

REPRESENTATION OF REINFORCEMENT SIGNALS IN THE NEOCORTEX BY VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE- EXPRESSING INTERNEURONS

Ph.D. tézis
Szadai Zoltán, MD

Szentágotthai János Doktori Tagozat
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Rózsa Balázs MD, Ph.D

Hivatalos bírálók: Réthelyi János MD, Ph.D
Fiáth Richárd Ph.D

Komplex vizsga bizottsági elnök:
Dobolyi Árpád, Ph.D, D.Sc

Komplex vizsga bizottsági tagok:
Bódizs Róbert, Ph.D
Lénárt Nikolett, Ph.D

Budapest, 2025

1. Bevezetés

Az agykéreg egyik feltételezett funkciója, hogy összetett modelleket hoz létre a külvilágról, amelyek segítségével képes előre jelezni a jövőbeli eseményeket. Ezek a modellek olyan információkat is tartalmazhatnak, amelyek az élőlények életkilátásait befolyásoló események hatásaira vonatkoznak. E folyamat pontos biológiai mechanizmusai jelentősége ellenére még nem tisztázottak. Különböző kérgi területeken végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a vasoaktív intesztinális polipeptidet (VIP) tartalmazó interneuronok szubkortikális eredetű, megerősítéssel kapcsolatos jelzéseket kaphatnak. A kérgi mikroáramkörökben a VIP interneuronok más interneuronokat gátolnak, ezáltal felszabadítják a piramissejteket az őket érő gátlás alól. E sajátos működésük, a szenzoros feldolgozásban betöltött szerepük mellett, különösen alkalmassá teszi őket a kérgi plaszticitás szabályozására. Ennek révén hozzájárulhatnak új emléknymok kialakításához, valamint a külvilágról alkotott belső modellek szükség szerinti módosításához.

2. Célkitűzések

A megerősítéssel kapcsolatos jelzések előfordulása egyfajta globális tanító jelként szolgálhat, elősegítve az előrejelző ingerek és a megerősítés közötti asszociáció kialakulását. Bár VIP interneuronok aktivitása megerősítést követően más agyterületeken – például a hippocampusban és a mediális prefrontális kéregben jutalom után, illetve az amygdalában büntetéssel összefüggésben – már kimutatták más sejttípusokkal együtt, ezek a megfigyelések jól illeszkednek az adott területek funkcionális profiljához. Ezzel szemben a primer látó- és szomatoszenzoros kéregben nem figyeltek meg aktivitásnövekedést jutalmat követően, ami kérdéseket vet fel a globális tanító jel meglétét illetően. Ezért célul tűztem ki e kérdés mélyebb vizsgálatát, valamint annak feltárását, hogy milyen tényezők befolyásolják a megerősítéshez kapcsolódó jelátvitelt ezekben a kérgi területekben.

3. Módszerek

3.1. Kétfoton mikroszkópia

A képalkotást lehetővé tévő műtéthez az állatokat fentanil, midazolám és medetomidin kombinációjával altattuk, majd sztereotaxiás keretbe rögzítettük. Koponyamegnyitást (kraniotómiát) végeztünk, amelyet követően fedőlemezeket helyeztünk az agy felszínére, és egy fém fejrögzítő rudat fogorvosi cementtel segítségével rögzítettünk. A műtétet követően az állatokat ébresztettük, és Ringer-laktát oldattal láttuk el őket a kiszáradás megelőzése érdekében. Az indikátorfehérje, a GCaMP6f genetikai kódját tartalmazó vírusvektort üvegapillárison keresztül juttattuk az agyba 10–20 nl/s sebességgel.

A képalkotási rendszerhez egy saját fejlesztésű mikroszkóp rendszert, amelyet 920 nm-en működő MaiTai HP vagy Coherent Chameleon Ultra II lézerek egészítettek ki. Kvadráns detektorok és motoros tükrök stabilizálták a lézer útvonalát, míg akusztikai-optikai deflektorok irányították a nyalábot a 3D szkenneléshez. A ritkásan elhelyezkedő interneuronpopulációk leképezéséhez egy több, mint fél köbmilliméteres térfogaton belüli rétegfelvételeket ($689 \mu\text{m} \times 639 \mu\text{m} \times 580 \mu\text{m}$)

rögzítettünk, 10 vagy 20 μm rétegvastagságonként. A képeket háttéradatként tároltuk, majd megjelöltük a mérendő sejtek pozícióit. A szkenneléshez egy 10-20 μm -es tartományt jelöltünk ki minden egyes sejt középpont körül, 0,5–1 pixel/ μm felbontással (3D sakktabla szkennelés). A szkennerek ezek között a pontok illetve kis területek között „ugrott”, azaz a kijelölést ezáltal sejteket nem tartalmazó térrészleteket átugrotta, amely lényegesen gyorsabb volt, és jobb jel-zaj arányt eredményezett, mint más szkennelési módok. A 3D sakktabla szkennelés lehetővé tette akár 120 sejt aktivitásának rögzítését 27,8 Hz-en a teljes, $689 \mu\text{m} \times 639 \mu\text{m} \times 580 \mu\text{m}$ térfogatban. A térfogaton belüli pont-pont szkennelés ehhez a célhoz túl lassú lett volna, ami jól szemlélteti a 3D sakktabla szkennelés hatékonyságát az in vivo viselkedéses mérések során.

3.2. Magatartási feladatok

„Go/NoGo” halláson alapuló diszkriminációs feladat

Az egerektől a beszoktatás előtti napon az ivóvizet megvontuk. A beszoktatás során fokozatosan növekedett az az időtartam, amelyet az állatoknak a kísérleti környezetben el kellett tölteniük (1, 5, majd 10 perc), és minden periódus után pipettán keresztül vizetkaptak. A betanítás során az egerek egy 5 kHz-es

hangingerre válaszul a nyelvükkel megérintették a vízázó csövet a hang után 1–3 másodpercen belül, amiért 5 µl vízjutalom járt (találat – Hit). Ha nem reagáltak a hangra (kihagyás, Miss), nem kaptak jutalmat. Egy másik hanginger (0,5 kHz) esetén, ha az egér nyalt (téves riasztás – False Alarm, FA), enyhe légfuvallatot kapott büntetésként, míg ha nem reagált (helyes elutasítás – Correct Rejection, CR), nem történt semmilyen következmény. A beszoktatási lkalmak 100–200 próbát tartalmaztak, a protokollokat Matlab vezérelte. A hangokat PulsePal segítségével generáltuk, és Logitech hangszórókon keresztül juttattuk el az állatokhoz.

Pavlovi detekciós feladat

Ebben a paradigmában az egerek kétféle hangingerrel találkoztak: emelkedő („A” jelzőinger) és csökkenő frekvenciájú sípolással („B” jelzőinger). Az „A” jelzőinger után 2 másodperccel az esetek 80%-ában vízjutalom következett, míg a „B” jelzőinger nem járt semmilyen következménnyel. Ezen kívül az esetek 20%-ában jutalom érkezett előzetes jelzőinger nélkül. Ebben a feladatban nem alkalmaztunk büntetést.

4. Eredmények

4.1 Ritkásan elhelyezkedő interneuron populációk mérése

A VIP interneuronok a kérgi gátló sejtek 10–15%-át teszik ki, ritkán elhelyezkedő sejtek, kis sejttessel, ami miatt az elektrofiziológiai módszerek nem bizonyultak megfelelőnek vizsgálatukhoz. Ennek áthidalására képfelbontásos, kétfoton-mikroszkópiát alkalmaztunk, a 3D sakk-tábla szkennelési móddal kiegészítve, amely 170-szeres sebességnövekedést és 15-szörös jel–zaj arány (SNR) javulást eredményezett a rezonáns tüköralapú rendszerekhez képest. Ez lehetővé tette akár 120 sejt egyidejű aktivitásának mérését 27,8 Hz mintavételi frekvenciával, egy $689 \mu\text{m} \times 639 \mu\text{m} \times 580 \mu\text{m}$ térfogatban. A mozgási műtermékeket utólagosan korrigáltuk, hogy a kiemelt pontosságú adatkinyerés biztosítva legyen – ez kulcsfontosságú volt vizsgálatunk céljai szempontjából. Hasonló módszerrel sikeresen mértük PV interneuronok részvételét a hippocampusban éles hullám kialakulása során.

4.2 Az agykérgi VIP interneuronok aktiválódása megerősítés hatására

A mediális parietális kéregben (mPTA) a VIP interneuronok erőteljes aktivációt mutattak a jutalmazott (találat – Hit) és a büntetéssel járó (téves riasztás – FA) próbák során, míg alacsony aktivitást a kihagyás (Miss) és a helyes elutasítás (CR) típusú próbákban. A PV interneuronok nem mutattak következetes aktivációt. A vizsgálatokat kiterjesztve a motoros, szomatoszenzoros és vizuális kéregre azt találtuk, hogy a VIP interneuronok 83–85%-a reagált megerősítő eseményekre. Erős korreláció mutatkozott a jutalomra és a büntetésre adott válaszok között. Együttműködő partnereink fotometriával hasonló eredményeket találtak a mediális prefrontális kéregben (mPFC) és az auditoros kéregben is.

4.3 A VIP interneuronok megerősítésre adott válaszáinak heterogenitása

Ebben a részben azt vizsgáltuk, hogy a VIP interneuronok aktivitása hogyan változik különböző próbák során, illetve sejt szinten és kísérleti alkalmanként. A variabilitás mérésére a variációs együtthatót (CV) használtuk, és azt találtuk, hogy az

egyedi különbségek kisebbek voltak a megerősítéshez kapcsolódó próbák (Hit, FA) esetén. Főkomponens-analízissel (PCA) és k-means klaszterezéssel öt funkcionális sejtcsoportot azonosítottunk válaszmintázatuk alapján. Ezek a sejtcsoportok elsősorban a fluoreszcencia-görbék megerősítéshez képest késői szakaszai alapján különültek el, és a következő típusokra oszthatók: „gyors”, „késleltetett”, „tartós”, „bifázisos” és „lassú”. Emellett eltéréseket találtunk a sejttestek átmérőjében is, ami alátámasztja azt a feltevényt, hogy a funkcionális csoportok anatómiailag is különbözhetnek, és eltérő VIP sejttípusokat képviselhetnek.

4.4 A jutalmazás bekövetkezésére irányuló várakozás befolyásolja a VIP interneuronok aktiválódását

Az állatok „Go/NoGo” feladatban elért találati aránya befolyásolta a jelzőingerekre adott sejtválaszok nagyságának kísérleti alkalmak közötti változékonyságát: magasabb találati arány erősebb válaszokkal járt. A jutalom által kiváltott aktivitás a kísérleti alkalmak során csökkent, különösen azoknál az állatoknál, amelyeknél a találati arány meghaladta az 50%-ot, azaz amelyek a feladatot megtanulták. Az egyszerűbb pavlovi feladatban az előrejelző ingerekre adott előzetes nyalogatás

tanult asszociációt jelzett. A prediktív ingerek kiváltott aktivitás erősebbek volt, mint magára a jutalomra adott neurális válasz, ami arra utal, hogy a jutalom inkább az inger reprezentációját erősítette – hasonlóan a dopaminerg rendszerben megfigyeltekhez.

4.5 A megerősítéssel, általános agyi éberségi szinttel és mozgással összefüggő aktivitás szétválasztása VIP interneuronokban

A VIP interneuronok közvetítenek információt a mozgásról és az éberségi állapotról (arousal) is. Ennek elkülönítésére a megerősítéstől, mértük az állatok futási sebességét és pupillájuk tágasságát, miközben a „Go/NoGo” feladatot végezték. A VIP interneuronok aktivitása pozitív korrelációt mutatott a pupillaátmérővel: magas éberségi állapotban erősebb válaszokat figyeltünk meg. Hasonló moduláció volt megfigyelhető mozgás közben is. A pupillaméret jelentős változásai ellenére a fluoreszcenciajelek csak mérsékelten változtak, ami azt sugallja, hogy a VIP interneuronok megerősítésre adott válaszai nem magyarázhatók pusztán az az agyi általános éberségi szintben fellépő változásokkal.

Egy általánosított lineáris modell a fluoreszcenciagörbék varianciájának 18,8%-át magyarázta. A legerősebb magyarázó változó a pupillaátmérő volt, ezt követte a jutalom, büntetés és mozgás. Ez alátámasztja, hogy a VIP interneuronok aktivitását az általános agyi éberségi szint és a mozgás önmagukban nem magyarázzák meg.

4.6 A VIP interneuronok szerepe a lokális szenzoros feldolgozásban

Megvizsgáltuk, hogy a VIP interneuronok milyen szerepet játszanak a szenzoros feldolgozásban, és hogyan viszonyul ez a globális megerősítéshez kapcsolódó jelekhez. A „Go/NoGo” feladat és vizuális ingerlés kombinációját alkalmaztuk, utóbbit enyhén altatott egerekben. A VIP interneuronok aktiválódtak vizuális stimulációra, azonban kisebb specifikussággal, mint az összehasonlításként vett piramissejtek. A vizuális ingerekre adott válaszok csak gyengén korreláltak a megerősítésre adott válaszokkal, és nem mutattak összefüggést az irány- vagy orientációszelektivitással. Ez arra utal, hogy a VIP interneuronok képesek a globális megerősítő jelek és a lokális szenzoros ingerek független feldolgozására.

5. Következtetések

Ebben a munkában bemutattam, hogy a megerősítő jelzések miként reprezentálódnak az agykéregben. A VIP interneuronok egyfajta kapcsolóként működve kulcsszerepet játszanak ebben a folyamatban, és aktivációjuk hozzájárul egy általános tanító jel kialakításához, amely átmenetileg szabályozza az új emléknymok kialakulását és azok ingerekkel való társítását. Ez a jelátviteli mód eltér a mozgás által kiváltott aktivációtól, nem befolyásolja a lokális szenzoros feldolgozásban való részvételt, és feltehetően többféle neuronaltípusban is megjelenik. A tanító jel hasonlóságot mutat a dopaminerg rendszerben leírtakkal, azonban itt kizárólag pozitív predikciós hibára utaló jeleket figyeltünk meg a VIP interneuronokban. Ez arra utal, hogy megerősítésalapú tanulás valósulhat meg nem csak a kéreg alatti területeken, hanem az agykéregben is.

6. A doktorjelölt publikációinak irodalomjegyzéke

A tézishez kapcsolódó publikációk:

1. Szadai Z, Pi HJ, Chevy Q, Ocsai K, Albeanu DF, Chiovini B, et al. Cortex-wide response mode of VIP-expressing inhibitory neurons by reward and punishment. *Elife*. 2022;11.
2. Judak L, Chiovini B, Juhasz G, Palfi D, Mezriczky Z, Szadai Z, et al. Sharp-wave ripple doublets induce complex dendritic spikes in parvalbumin interneurons in vivo. *Nat. Commun*. 2022;13(1):6715.

A tézishez nem kapcsolódó publikációk:

1. Kerekes BP, Toth K, Kaszas A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, et al. Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex in vitro. *Neurophotonics*. 2014;1(1):011013.
2. Chiovini B, Turi GF, Katona G, Kaszas A, Palfi D, Maak P, et al. Dendritic spikes induce ripples in parvalbumin interneurons during hippocampal sharp waves. *Neuron*. 2014;82(4):908-24.

3. Szalay G, Judak L, Katona G, Ocsai K, Juhasz G, Veress M, et al. Fast 3D Imaging of Spine, Dendritic, and Neuronal Assemblies in Behaving Animals. *Neuron*. 2016;92(4):723-38.
4. Szalay G, Judak L, Szadai Z, Chiovini B, Mezey D, Palfi D, et al. [Fast three-dimensional two-photon scanning methods for studying neuronal physiology on cellular and network level]. *Orv Hetil*. 2016;157(18):724.
5. Palfi D, Chiovini B, Szalay G, Kaszas A, Turi GF, Katona G, et al. High efficiency two-photon uncaging coupled by the correction of spontaneous hydrolysis. *Org Biomol Chem*. 2018;16(11):1958-70.
6. Vasanits-Zsigrai A, Majercsik O, Toth G, Csampai A, Haveland-Lukacs C, Palfi D, et al. Quantitation of various indolinyll caged glutamates as their o-phthalaldehyde derivatives by high performance liquid chromatography coupled with tandem spectroscopic detections: derivatization, stoichiometry and stability studies. *J Chromatogr A*. 2015;1394:81-8.
7. Chiovini B, Palfi D, Majoros M, Juhasz G, Szalay G, Katona G, et al. Theoretical Design, Synthesis, and In Vitro Neurobiological Applications of a Highly Efficient Two-Photon Caged GABA Validated on an Epileptic Case. *ACS Omega*. 2021;6(23):15029-45.

8. Judák L, Dobos G, Ócsai K, Báthory E, Szebik H, Tarján B, et al. Mculus: an immersive virtual reality system for mice incorporating stereo vision
Nat. Methods. 2025;22(4):386–398

ΣIF: 97,317