneuron population critical for stress-induced analgesia.