

# KChIP4a: a biophysical modulator of learning from disappointment

Kauê Machado Costa

## English Summary

Inhibition of midbrain dopamine (DA) neurons codes for negative reward prediction errors, and causally affects conditioning learning. DA neurons located in the ventral tegmental area (VTA) display two-fold longer rebound delays from hyperpolarizing inhibition in comparison to those in the substantia nigra (SN). This difference has been linked to the slow inactivation of Kv4.3-mediated A-type currents ( $I_A$ ). One known suppressor of Kv4.3 inactivation is a splice variant of potassium channel interacting protein 4 (KChIP4), KChIP4a, which has a unique potassium channel inactivation suppressor domain (KISD) that is coded within exon 3 of the KChIP4 gene. Previous *ex vivo* experiments from our lab showed that the constitutive knockout of KChIP4 (KChIP4 KO) removes the slow inactivation of  $I_A$  in VTA DA neurons, with marginal effects on SN DA neurons. KChIP4 KO also increased firing pauses in response to phasic hyperpolarization in these neurons. Here I show, using extracellular recordings combined with juxtacellular labeling in anesthetized mice, that KChIP4 KO also selectively changes the number and duration spontaneous firing pauses by VTA DA neurons *in vivo*. Pauses were quantified with two different statistical methods, including one developed in house. No other firing parameter was affected, including mean frequency and bursting, and the activity of SN DA neurons was untouched, suggesting that KChIP4 gene products have a highly specific effect on VTA DA neuron responses to inhibitory input.

Following up on this result, I developed a new mouse line (KChIP4 Ex3d) where the KISD-coding exon 3 of KChIP4 is selectively excised by cre-recombinase expressed under the dopamine transporter (DAT) promoter, therefore disrupting the expression of KChIP4a only in midbrain DA neurons. I show that these mice have a highly selective behavioral phenotype, displaying a drastic acceleration in extinction learning, but no changes in acquisition learning, in comparison to control littermates. Computational fitting of the behavioral data with a modified Rescorla-Wagner model confirmed that this phenotype is congruent with a selective increase in learning from negative prediction

errors. KChIP4 Ex3d also had normal open field exploration, novel object preference, hole board exploration and spontaneous alternation in a plus maze, indicating that exploratory drive, responses to novelty, anxiety, locomotion and working memory were not affected by the genetic manipulation. Furthermore semi-quantitative IHC revealed that KChIP4 Ex3d mice have increased Kv4.3 expression in TH<sup>+</sup> neurons, suggesting that the absence of KChIP4a increases the binding of other KChIP variants, which known to increase surface expression of Kv4 channels.

Furthermore, in the course of my experimental study I identified that the most used mouse line where cre-recombinase is expressed under the DAT promoter (DAT-cre KI) has a different behavioral phenotype during conditioning in relation to WT littermate controls. These animals displayed increased responding during the initial trials of acquisition and delayed response latency extinction, consistent with an increase in motivation, which is in line with a decrease in DAT function.

I propose a working model where the disruption of KChIP4a expression in DA neurons leads to an increase in binding of other KChIP variants to Kv4.3 subunits, promoting their increased surface expression and increasing I<sub>A</sub> current density; this then increases firing pauses in response to synaptic inhibition, which in behaving animals translates to an increase in negative prediction error-based learning.

## Short German Summary

Die Inhibierung von dopaminergen (DA) Mittelhirn-Neuronen kodiert einen negativen Belohnungserwartungsfehler und beeinflusst das konditionelle Lernen. DA Neuronen in ventralen Tegmentalen Regionen (VTA) zeigen im Vergleich zu denen in der Substantia Nigra (SN) zweifach längere Rebound-Verzögerungen nach Hyperpolarisierungsinhibition. Dieser Unterschied wurde mit der langsamen Inaktivierung von Kv4.3-vermittelten A-Typ-Strömen ( $I_A$ ) in Verbindung gebracht. Ein bekannter Suppressor der Kv4.3-Inaktivierung ist die Spleißvariante des Kaliumkanal-Wechselwirkungsproteins 4 (KChIP4), KChIP4a, das eine einzigartige Kaliumkanalinaktivierungs-Suppressordomäne (KISD) aufweist, die durch das Exons 3 des KChIP4-Gens (KCNIP4) kodiert ist. Vorangegangene Ex-vivo-Experimente aus unserem Labor zeigten, dass das konstitutive Knockout von KChIP4 (KChIP4 KO) die langsame Inaktivierung von  $I_A$  in DA-Neuronen der VTA aufhebt mit marginalen Auswirkungen auf SN-DA-Neuronen. KChIP4 KO erhöhte auch die Aktivitätspausen als Reaktion auf phasische Hyperpolarisation in diesen Neuronen. Hier zeige ich unter Verwendung extrazellulärer Aufnahmen, kombiniert mit einer juxtazellulären Markierung bei anästhesierten Mäusen, dass KChIP4 KO auch selektiv die Anzahl und Dauer spontaner Aktivitätspausen durch VTA DA-Neuronen in vivo verändert. Die Pausen wurden mit zwei verschiedenen statistischen Methoden quantifiziert, darunter eine die in unseren Labor etabliert wurde. Kein anderer Aktivitätsparameter wird beeinflusst, einschließlich der Durchschnittsfrequenz und der schnellen phasischen Entladungen (sog. Bursts). Auch die Aktivität der SN DA-Neuronen bleibt unangetastet, was darauf hindeutet, daß KChIP4-Genprodukte einen spezifischen Effekt auf VTA-DA-Neuron haben, welche für den inhibitorischen Input verantwortlich sind.

Im Anschluss an diese Ergebnisse charakterisierte ich eine neue Mauslinie (KChIP4 Ex3d), in der das KISD-kodierende Exon 3 von KChIP4 selektiv durch eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Dopamin-Transporter (DAT)-Promotors herausgeschnitten wurde. Somit wurde das Exon 3 nur in dopaminergen Mittelhirn Neuronen eliminiert. Ich zeigte, dass dieses Mausmodell einen hochselektiven Verhaltensphänotyp aufweist, der sich in einer drastischen und selektiven Beschleunigung des Extinktionslernen zeigt. Der zeitliche Verlauf der Verhaltensdaten

wurde erfolgreich durch ein modifiziertes Rescorla-Wagner-Modell beschrieben, was die Aussage bestärkt, dass dieser Phänotyp durch einen selektiven Anstieg des Lernens in Folge negativer Vorhersagefehler verursacht wird. KChIP4 Ex3d Mäuse zeigen dagegen eine normale Offenfeld Exploration, sowie Präferenz für neuartige Objekte, und unverändertes Verhalten im Lochplattentest und beim spontanen Wechsel in einem Plus-Labyrinth-Test. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die explorative Motivation, wie auch die Reaktionen auf Neuheit und Angstzustände, Fortbewegung sowie Arbeitsgedächtnis durch die genetische Manipulation nicht beeinflusst wurden. Darüber hinaus zeigte die semi-quantitative immunohistologische Experimente, dass KChIP4 Ex3d-Mäuse eine erhöhte Kv4.3-Expression in TH<sup>+</sup>-Neuronen aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Abwesenheit von KChIP4a die Bindung anderer KChIP-Varianten erhöht, von denen bekannt ist, dass sie die Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen erhöhen.

Außerdem konnte im Rahmen dieser experimentellen Studie festgestellt werden, dass die am häufigsten verwendete Mauslinie, bei der die Cre-Rekombinase unter dem DAT-Promotor exprimiert wird (DAT-cre KI), einen veränderten Verhaltensphänotyp bei der Konditionierung in Vergleich zu Wildtyp-Geschwisterkontrollen aufweist. Diese Tiere zeigen verstärkte Reaktionen während der anfänglichen Versuche des Erwerbblernens und eine Verzögerung in der Latenz der Extinktion. Diese Beobachtungen stimmen mit der Zunahme der Motivation überein, die wiederum durch die Reduktion der DAT Funktion im cre-Modell verursacht sein könnte. Ich schlage zusammenfassend ein Arbeitsmodell vor, bei dem die Störung der KChIP4a-Expression in DA-Neuronen zu einer Erhöhung der Bindung anderer KChIP-Varianten an Kv4.3-Untereinheiten führt, was eine erhöhte Oberflächenexpression fördert und die I<sub>A</sub>-Stromdichte erhöht. Dadurch erhöhen sich die Aktivitätspausen als Reaktion auf synaptische Hemmung, welche selektiv das Lernen durch negative Vorhersagefehler verstärkt.

## Detailed German Summary

Der katecholaminerge Neurotransmitter Dopamin reguliert die Erregbarkeit und Plastizität von Synapsen durch seine Wirkung an zwei Rezeptor Hauptklassen: D1-Typ Rezeptoren (D1R), die überwiegend exzitatorisch sind, und die primär inhibitorischen D2-Typ Rezeptoren (D2R). In Säugetieren befinden sich die meisten DA Neuronen im Mesencephalon, im ventralen Tegmentum (VTA) und in der Substantia Nigra (SN), die vor allem postsynaptischen Dopaminrezeptoren finden sich in hoher Konzentration vor allem im Striatum. Störungen des dopaminergen Systems sind ausschlaggebend für einige neurologische und psychiatrische Erkrankungen. Aktivität in striatalen dopaminergen Zielregionen hängt kausal mit Lernprozessen zusammen, insbesondere mit Konditionierungen und Lernen durch Belohnung, d.h. Lernprozesse durch die ein Verhalten mit einem sensorischen Reiz (klassische Konditionierung) oder einer Handlung (operante Konditionierung) assoziiert wird. Dopaminerge Neuronen kodieren die Differenz zwischen erwarteten und tatsächlich erlebter Belohnung (verursacht durch Reize oder eigene Handlungen). Dieser sogenannte Belohnungserwartungsfehler stellt ein zentrales Lernsignal im Gehirn dar.

Dopaminerge Neuronen sind spontanaktive Schrittmacher. Unerwartete Belohnungen (d.h. positiven Belohnungserwartungsfehler) führen zu schnellen phasischen Entladungen (sog. Bursts;), während das Ausbleiben einer erwarteten Belohnung (d.h. negativen Belohnungserwartungsfehler) zur Hemmung von dopaminergem Aktivität führt (sog. Pausen); Diese Pausen sind kausal relevant für das Lernen aus enttäuschten Belohnungserwartungen. Insbesondere wird davon ausgegangen, dass phasisch zunehmende, dopaminerge Aktivität von niederaffinen striatalen D1R Rezeptoren detektiert wird, während striatale D2R Rezeptoren in Folge von Aktivitätspausen deaktiviert werden. Das Erlernen von Assoziationen zwischen Belohnungen und vorangehenden Stimuli zeigt sich durch eine Verstärkung des konditionierten Verhaltens und eine vermehrte Suche nach der erwarteten Belohnung. Das Ausbleiben einer erwarteten Belohnung führt hingegen zu einer Reduktion des konditionierten Verhaltens und wird Extinktion genannt.

Die biophysikalischen Eigenschaften dopaminergem Neuronen bestimmen, wie diese auf verhaltens-relevante Exzitation und Inhibition reagieren. Verschiedene

dopaminerge Subpopulationen exprimieren verschiedene Ionenkanäle, was dadurch unterschiedliche Arten von synaptischer Integration ermöglicht. Wie diese Diversität intrinsischer Erregbarkeit durch molekulare Mechanismen definiert wird und welche verhaltensrelevanten Konsequenzen sie nach sich zieht, ist jedoch nicht ausreichend geklärt. Die vorliegende Studie untersucht wie eine alternative Spleißvariante einer auxilären  $K^+$  Kanal Untereinheit, die möglicherweise für inhibitorische Integration zuständig ist, die Dynamik des Lernens aus Enttäuschung reguliert.

Inspiriert wurde die Studie durch die Beobachtung, dass dopaminerge Neuronen in der ventralen tegmentalalen Regionen (VTA) im Vergleich zu denen in der Substantia Nigra (SN) zweifach längere Rebound-Verzögerungen nach Inhibition zeigen. Dieser Unterschied wurde mit der langsamen Inaktivierung von Kv4.3-vermittelten A-Typ-Strömen ( $I_A$ ) in Verbindung gebracht. Ein bekannter Suppressor der Kv4.3-Inaktivierung ist die Spleißvariante A des Kaliumkanal-Interaktionsproteins 4 (KChIP4a), welches eine besondere Kaliumkanalinaktivierungs-Suppressordomäne (KISD) enthält, die durch das Exons 3 des KChIP4-Gens (KCNIP4) kodiert ist. Vorangegangene Ex-vivo-Experimente aus unserem Labor zeigten, dass das komplette Knockout von KChIP4 (KChIP4 KO) die langsame Inaktivierung von  $I_A$  in DA-Neuronen der VTA aufhebt, während sich die  $I_A$  Ströme in den DA-Neuronen der SN nur unwesentlich verändern. In Folge waren auch in vitro die post-inhibitorischen Aktivitätspausen bei DA VTA Neuronen in KChIP4 KO Mäusen im Vergleich zu Wildtypen verlängert.

Hier zeige ich unter Verwendung extrazellulärer Aufnahmen, kombiniert mit einer juxtazellulären Markierung und post-hoc histologischer Zell Identifikation, in Isofluran anästhesierten Mäusen, dass KChIP4 KO auch selektiv die Anzahl und Dauer von in vivo Aktivitätspausen von VTA DA-Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen verändert. Die Pausen wurden mit zwei verschiedenen statistischen Methoden quantifiziert: zum einen, die „Robust Gaussian Surprise“ (RGS) Methode und zum anderen einen Algorithmus, den ich speziell zur Pausendetektion in diesen Datensätzen entwickelt habe. Letzterer beruht den nicht-parametrischen Eigenschaften der Verteilungen von inter-spike Intervallen (ISI). Die Reduktion der Pausen konnte auch durch die Messung der maximalen Werte, der Schiefe und der Kurtosis der ISI Verteilung aufgezeigt werden; verglichen mit Wildtyp Mäusen waren all diese Werte kleiner. Kein anderer

Aktivitätsparameter wurde beeinflusst, einschließlich der Durchschnittsfrequenz und der schnellen phasischen Entladungen. Die Aktivität von SN Neuronen war ebenfalls unverändert. Dies weist darauf hin, dass die Gen Produkte des KChIP4 einen spezifischen Effekt auf die Wirkung von inhibitorischen Input auf VTA Zellen haben.

Im Anschluss an diese Ergebnisse charakterisierte ich eine neue Mauslinie (KChIP4 Ex3d), in der das KISD-kodierende Exon 3 von KChIP4 selektiv durch eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Dopamin-Transporter (DAT)-Promotors herausgeschnitten wurde. Somit wurde das Exon 3 nur in dopaminergen Mittelhirn Neuronen eliminiert. Diese Tiere und ihre Kontroll Wurfgeschwister wurden einem Lernprotokoll unterzogen, wobei ein Ton als Prädiktor für eine Belohnung mit Zuckerwasser diente. Um die Stärke der Assoziation von Prädiktor und Belohnung zu quantifizieren, wurde zum einen die Zeit gemessen, welche die Maus mit ihrer Schnauze im Flüssigkeitsspender verbrachte, zum anderen die Latenz mit der die Maus nach dem Ton den Flüssigkeitsspender aufsucht. Um die Extinktion zu testen, wurde den Tieren der Ton ohne darauffolgende Belohnung präsentiert. Die KChIP4 Ex3d Mäuse wiesen eine selektive Beschleunigung des Extinktions-Lernens auf, zeigten jedoch keine weiteren Unterschiede für andere Lernformen und Verhaltensweisen. Der Extinktionsphänotyp der KChIP4 Ex3d Mäuse manifestierte sich erst nach dem ersten Ausbleiben der Belohnung, so dass es sich in der Tat um eine selektive Veränderung des Lernverhaltens und nicht um eine grundsätzliche Störung der Motivation handelt.

Eine detaillierte Analyse des Verhaltens der Mäuse zeigte zudem, dass nur die Anzahl der Besuche des Flüssigkeitsspenders, nicht aber deren jeweilige Dauer bei den KChIP4 Ex3d Mäusen abgenommen hatte. Dies bedeutet, dass diese Mäuse sich seltener entscheiden in der Extinktionspause den Belohnungsbereich aufzusuchen.

Zusätzlich wurde von mir eine modifizierte Variante des Rescorla-Wagner Modells auf die experimentellen Daten angepasst. Dies ermöglichte eine unabhängige Abschätzung der positiven und negativen Belohnungserwartungsfehler. Diese Analyse bestärkte die These, dass der beobachtete Phänotyp durch eine selektive Steigerung des Lernens durch negative Belohnungserwartungsfehler verursacht wurde, da bei den modellierten Daten lediglich die Lernrate für den negativen Belohnungserwartungsfehler für die KChIP4 Ex3d Mäuse erhöht war. Wichtig ist hier anzumerken, dass die Qualität der Modelanpassung für beide Genotypen gleich gut war.

Der Knockout der 3. Exons von KChIP4 hatte dagegen keinerlei Auswirkungen auf spontane, Dopamin-abhängige Verhaltensweisen. Die KChIP4 Ex3d Mäuse verhielten sich normal bei der Exploration eines Offenfeldes, bei der Präferenz für neue im Vergleich zu bereits bekannten Objekten, sowie bei der Exploration eines Lochbrettes und der Nutzung des Arbeitsgedächtnisses. Desweiteren zeigte eine semi-quantitative, immunohistologische Untersuchung der Kv4.3 Kanaluntereinheit, dass deren Expression in den dopaminergen Neuronen der KChIP4 Ex3d Mäusen zugenommen hatte. Dies könnte bedeuten, dass die Abwesenheit von KChIP4a die Expression und das Trafficking von Kv4.3 Kanalkomplexen erhöhte.

Außerdem konnte im Rahmen dieser experimentellen Studie festgestellt werden, dass eine häufig verwendete cre-Mauslinie zur selektive Expression in dopaminergen Mittelhirnneuronen, bei der die Cre-Rekombinase unter dem DAT-Promotor exprimiert wird (DAT-cre KI), einen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwisterkontrollen veränderten Verhaltensphänotyp bei der Konditionierung aufweist. Diese DAT-cre KI Tiere zeigen verstärkte Reaktionen zu Beginn des Belohnungslernens und Verzögerungen beim Extinktionslernen. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit der Annahme einer bei diesem Genotyp erhöhten Motivation, die Folge eines hyperdopaminergen Phänotyps nach Reduktion der DAT Funktion sein könnte. Dieser Befund sollte die genauere Erforschung von Physiologie und Verhalten dieser Mauslinie anregen. Es wäre insbesondere wichtig zu testen, wie diese Tiere auf DAT-blockierende Stimulanten, wie Kokain, reagieren und dazu die Expressions Muster von DAT und dopaminergem Rezeptoren in verschiedenen Arealen des Striatums zu bestimmen.

Ich schlage zusammenfassend ein Arbeitsmodell vor, bei dem der Verlust der KChIP4a-Expression in DA-Neuronen zu einer Erhöhung der Bindung anderer KChIP-Varianten an Kv4.3-Untereinheiten führt, was eine erhöhte Oberflächenexpression des Kanalkomplexes und damit eine erhöhte  $I_A$ -Stromdichte nach sich ziehen könnte. In Folge, wären verlängerte Aktivitätspausen nach synaptischer Hemmung zu erwarten. Dies würde selektiv das Lernen durch negative Vorhersagefehler verstärken, so wie es in dieser Studie beobachtet wurde. Die genauen zellulären und molekularen Veränderungen, die sich aus dem Verlust von KChIP4a ergeben, sollten in zukünftigen Studien detaillierter untersucht werden, u.a. mit ex vivo elektrophysiologischen Methoden, Einzelzell-RT-PCR, proteomischer Analysen und Elektronenmikroskopie. Der

KChIP4a-abhängige Mechanismus könnte auch andere zelluläre Prozesse für Dopamin-abhängiges Lernen, wie z.B. die synaptische Plastizität dopaminerger Neuronen und verändern. Des Weiteren, haben genomweite Assoziationsstudien verschiedene KCNIP4-Varianten mit einer Vielzahl psychiatrischer Erkrankungen in Verbindung gebracht (ADHS, Depressionen und Drogenabhängigkeit). Es wäre hier interessant zu untersuchen, ob KChIP4 Ex3d Mäuse charakteristische Reaktionen auf krankheitsrelevante Stressfaktoren zeigen und ob krankheitsassoziierte Varianten des menschlichen KCNIP4 Gens die relative Expression von KChIP4a beeinträchtigen können.