

# 小脑内侧核谷氨酸能和 GABA 能神经元的差异编码策略

## Differential Coding Strategies in Glutamatergic and GABAergic Neurons in the Medial Cerebellar Nucleus

Orkun O'zcan,<sup>1</sup> Xiaolu Wang,<sup>2</sup> Francesca Binda,<sup>1</sup> Kevin Dorgans,<sup>1</sup> Chris I. De Zeeuw,<sup>2,3</sup> Zhenyu Gao,<sup>2</sup> Ad Aertsen,<sup>4,5</sup> Arvind Kumar,<sup>5,6</sup> and Philippe Isope<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Universite' de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Inte'gratives, F-67000 Strasbourg, France,

<sup>2</sup>Department of Neuroscience, Erasmus MC, 1105 BA Rotterdam, The Netherlands,

<sup>3</sup>Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam, The Netherlands,

<sup>4</sup>Faculty of Biology, University of Freiburg, Freiburg 79104, Germany,

<sup>5</sup>Bernstein Center Freiburg, University of Freiburg, Freiburg 79104, Germany, and

<sup>6</sup>Computational Science and Technology, School of Electrical Engineering and Computer Science, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm SE-100 44, Sweden

**摘要:**小脑通过小脑核输出的自适应控制在毫秒时间尺度上驱动运动协调和动作顺序。小脑核整合了来自小脑皮层和小脑两个主要兴奋性输入的高频信息:苔藓纤维和攀爬纤维侧枝。然而,核细胞如何处理这些输入携带的输入的速率和时间仍然存在争议。在这里,我们研究了小脑皮质输出(浦肯野细胞)对雄性小鼠体内已识别的小脑核神经元的影响。使用在浦肯野细胞中特异性表达 Channelrhodopsin2 的转基因小鼠和内侧核中的四极体记录,我们根据其动作电位的波形确定了两个主要的神经元组。这两组神经元分别与 VGLUT2-cre 和 GAD-cre 小鼠中 Chrimson 表达后通过光标记鉴定的谷氨酸能和 GABA 能神经元相吻合。类谷氨酸能神经元以高频率发射,并对浦肯野细胞群输入的速率和时间作出反应,而 GABA 能样神经元仅对浦肯野细胞的平均群体发射率高频率作出反应。此外,浦肯野细胞的同步激活可以在很宽的频率范围内夹带谷氨酸样细胞,而不是 GABAergic 样细胞。我们的研究表明,同步和有节奏的浦肯野细胞放电的下游效应取决于目标小脑核神经元的类型。

**关键词:**小脑核;小脑;体内电生理学;浦肯野细胞;时间编码

**意义声明:** 运动协调和熟练动作是由小脑核神经元的永久放电驱动的, 这些神经元将小脑计算传递到其他大脑区域。在这里, 我们着手研究内侧核小脑核神经元的特定亚型是如何由浦肯野细胞控制的, 浦肯野细胞是小脑皮层的唯一输出。我们可以分离出不同亚型的核细胞, 它们差异编码浦肯野细胞抑制。浦肯野细胞刺激以其放电频率夹带谷氨酸能投射细胞, 而 GABA 能神经元仅被抑制。这些差异编码策略可能有利于与运动控制的特定特征相关的小脑兴奋性输出的时间精度, 同时通过速率编码机制的抑制来设置小脑活动的全局水平

## 1、引言

小脑通过与大脑皮层的持续对话(Allen 和 Tsukahara, 1974 年; Schmammann 和 Pandya, 1997 年; Kelly 和 Strick, 2003 年; Glickstein 等人, 2011 年; Proville 等人, 2014 年)。小脑核通过将来自抑制性 Purkinje 细胞 (PC) 的输入与小脑的两个主要输入的苔藓和攀缘纤维侧枝的输入相结合, 产生小脑的最终输出 (Gauck 和 Jaeger, 2000; Rowland 和 Jaeger, 2005 年; Bengtsson 等人, 2011 年; Steuber 和 Jaeger, 2013 年; Bengtsson 和 Jorntell, 2014 年)(见图 1A)。CN 神经元似乎对来自 PC 的输入速率求和, 并将运动的某些部分编码为速率代码(Thach, 1968; Armstrong 和 Edgley, 1984; Brooks 和 Thach, 2011; Abbasi 等, 2017)或遵循时间同步 PC 放电 (Heck et al., 2007; De Zeeuw et al., 2008, 2011; Person and Raman, 2011, 2012; Sarnaik and Raman, 2018) 或停顿 (Shin and De Schutter, 2006; Steuber 等人, 2007 年; Hong 等人, 2016 年) 在延迟眨眼条件反射中观察到(McCormick 和 Thompson, 1984 年; Yeo 等人, 1997 年; Rasmussen 等人, 2015 年; Ten Brinke 等人, 2015 年, 2017)。事实上, 破坏 PC 或 CN 神经元放电的时间模式会强烈影响运动协调并导致共济失调 (Hoebeek 等人, 2005; Walter 和 Khodakhah, 2006; Walter 等人, 2006; Chen 等人, 2010; White 等人) 等人, 2014 年; White 和 Sillitoe, 2017 年)。然而, 基于速率或时间编码策略是否与特定任务或 CN 神经元亚型的特定生理特性相关尚未确定, 因为 CN 中细胞类型之间的区别仍然很困难。

CN 神经元被细分为 6 个亚组, 其中 5 个存在于内侧核中: 谷氨酸能、GABA 能核橄榄核和甘氨酸能投射神经元, 以及局部 GABA 能和/或甘氨酸能细胞 (Czubayko 等, 2001; Uusisaari 等, 2007; Alvina et al., 2008; Uusisaari and Knöpfel, 2008, 2011; Bagnall et al., 2009; Tadayonnejad et al., 2010; Zheng and Raman, 2010; Blenkinsop and Lang, 2011; Bengtsson and Jorntell, 2014 年; Husson 等人, 2014 年; Ankri 等人, 2015 年; Najac 和 Raman, 2015 年; Canto 等人, 2016 年; Yarden-Rabinowitz 和 Yarom, 2017 年)。已经使用细胞内记录描述了至少 4 种不同 CN 神经元亚型的特定内在生物物理特性 (例如, 尖峰宽度、后

超极化形状和持续时间、放电率) (Uusisaari 等, 2007; Uusisaari 和 Knöpfel, 2008、2011; Bagnall 等人, 2009; Ankri 等人, 2015; Najac 和 Raman, 2015; Canto 等人, 2016; Yarden-Rabinowitz 和 Yarom, 2017)。然而, 在最近对清醒动物的体内研究中 (Bengtsson 等人, 2011; Bengtsson 和 Jönntell, 2014; Brown 和 Raman, 2018; Sarnaik 和 Raman, 2018), 只能可靠地记录谷氨酸能投射神经元。这说明了使用细胞外记录区分神经元亚型的困难, 而不是大脑皮层, 其中 GABA 能神经元与谷氨酸能神经元通过其尖峰波形可靠地区分 (参见, 例如, Barthó 等人, 2004)。因此, 我们着手确定简单的标准, 使我们能够区分兴奋性 (谷氨酸能 [GLUT]) 投射神经元和抑制性 (GABAergic [GABA]) 中间神经元, 并描述这些细胞类型如何响应 PC 输入。

我们记录了麻醉和清醒动物的内侧核中的 CN 神经元, 它们分别在 CN 的 GLUT 或 GABA 细胞中表达 PCs (Chaumont 等人, 2013) 或 Chrimson 中的通道视紫红质 2 (ChR2)。我们发现 GLUT 与 GABA 神经元可以通过它们的平均尖峰波形来区分, 并且它们的放电率存在显著差异。虽然两组都受到 PC 输入的抑制, 但只有 GLUT 样神经元紧跟 PC 的同步尖峰。也就是说, 只有 GLUT 样神经元将 PC 抑制与尖峰放电结合起来, 这是时间锁定到 PC 群体输入的, 而 GABA 样细胞对 PC 高频放电的时间不敏感。总之, 我们的研究表明, 几种编码策略在 CN 神经元中被多路复用, 这取决于目标细胞类型, 允许同时控制放电率和时间放电。

## 2、材料和方法

动物。所有程序均符合国家和欧洲社区指南 (2010/63/EU)。动物实验事先得到了斯特拉斯堡大学当地法国伦理委员会的批准 (C.R.E.M.E.A.S.; CEEA35; 协议编号/参考协议: A67-2018-38)。将小鼠饲养和饲养在 12 小时的光照/黑暗循环中, 自由获取食物和水。我们使用了 13 只 L7-ChR2(H134R)-YFP CD1 雄性小鼠 (Chaumont et al., 2013) 或成年 C57BL/6 GAD2-IRES-Cre (n 6; stock #010802) 和 VGLUT2-IRES-Cre (n 4; 股票#016963) 小鼠 (杰克逊实验室; RRID:SCR\_004633)。

病毒注射。使用 AAV 2/1-GFP (PENN Vec-tor Core; RRID: SCR\_010038) 或 DiI (亲脂性阳离子吡啶羧基 - 九染料; Thermo Fisher Scientific) 从小脑蚓部的小叶 IV 和 V 追踪 PC 连接到内侧 CN。通过腹膜内注射氯胺酮 (100 mg/kg)、medeto-midine (1 mg/kg) 和乙酰丙嗪 (3 mg/kg) 的混合物来麻醉小鼠, 并将其放置在立体定位框架上。将示踪剂装入配有手动注射活塞的刻度移液管 (Wiretrol II, Drummond Scientific)。通过施加温和的压力, 以大约 250 nl/min 的速度将 0.51 的最终体积输送到组织中。注射后将移液管留在原处至少 10 分

钟以进行扩散。2 周 (AAV2/1-GFP) 或 2-3 天 (DiI) 后, 通过经心脏灌注 4% 的 PFA 杀死注射的小鼠, 并制备小脑切片 (50  $\mu$ m) 用于后续分析。在小脑切片的连续切片上进行连续共聚焦采集 (Leica Microsystems, SP5)。使用 ImageJ (美国国立卫生研究院) 插件“简单神经突示踪剂” (RRID: SCR\_016566) 单独追踪一些浦肯野细胞, 并获得小脑皮层和内侧 CN 连接区域的立体定位坐标。

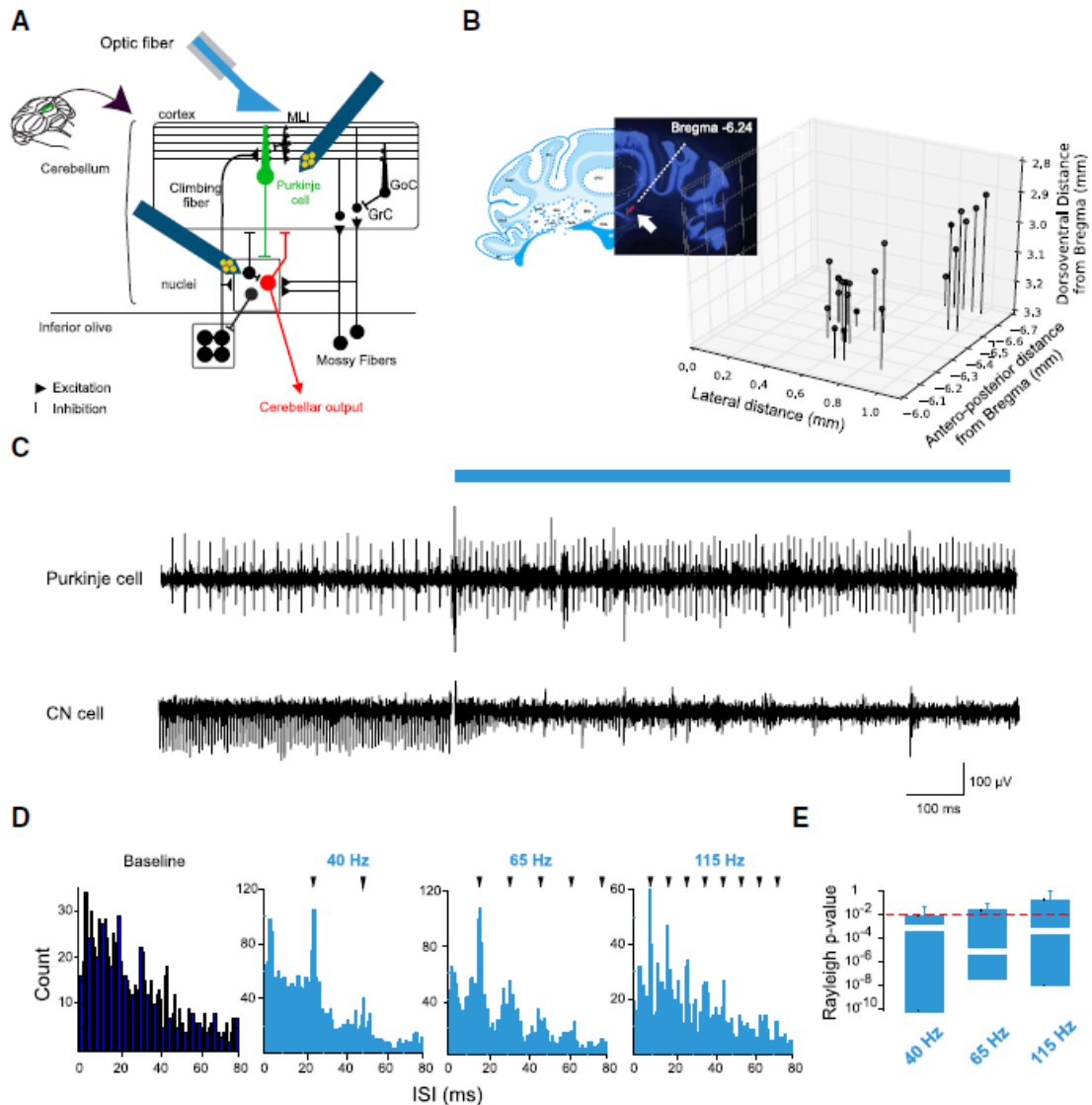


图 1。PCs 的光遗传学刺激抑制内侧核中的 CN 神经元。A, 橄榄小脑网络图和实验协议四极记录。记录 (深蓝色) 同时在 PC 层和内侧核中进行, 而光纤 (浅蓝色) 位于小脑皮层上方。MLI, 分子中间神经元; GoC, 高尔基细胞; GrC, 颗粒细胞。B, Tetrode 位置在实验后重建。左图, DAPI 染色的小脑切片中由 DiI 荧光 (红色) 监测的 Tetrode 轨迹。右图, 记录点坐标的 3D 散点图。C, PC 层和内侧 CN 中的多单元记录示例。D, 40、65 和 115 Hz 光刺激下 PC 放电的刺激间尖峰直方图 (ISI) 示例。E, 从 40、65 和 115 Hz 刺激开始的尖峰潜伏期直方图计算的瑞利测试中每个细胞的 p 值箱线图。p 0.01 表示分布不均匀 (红色虚线)。白线表示中位数。方框限制表示第一 (Q1) 和第三 (Q3) 四分位数。晶须代表距离盒子边缘的 1.5 x (Q3-Q1)。

对于 GAD2-cre 和 VGLUT2-cre 小鼠颅内注射，术中吸入 4%异氟醚诱导麻醉，术中维持 2.5%。动物被固定在立体定位框架上。监测直肠温度并保持在 36°C - 37.5°C。在顶核 (AP 2.6 mm, ML 0.8 mm, DL 2.4 mm, 距  $\lambda$ ) 的坐标处应用小颅骨切开术(直径 1.5 mm),除了中间核中记录的 1 个细胞(AP 2.4 mm, ML 2.1 毫米, DL 2.3 毫米 (来自  $\lambda$ ))。将含有 AAV9-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdTomato (UNC 矢量核心; RRID: SCR\_002448) 的毛细管 (尖端直径 80  $\mu$ m) 垂直插入开颅手术中,将 60  $\mu$ l 体积的病毒缓慢注入 CN。毛细管在注射后至少保留 10 分钟以进行扩散。术后注射丁丙诺平 (4 mg/kg, i.p.)。实验前让动物至少恢复 4 周。

麻醉动物的光遗传学刺激 (L7-ChR2(H134R)-YFP)。使用多模光纤 (直径 100  $\mu$ m) 进行光刺激,该光纤通过手动显微操作器定位在小脑皮层表面上方,并安装有 460 nm 波长的蓝色 LED (UHP-T-LED 460, Prizmatix)。光强度设置为 25 mW/mm<sup>2</sup> 以避免 PC 中的去极化阻滞 (Chaumont et al., 2013)。每集 (10 秒持续时间,包括 7 次刺激)由一系列脉冲 (5 毫秒脉冲持续时间)组成,要么以 40、65 和 115 Hz 的频率定期发送,要么以 40 Hz 的不规则发送 (遵循泊松分布)。对于每个刺激频率,对每个记录的细胞进行至少 10 次试验。使用单板计算机 (Raspberry Pi) 执行照明协议。

清醒动物的光遗传学刺激 (GAD2-IRES-Cre 和 VGLUT2-IRES-Cre)。对于 GABA 和 GLUT 神经元光标记,在 CN 上方的小脑皮质中通过手术将 2 mm 长的光纤 ( $\varnothing$  105  $\mu$ m, ThorLabs) 植入动物。由 DC2100 控制器 (M595F2, ThorLabs) 驱动的 595 nm 波长 LED 连接到光纤。每次刺激 (2 秒持续时间)由一系列脉冲 (5 毫秒脉冲持续时间)组成,频率为 100 赫兹,持续 125 毫秒,每 5-10 秒重复至少 10 次。我们只包括对光遗传学刺激有短延迟 (20 ms) 反应的神经元 (Klapoetke et al., 2014; Mardinly et al., 2018)。光遗传学刺激的潜伏期被定义为第一个时期超过基线发射率 SD 的 3 倍。发射率变化的评估基于周刺激时间直方图 (由至少 10 次试验构建)。

麻醉 L7-ChR2(H134R)-YFP 小鼠的四极管记录。在聚氨酯 (1.9 g/kg i.p.) 下深度麻醉小鼠。进行气管切开术以促进呼吸。将小鼠置于立体定向框架 (Narashige) 中。使用加热毯 (CWE, TC-1000) 维持体温并通过直肠探针监测。然后进行开颅手术以发现小脑皮质的背侧蚓部和旁侧。切开硬脑膜后,用盐水溶液 (NaCl 9 g/L) 不断润湿组织。使用带有机械手 (Luigs and Neuman, SM5) 的定制设计的硅探针 (2 16 通道, Atlas Neuroengineering) 记录 PC 和 CN 细胞。每个探头 (四极管) 由 4 个柄 (柄之间 150  $\mu$ m) 组成,带有 4 个圆形氧化铱记录位点 (直径 15  $\mu$ m),间隔 20  $\mu$ m,呈菱形。一个探针被降低到蚓部的小叶 IV 和 V 以记录 PC。

第二个是通过副虫中的小叶 VI 降低以记录 CN 神经元。两个探针都使用电动显微操作器 (Luigs 和 Neumann) 定位。使用便携式 32 通道采集放大器 (ME32-FAI-PA, MultiChannel Systems) 以 20 kHz 采样率和 5 kHz 低通滤波进行数据采集。探针涂有 DiI, 用于记录位点的事后重建。

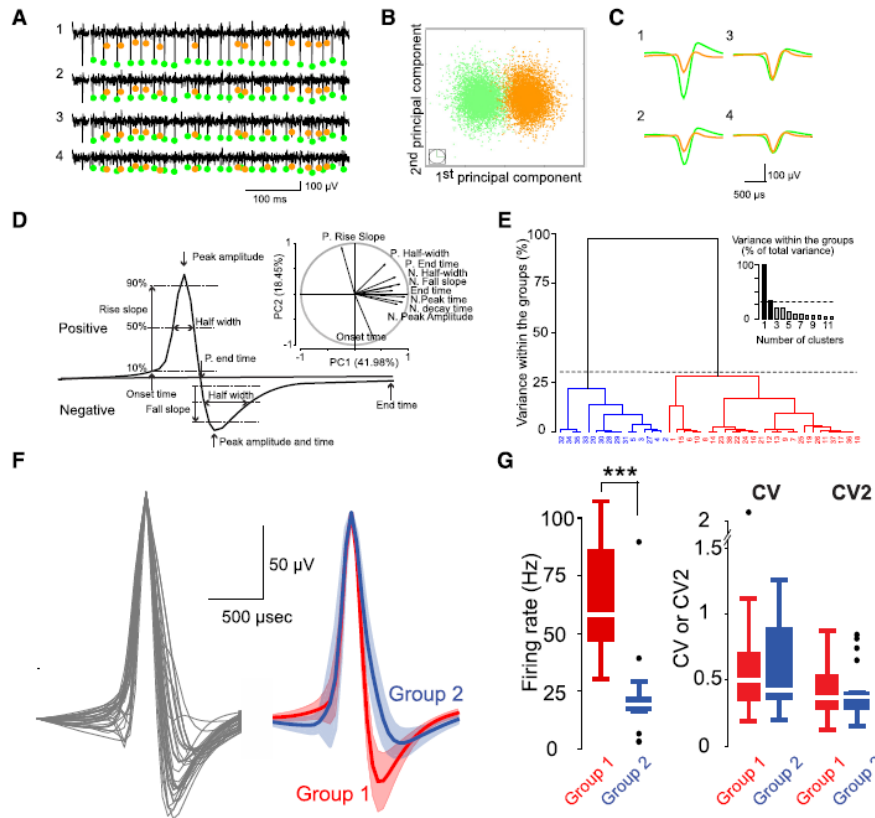


图 2. Tetrode 记录识别出两组不同的 CN 神经元。A, 单位隔离示例: 单个四极管的 4 个记录位点上的原始信号。橙色和蓝色点表示来自 PCA (材料和方法) 分离的 2 个单元的尖峰。B, 2 个单元的尖峰对前 2 个主成分的投影。C, 4 个记录点上 2 个单元的平均尖峰波形。D, 使用 PCA 对所有记录单元的平均波形进行分类, 然后对主成分 (HPC) 进行层次聚类。PCA 测量参数的描述和前两个主成分的投影 (右上)。起始时间, 尖峰波形达到其正峰值的 5% 的时间点; P. 上升斜率, 正 10% - 90% 上升时间; P. 半峰宽, 50% 正峰处的尖峰持续时间; N. 峰值幅度, 负峰值; 负峰时间, 负峰时间; N. 下降坡度, 10% - 90% 下降时间; N. 半峰宽, 负峰 50% 处的尖峰持续时间; N. 衰减时间, 从负峰到负峰 10% 的尖峰持续时间; 结束时间, 在其负峰值的 5% 处的时间点。E, 升序分层树突出显示 2 组动作电位波形。F, 归一化到最大幅度的所有单元的叠加平均尖峰波形 (左); 确定的 2 组 (第 1 组, 红色, n 22; 第 2 组, 蓝色, n 17) (右) 的平均尖峰波形的平均值。阴影区域代表 SD。G, 两组的放电率、CV 和 CV2 箱线图。Wilcoxon 秩检验, 触发率: \*\*\*p 1.4 10<sup>-7</sup>; CV: p 0.37; CV2: p 0.36。

清醒 GAD2-IRES-Cre 和 VGLUT2-IRES-Cre 小鼠的近细胞和多通道记录。应用垂直皮肤切割以暴露颅骨。头骨用 Optibond All-in-one (Kerr) 预处理, 并用 Charisma (Heraeus Kulzer) 将 5.5 4.0 mm 定制基座连接到头骨上。允许小鼠在手术后和记录前至少恢复 2 周。在进行电生理学实验之前, 在记录目标上的颅骨

上进行了小开颅术（2.0 毫米）。小鼠头部固定但允许在圆柱跑步机上移动。用玻璃毛细管（A2 mm，尖端 2 m，填充 2 M 盐水；n 15 个细胞）电极记录 GABA 和 GLUT 细胞，如前所述（Ten Brinke 等人，2017）或使用 64 通道硅探针（ASSY 77H-H2，Cambridge NeuroTech；n 2 个细胞）。电极由机械手（Luigs and Neuman, SM7）驱动，并以与垂直轴成 35° 的角度穿透小脑核。对于玻璃毛细管记录，神经元电生理信号被放大（Axon Instruments CNS，MultiClamp 700B，AutoMate Scientific US）并使用 Axon Instruments Digidata 采集系统在 20 kHz 下进行数字化。对于硅探针记录，使用 Intan 评估系统（RHD2000，Intan Technology）在 20 kHz 下放大和数字化信号。

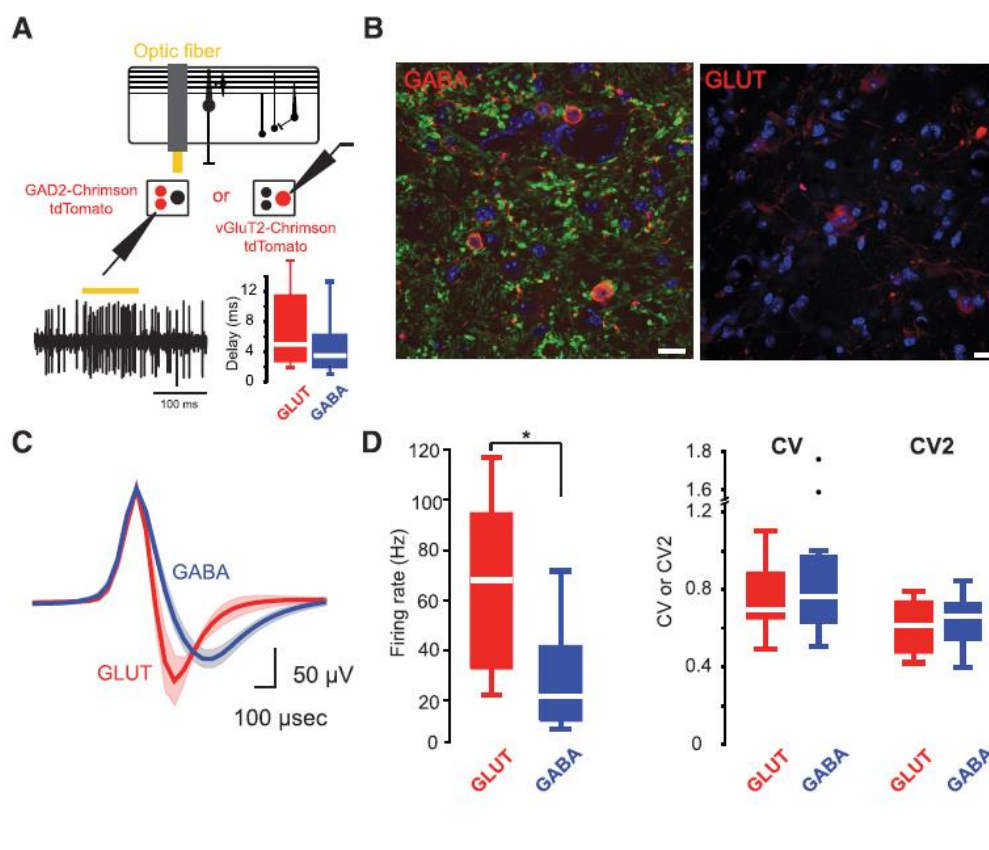


图 3. 在谷氨酸能或 GABA 能神经元中表达 Chrimson 的转基因小鼠的近细胞记录识别出相同的两组 CN 神经元。A，玻璃吸管记录的实验方案图。在注射 AAV9-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdTomato 后，分别在 VGLUT2-cre 或 GAD2-cre 小鼠中记录的神经元中的 Chrimson 激活可识别 GLUT 和 GABA 神经元。从光照开始的第一个峰值延迟的箱线图（右下）。B，GABA 和 GLUT 神经元识别。红色代表 Chrimson-tdTomato。绿色代表 Gad65/67\*。蓝色代表 DAPI。左图，GABA 能神经元可以被识别为具有 Chrimson-tdTomato 和 Gad65/67\* 表达的较小细胞。对，谷氨酸能神经元是 Chrimson-tdTomato。C，使用玻璃移液管近细胞记录记录的 GLUT 和 GABA 神经元的平均尖峰波形的平均值。请注意与使用四极管记录的波形的相似性。D，2 组的放电率、CV 和 CV2 箱线图：GLUT (n 6) 与 GABA (n 11)。Wilcoxon 秩检验发射率：\*p 0.012； CV：p 0.28； CV2：p 0.42。

数据分析。使用开源软件 OpenElectrophy (RRID:SCR\_000819) (Garcia and Fourcaud-Trocme', 2009) 进行尖峰排序。在尖峰分类之前, 如 Rowland 和 Jaeger (2008) 所述, 去除了刺激伪影。使用巴特沃斯滤波器对每个四极管的原始数据进行高通滤波 (200 Hz)。通过目视检查信号来确定手动阈值, 然后检测到跨越阈值的峰值。使用 scikit-learn 包 (Pedregosa 等人, 2011), 使用主成分分析 (PCA) 收集尖峰波形 (峰值周围 1 ms) 并在正峰值时间和幅度处归一化后进行分类。基于期望最大化算法 (Python scikit-learn 包), 使用高斯混合模型将尖峰波形分类为独立单元。单个单元总是通过目视检查来确认, 我们采取了保守的方法, 只保留了分离良好的集群。

基于从平均峰值提取的参数, 使用 PCA 对来自所有记录单元 (细胞) 的平均峰值波形进行分类, 然后在 R 统计软件 (R Core Team, 2015) 中对主要成分进行层次聚类 (Le' 等人, 2008) 波形 (见图 2D)。其他分析是使用 Python 编写的自定义例程进行的。瞬时放电率 (IFR) 计算为连续峰值之间的间隔的倒数。

免疫荧光。杀死动物并用 50 ml 盐水经心灌注, 然后用 100 ml 4% PFA/0.01 M PBS, pH 7.4。然后, 立即取出大脑并在室温下固定。固定的大脑在 4° C 下在 10% 蔗糖中脱水过夜, 然后嵌入 10% 蔗糖/12% 明胶中, 并在 30% 蔗糖溶液中进一步脱水。接下来, 用切片机 (Leica Microsystems, CM1950) 切割横截面 (40  $\mu$ m)。将切片与兔抗 Gad65/67\* (1:1000, Millipore AB1511; RRID: AB\_90715) 一起孵育 24 小时。接下来, 切片在 5% 正常驴血清 - 0.4% Triton X-100 - 0.01 M PBS 和 A488 偶联驴抗兔 IgG (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 批次 #711-545-152) 中孵育 12 小时)。所有孵育均在 4° C 下进行, 持续温和搅拌, 然后在 PBS 中洗涤 3 次 10 分钟。最终, 切片用 DAPI 染色并用 VECTASHIELD 封固培养基 (Vector Laboratories, 批次 #H-1000) 封固。

统计分析。通过使用 Rayleigh 测试 (使用 Scipy Python 包) 检测周期性脉冲序列期间连续刺激之间的间隔中尖峰的不均匀分布来评估尖峰时间锁定 (Millman 和 Aivazis, 2011; 另见 Najac 和 Raman, 2015)。对 IFR 分布的 Kolmogorov-Smirnov 检验 (见图 6) 使用 5 Hz 的 bin 进行。结果中描述了组间的统计检验。

## 3、结果

### 3.1 小叶 IV-V 中 PC 的光遗传学激发抑制内侧核中的 CN 神经元

使用其中 ChR2 在 PC 中特异性表达的小鼠 L7-ChR2(H134R)-YFP 品系, 我们记录了内侧核中麻醉小鼠的 CN 神经元的活动, 同时光学刺激了小叶 IV 和 V 中的 PC。在没有完整立体图集的 CD1 小鼠的内侧 CN 中探针定位, 使



用 AAV1/2-GFP 或 DiI 注射 (N2 动物) 追踪 PC 束。我们确定, 在 CD1 小鼠中, 可以通过在小叶 IV 和 V 后 600  $\mu$ m 处以 2.8-3.3 mm 深度插入硅探针来靶向尾背内侧核 (图 1B, 底部; n25 个记录位点, N13 只动物)。通过同时记录 PC 和 CN 神经元中的多单元活动, 对电极定位和蓝光功率进行生理评估 (图 1C)。

使用照明区域 PC 层中的多单元记录, 在一组 PC (n10) 中评估光诱导 (40、65 和 115 Hz 的 5 ms 脉冲) PC 放电 (图 1D, E; 见材料和方法)。未观察到去极化阻滞, 平均放电率与基线相比增加 (平均 SD, 基线: 46.5 33.8 Hz; 40 Hz: 65.6 40.1 Hz; 65 Hz: 65.2 36.9 Hz; 115 Hz: 57.1 34.3 Hz)。尽管单个 PC 没有遵循最高频率的刺激, 但通过构建峰值间隔 (ISI) 直方图 (图 1D) 和 2 个光脉冲之间的尖峰时间直方图, 我们观察到 10 个 PC 中有 8 个是时间-锁定 (即同步) 到高频 PC 照明 (图 1E)。因此, 考虑到照明会激活数十个 PC (参见 Chaumont 等人, 2013 年), 我们估计 PC 群体可以在所有测试频率下跟随照明。然后我们使用四极记录并根据它们在尾背内侧核中的平均尖峰波形分离出 39 个单独的细胞 (N13 只动物; 图 2A-C)。

### 3.2 区分 GLUT 与 GABA 神经元

为了对 CN 细胞进行分类, 对平均尖峰波形的参数进行 PCA (图 2D, E), 然后基于前两个主要成分进行层次聚类 (参见材料和方法)。层次聚类确定了两组平均波形 (第 1 组: 22 个细胞; 第 2 组: 17 个细胞; N13 只动物)。两组可以通过尖峰波形的衰减阶段来区分 (例如, 负半宽; 图 2D, F; 表 1), 其中第 1 组的动作电位比第 2 组神经元更快 (动作电位宽度组 1: 0.47 0.08 毫秒与第 2 组: 0.65 0.11 毫秒)。接下来, 我们分别分析了属于这两组的单个细胞的峰值统计数据, 发现第 1 组和第 2 组细胞的放电率显著不同 (图 2G; 平均第 1 组: 63.9 23.3 Hz; 平均第 2 组: 23.2 19.4 Hz; Wilcoxon 秩检验,  $p=1.4 \times 10^{-7}$ ), 而两组的尖峰序列规律相似 (平均 CV 第 1 组: 0.58 0.42 与第 2 组: 0.59 0.35; Wilcoxon 秩检验,  $p=0.37$ ; 平均 CV2 第 1 组: 0.43 0.22 对比第 2 组: 0.42 0.24; Wilcoxon 秩检验,  $p=0.36$ )。在同一个四极上只记录了属于不同组的 3 对细胞, 并且在这些对的细胞之间没有观察到成对的尖峰相关性。

在清醒动物的另一系列实验中, 我们评估了细胞的 GLUT 与 GABA 身份是否可以解释两组中的这种分离。通过分别在 VGLUT2-cre 和 GAD2-cre 小鼠的 CN 中注射 AAV9-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdTomato 病毒, 获得 Chrimson 在 GLUT 或 GABA CN 神经元中的特异性表达 (图 3)。CN 神经元在清醒动物中进行细胞外记录和光学标记 (参见材料和方法)。光标记 (GLUT 与 GABA)

通过蓝光照射下发射率的瞬时增加得到证实(光开始 GLUT 后的平均 SD 延迟: 6.8 5.3 ms, n 6; GABA: 5 4.2 ms, n 11; 图 3A)。我们确定了 GLUT 和 GABA 神经元的平均尖峰波形, 并测量了 PCA 在先前使用四极管记录的数据集中识别的 5 个最相关参数(图 3C; 表 1; n 15)。GLUT 和 GABA 神经元通过相同的一组动作电位波形参数来区分, 这些参数早先将使用四极管在麻醉动物中记录的神经元区分为两组(比较图 2F 和图 3C; 表 1)。此外, 我们证实 GLUT 细胞具有更高的放电率, 与第 1 组神经元(平均值: 66.6 39.7 Hz; n 6)相比, GABA 细胞(平均值: 29.1 23 Hz; n 11; 图 3D;  $p = 0.012$ , Wilcoxon 秩检验), 对应于第 2 组神经元。尖峰序列规律性没有观察到差异(图 3D; 平均 CV 0.76 0.22 vs 0.90 0.42; Wilcoxon 秩检验,  $p 0.28$ ; 平均 CV2, 0.61 0.16 vs 0.64 0.15; Wilcoxon 秩检验,  $p 0.42$ )。这些结果表明, GLUT 和 GABA 神经元可以仅通过它们在清醒动物的细胞外记录中的尖峰波形来可靠地区分。由于这些原因, 我们将在麻醉的 L7-ChR2(H134R)-YFP 小鼠中记录的第 1 组神经元使用四极作为 GLUT 样神经元, 第 2 组神经元作为 GABA 样神经元。

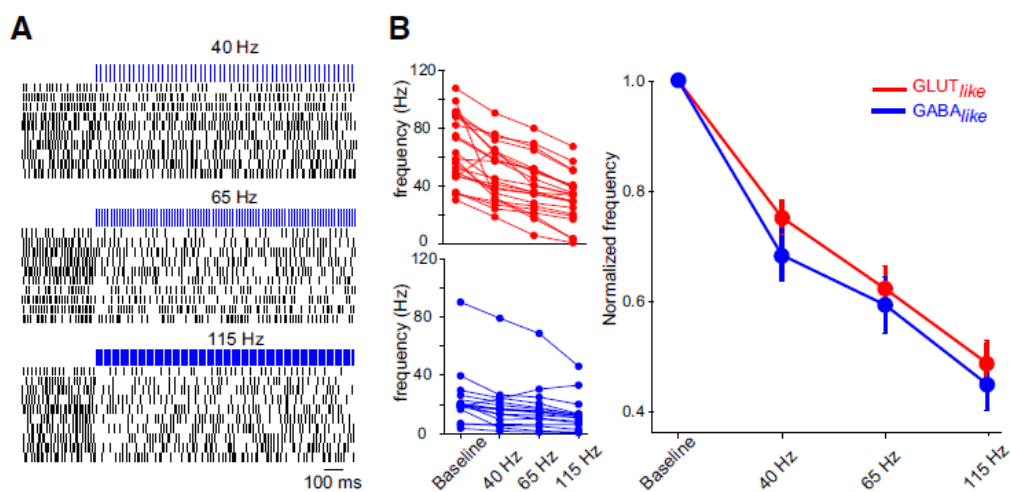


图 4. GLUT 样和 GABA 样神经元放电率同样受到 Purkinje 细胞的影响。A, 一个示例 GLUT 样细胞的光栅图在 40、65 和 115 的 PC 照明序列(5 ms 脉冲长度)下受到抑制赫兹。B, GLUT-like 和 GABA-like 逐渐被 PC 光照抑制。左, 照明期间单个单元的平均发射率。对, GLUT 样和 GABA 样神经元群的平均归一化放电率。误差线表示平均 SEM。

### 3.3 同步 PC 放电对 GLUT 样和 GABA 样神经元放电率的影响

在 L7-ChR2(H134R)-YFP 小鼠中, 我们将四极管记录与一组 PC 照明协议相结合: 40、65 和 115 Hz 的周期性脉冲序列(图 4A)。大多数 CN 神经元(39 个中的 37 个)被 PC 的同步激活抑制(图 4B)。抑制量不取决于 CN 细胞的基线放电率(GLUT 样:  $r 0.18$ , n 22,  $p 0.40$ ; GABA 样:  $r 0.06$ , n 17,  $p$

0.83 )。当刺激频率增加 (以 40、65 和 115 Hz 训练) 时, 对于 GLUT 样和 GABA 样细胞, CN 神经元的平均放电率单调下降 (图 4B)。这些结果表明, 虽然单个 PC 不严格遵循高频 (115 Hz, 见上文) 的光遗传学刺激, 但 PC 群体在所有测试频率下控制类似的 GLUT 样和 GABA 样神经元放电率。

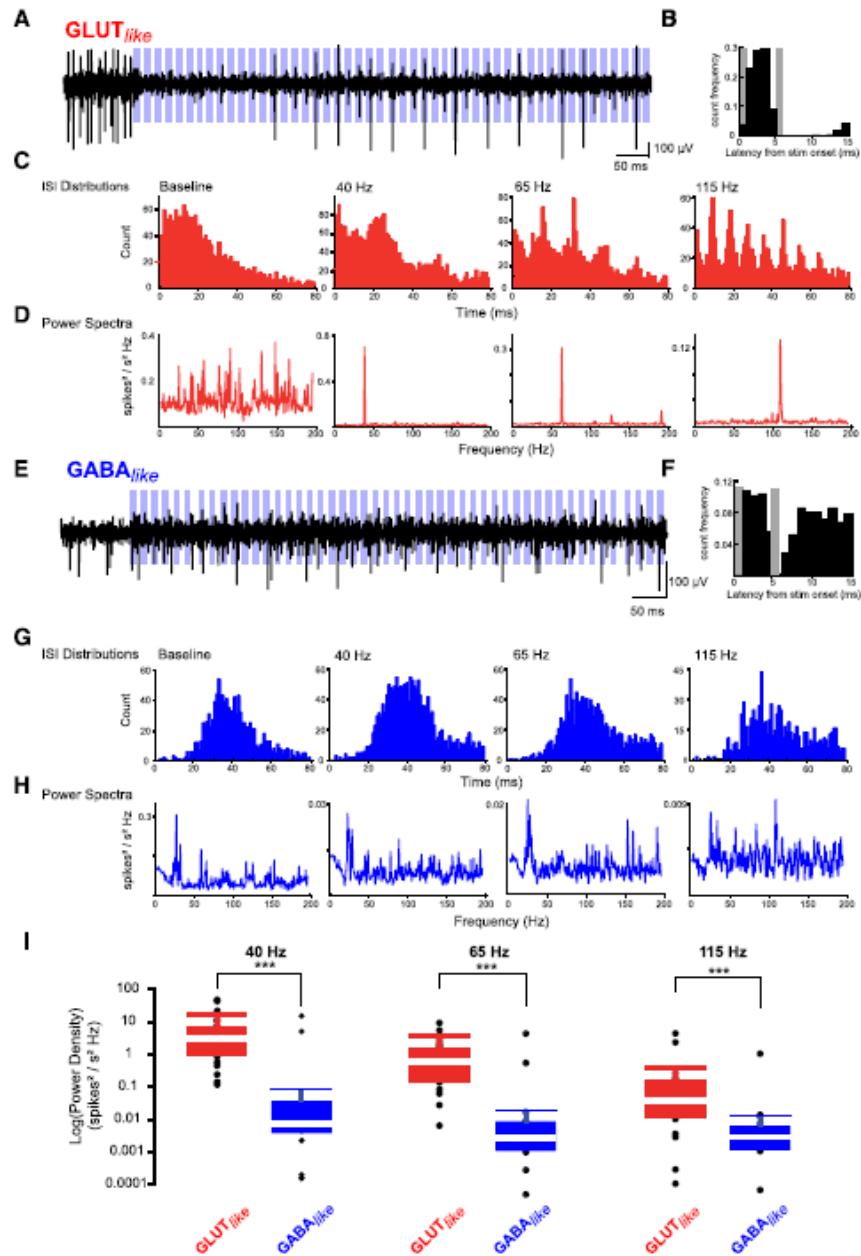


图 5. GLUT 样和 GABA 样神经元的差分时间编码。在 40、65 和 115 Hz 的 PC 照明列车期间核神经元放电。A-D, GLUT 样神经元示例。A, 在 65 Hz 的照明 (蓝色条) 期间来自 GLUT 样单元的原型轨迹。B, 刺激开始后尖峰潜伏期的直方图。灰色条表示减去的刺激伪影的位置。C, 40、65 和 115 Hz 的 ISI 直方图。D, 相同频率下单位自相关图的功率谱。E-H, 对类似 GABA 的神经元进行相同的分析。I, 40、65 和 115 Hz 时 GLUT 样和 GABA 样神经元的平均功率密度箱线图。白线表示中位数。方框限制表示第一 (Q1) 和第三 (Q3) 四分位数。晶须代表第 10 个和第 90 个百分位数。

Wilcoxon 秩检验: \*\*\*p 2.6 10<sup>-6</sup>, \*\*\*p 3.7 10<sup>-5</sup>, \*\*\*p 0.00076。

### 3.4 GLUT 样神经元由同步 PC 输入同步和夹带

我们观察到，一些 CN 细胞放电可以在刺激序列期间与 PC 输入时间锁定，而另一些在刺激期间随机放电，尽管速率较低（参见图 5A-D 与图 5E-H 中的两个示例细胞）。实际上，在照明期间估计的 ISI 直方图在照明频率处显示出峰值（图 5C）。然后，我们通过在刺激脉冲序列期间构建 2 次照明之间的尖峰时间直方图来计算尖峰时间锁定（图 5B, F）。直方图均匀性的瑞利检验表明，GLUT 样神经元中的尖峰与 PC 照明是时间锁定的（即同步）（ $p=0.01$ ，表明 22 个细胞中有 22 个在 40 Hz 时分布不均匀，22 个细胞中有 19 个在 65 Hz 时分布不均匀 Hz 和 115 Hz 时 22 个单元中的 17 个）。相比之下，大多数 GABA 样神经元在整个刺激间隔内都以均匀的概率尖峰，表明这些神经元与 40 Hz 的 PC 尖峰输入不同步（40Hz 时 17 个中的 13 个，65Hz 时 17 个中的 10 个，17 个中的 14 个 115 赫兹）。为了进一步量化照明序列期间的尖峰活动，我们计算了每个细胞的自相关图（受限于照明时间）的功率谱（图 5D, H）。CN 神经元的尖峰活动光谱显示，GLUT 样神经元输出遵循主要的输入频率（图 5D, I），因为它们被同步 PC 活动夹带。相比之下，GABA 样神经元的光谱与输入频率无关（图 5H），表明 GABA 样神经元没有被 PC 神经元夹带，至少在我们实验中使用的三个不同频率下没有（比较图 5D, H）。与此一致，GLUT 样神经元在刺激频率下的功率谱密度值明显大于 GABA 样神经元（图 5I; 40、65 和 115 Hz;  $p 2.6 \times 10^{-6}$ ,  $p 3.7 \times 10^{-5}$  和  $p 0.00076$ , Wilcoxon 秩检验）。

因为固定频率的刺激在生理上不太可能，我们还以不规则的方式照亮 PC（根据平均频率为 40 Hz 的均匀泊松过程绘制的照明时间）。由于不规则的照明，PCs 放电的瞬时速率从 5 到 210 Hz 不等（图 6A）。图 6B 显示了照明和基线期间 GLUT 样和 GABA 样神经元的两个示例的 IFR 分布。为了测试 CN 神经元是否也被 PC 的不规则活动所夹带，我们比较了（使用 Kolmogorov-Smirnov 检验）CN 神经元在刺激期间的 IFR 分布和 PC 的瞬时照明率的分布。如果 CN 细胞会被 PC 夹带，那么我们应该期望这两个分布在统计上是相似的。在 22 个 GLUT 样神经元中的 14 个中，在照明期间的 IFR 直方图和瞬时刺激频率的直方图之间没有观察到差异（ $p = 0.05$ ），而在剩余的 8 个细胞中， $p$  为 0.05（图 6B），C）。这表明大多数 GLUT 样细胞 (63%) 在刺激期间跟随 PC 放电（图 6C）。相反，在 17 个 GABA 样神经元中的 15 个中，光照期间的 IFR 直方图与瞬时刺激频率的直方图显着不同（ $p=0.05$ ；对于 2 个 GABA 样神经元， $p=0.05$ ；图 6C），表明大多数这些神经元中的一个在刺激期间没有遵循时间 PC 放电模式。总之，我们的研究结果表明，大多数 GLUT 样神经元能

够以时间上精确的方式跟随 PC 放电（固定频率：40 Hz 时为 100%，65 Hz 时为 86%，115 Hz 时为 77%；63%在不规则刺激期间）。

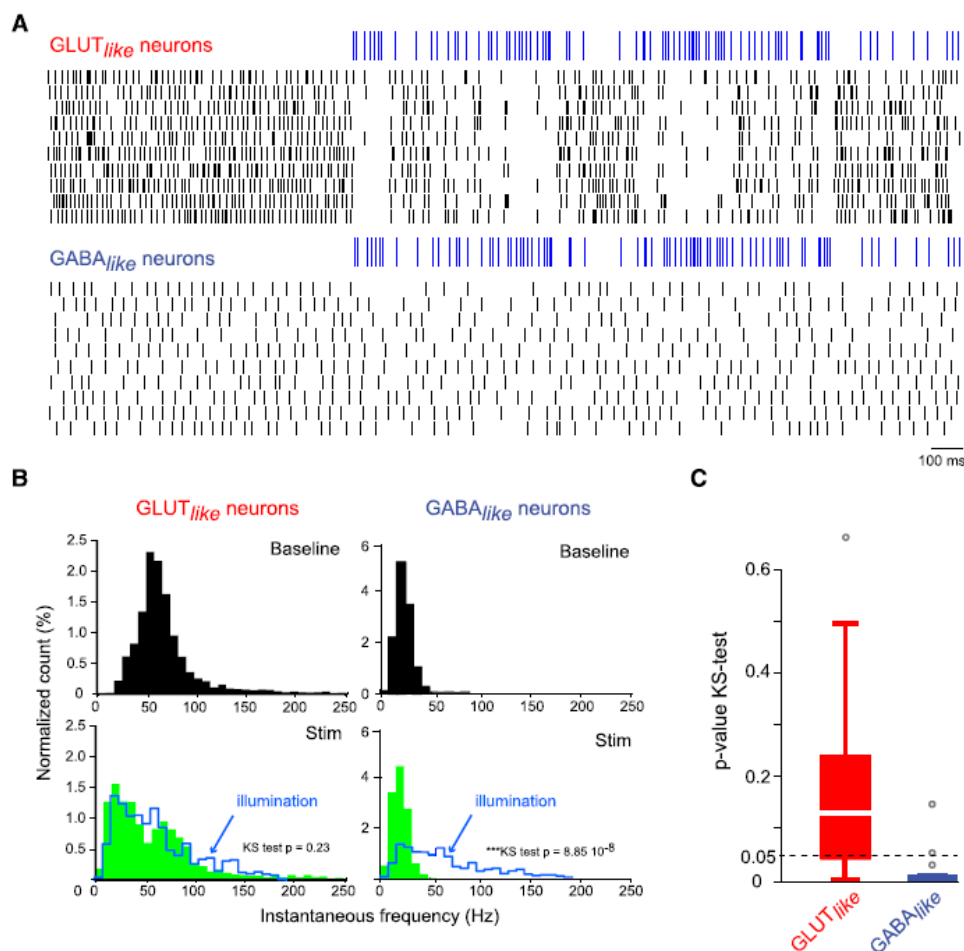


图 6. GLUT 样神经元可以遵循广泛的频率。A，一个 GLUT 样神经元和一个 GABA 样神经元在一系列不规则 PC 照明（5 ms 脉冲长度；照明时间根据平均 40Hz 的均匀泊松过程绘制）的光栅图示例。B，GLUT 样神经元（左）和 GABA 样神经元（右）在基线期间的归一化 IFR 直方图（顶部，黑色）和在 PC 照明（底部，绿色）叠加到刺激的 IFR 直方图（蓝色城市景观）的过程中。注意 GLUT 样神经元的 IFR 直方图与刺激的 IFR 直方图的重叠。KS 检验 p，Kolmogorov-Smirnov 检验的 p 值。C，PC 刺激期间小脑神经元（对于 GLUT 样和 GABA 样神经元）的 IFR 直方图和刺激的 IFR 直方图之间 Kolmogorov-Smirnov 检验的 p 值箱线图。

## 4、讨论

使用麻醉和清醒小鼠 CN 神经元活动的体内细胞外记录，我们发现推定的 GLUT 和 GABA 神经元可以使用细胞外尖峰波形的简单特征进行区分，并对 PC 输入做出不同的反应。

### 4.1 CN 中 GLUT 与 GABA 神经元区分的证据

在我们的第一个系列实验中,在麻醉小鼠中使用四极管并且没有关于细胞类型身份的先验信息,我们采用了一种保守的方法,产生了一个包含 39 个已识别 CN 细胞的数据集,在单个四极管上只记录了几个多个细胞。这种困难可能是电极的空间组织与 CN 神经元密集排列的事实相结合的结果。硅探针的扁平柄不允许记录位点的 3D 定位,而石英电极具有四面体结构 (Gao et al., 2012),限制了这种 *te-trodes* 的识别能力。然而,PCA 和层次聚类分析使我们能够识别两个尖峰波形簇(第 1 组:窄动作电位宽度;第 2 组:更宽的动作电位),形成两个具有不同平均放电率的神经元群。在清醒动物的第二系列实验中,我们在 GLUT 和 GABA 神经元中专门表达了 Chrimson。并使用玻璃移液管和四极管,我们确定了与上述第 1 组和第 2 组细胞相同的特性:GLUT 神经元具有窄的尖峰宽度和较高的放电率,而 GABA 神经元具有较宽的尖峰宽度和较低的放电率。到新皮质,其中锥体 GLUT 细胞有更宽的尖峰,而 GABA 细胞有窄尖峰 (Bartho<sup>l</sup> et al., 2004)。这些发现与体外细胞内记录一致 (Uusisaari 等, 2007)。在全细胞电流钳配置中, Uusisaari 等人。(2007) 发现与 GABA 能细胞相比,非 GABA 能大细胞(推测为谷氨酸能投射细胞)动作电位宽度较窄,放电率较高,动作电位宽度较大,放电率较低。尽管甘氨酸能投射细胞也有狭窄的尖峰和与谷氨酸能投射神经元相似的最大放电率 (Bagnall et al., 2009),但它们是在喙内侧核的腹侧发现的,而我们的记录主要位于尾部背侧细胞核的 *cas* (图 1B)。然而,鉴于较小的谷氨酸能神经元通常以低频激发 (Uusisaari 等, 2007),并且我们的 PCA 分析基于有限的数据集,我们不能排除使用四极管记录的一些细胞可能属于到其他类别的 CN 神经元。尽管如此,由于对麻醉和清醒动物中记录的两个不同数据集的独立分析根据生物物理参数(尖峰波形和放电率)确定了相似的组,因此假设大多数第 1 组 GLUT 样细胞是最节俭的是小脑的谷氨酸能投射神经元。然后我们注意到,在所有记录条件下,包括体外急性脑切片 (Uusisaari 和 Kno<sup>pfel</sup>, 2011),麻醉和清醒的动物,GABA 和 GLUT 神经元之间的生物物理分离(尖峰波形和平均放电率)相同已观察到。这表明这些特性必须是 CN 生理学的标志,因为它们是在不同的生理条件下观察到的。

非谷氨酸能细胞可分为 GABA 能核橄榄投射神经元、局部 GABA/甘氨酸能神经元和核皮层甘氨酸能神经元 (Uusisaari 和 Kno<sup>pfel</sup>, 2011)。甘氨酸核皮层细胞可能大部分是沉默的 (Ankri 等人, 2015 年),而核橄榄神经元最显著地分布在小脑核的腹外侧部分 (Fredette 和 Mugnaini, 1991 年; De Zeeuw 等人, 1997 年; Najac 和 Raman, 2015)。因此,尽管我们不能排除某些细胞可能属于其他类别的 CN 神经元,但我们假设大多数 GABA 样细胞属于局部 GABA 能神经元组,并证明它们在体内被 PC 输入可靠地抑制。

## 4.2 内侧核 CN 神经元的不同编码策略

CN 神经元整合来自苔藓和攀爬纤维的兴奋性输入，以及来自 PC 和局部中间神经元的抑制性输入。最近证明，兴奋性传入神经负责 CN 细胞中一半的动作电位 (Yarden-Rabinowitz 和 Yarom, 2017)；由于 CN 神经元是自发活跃的，另一半是内在引发的 (Thach, 1968 年; Aizenman 和 Linden, 1999 年; Raman 等人, 2000 年; Alvina 等人, 2009 年; Sangrey 和 Jaeger, 2010 年; Tadayonnejad 等人, 2010; 郑和拉曼, 2010; Boehme 等人, 2011; Engbers 等人, 2013)。尽管普遍认为存在对 CN 细胞的 PC 抑制控制 (Ito 等人, 1970; Ito, 1984; Gauck 和 Jaeger, 2000; Czubayko 等人, 2001; Telgkamp 和 Raman, 2002; Pe-droarena 和 Schwarz, 2003; Rowland 和 Jaeger, 2005; Blenkinsop 和 Lang, 2011; Person 和 Raman, 2011; Chaumont 等人, 2013)，这种抑制是否会逐渐降低 CN 神经元平均放电率 (速率代码) 的问题，界定神经元放电的时间窗口 (时间代码) 或两者都存在争议 (De Zeeuw et al., 2008, 2011)。CN 神经元可以跟随正在进行的运动运动学 (Thach, 1968, 1970a; Armstrong 和 Edgley, 1984; Rowland 和 Jaeger, 2005) 并且可以被同步 PCs 进行训练，正如显示 PC 和 CN 神经元相关放电的记录所表明的那样 (Thach, 1970a,b; Armstrong 和 Edgley, 1984; McDevitt 等人, 1987)。最近，一些研究还表明可以复用速率和时间编码策略 (Sudhakar 等人, 2015; Abbasi 等人, 2017; Brown 和 Raman, 2018)。我们的研究与之前的实验一致，表明大型 CN 神经元 (可能是谷氨酸投射细胞) 被同步 PC 夹带，而在高频下，GABA 能神经元基本上被抑制 (Person 和 Raman, 2011; Najac 和 Raman, 2015; 萨尔奈克和拉曼, 2018)。然而，在一些体内记录中，显示同步的 PC 会携带大型 CN 神经元而不影响其整体放电率 (Person 和 Raman, 2011; Sarnaik 和 Raman, 2018)，除非涉及攀爬纤维输入 (Hoebeek 等人, 2010; Bengtsson 等人, 2011 年; Tang 等人, 2016 年、2019 年)。这种对 CN 神经元放电率没有影响的原因可能是 PC 中 ChR2 电流的缓慢动力学，这将无法在高频下每次照明时引发尖峰，或者激活的 PC 数量减少。值得注意的是，在一项体外研究中，已经观察到随着恒定同步增加 PC 放电率的抑制作用 (Wu 和 Raman, 2017 年)。在我们的研究中，虽然单个 PC 的平均发射率不跟随高频照明 (即，在 115 Hz 时的平均发射率 57 Hz)，但在人口水平上，PC 在高达 115 Hz 的照明频率下被夹带 (图 1) 和 GLUT 样细胞都受到蓝光激活的抑制和夹带。这些结果表明，PC 可以在 115 Hz 下触发，但在高频振荡期间会跳过一些周期 (de Solages 等, 2008)，并且将来自 30 到 50 个 PC 的输入收敛到给定的 CN 神经元 (Person 和 Raman, 2011) 确保其以 115 Hz 的频率进行夹带。然而，正如 Person 和 Raman (2011) 所观察到的那样，在

115 Hz 时缺乏严格的 PC 夹带可能导致 PC 放电的松散同步，这可能促进 CN 神经元的伴随抑制（参见他们的 100 Hz 刺激图 2D）。最后，PC 对 CN 神经元放电率的影响与一些体内记录的明显差异（Person 和 Raman, 2011; Sarnaik 和 Raman, 2018）可能起源于不同的靶向核，内侧而不是插入的核。在内侧核中，PC 轴突在核的广泛区域中展开（Sugihara 等人, 2009），而不是在中间核中的 PC 投射（Sarnaik 和 Raman, 2018）。这种配置可能导致 PC 轴突上的动作电位传导时间出现几毫秒（2-3 ms）的抖动，这与 PC 中 ChR2 激活介导的松散同步一致（Chaumont 等, 2013）。如 Person 和 Raman (2011) 所示，这些抖动可能会使 PC 输入稍微不同步并导致 CN 神经元的轻度抑制（De Zeeuw et al., 2008）。虽然 PC 输入中的光诱导抖动不是生理性的，但当 PC 被激活的颗粒细胞簇激发时，它可能会模仿 PC 同步中的生理抖动（Heck 等人, 2007; Valera 等人, 2016）。由于 GLUT 样细胞逐渐被一群 PC 输入一起放电抑制和夹带（de Solages 等, 2008），我们得出结论，它们复用了种群率和时间码策略。相反，PC 输入会抑制局部 GABA 样细胞，但不会在高频下被夹带，这与 GABA 能核橄榄核细胞的体外记录一致（Najac 和 Raman, 2015）。随着 PC 频率的增加，局部 GABA 中间神经元可能会被完全抑制，释放 PC 输入携带的投射 GLUT 细胞上的局部抑制制动。CN 神经元之间的这些差异编码策略可能有利于与内侧核中运动控制的特定特征相关的小脑输出的时间精度。



## 参考文献

- [1] Abbasi S, Hudson AE, Maran SK, Cao Y, Abbasi A, Heck DH, Jaeger D (2017) Robust transmission of rate coding in the inhibitory Purkinje cell to cerebellar nuclei pathway in awake mice. *PLoS Comput Biol* 13:e1005578.
- [2] Aizenman CD, Linden DJ (1999) Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *J Neurophysiol* 82:1697–1709.
- [3] Allen GI, Tsukahara N (1974) Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol Rev* 54:957–1006.
- [4] Alviña K, Walter JT, Kohn A, Ellis-Davies G, Khodakhah K (2008) Questioning the role of rebound firing in the cerebellum. *Nat Neurosci* 11:1256–1258.
- [5] Alviña K, Ellis-Davies G, Khodakhah K (2009) T-type calcium channels mediate rebound firing in intact deep cerebellar neurons. *Neuroscience* 158:635–641.
- [6] Boehme R, Uebele VN, Renger JJ, Pedroarena C (2011) Rebound excitation triggered by synaptic inhibition in cerebellar nuclear neurons is suppressed by selective T-type calcium channel block. *J Neurophysiol* 106: 2653–2661.
- [7] Sharott A, Vinciati F, Nakamura KC, Magill PJ. A population of indirect pathway striatal projection neurons is selectively entrained to parkinsonian beta oscillations. *J Neurosci*. 2017. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0658-17.2017> PMID: 28847810
- [8] Hammond C, Bergman H, Brown P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends in Neurosciences*. 2007; 30(7):357–64. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.004> PMID: 17532060
- [9] Costa RM, Lin SC, Sotnikova T, Cyr M, Gainetdinov R, Caron M, et al. Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron*. 2006; 52(2):359–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.030> PMID: 17046697
- [10] Raz A, Vaadia E, Bergman H. Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20(22):8559–8571. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08559.2000> PMID: 11069964
- [11] Mallet N, Pogosyan A, Marton LF, Bolam JP, Brown P, Magill PJ. Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their relationship with subthalamic nucleus activity. *Journal of Neuroscience*. 2008; 28(52):14245–58. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4199-08.2008> PMID: 19109506

[12] Levy R, Hutchison WD, Lozano AM, Dostrovsky JO. Synchronized neuronal discharge in the basal ganglia of parkinsonian patients is limited to oscillatory activity. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22(7):2855–2861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02855.2002> PMID: 11923450

[13] Sharott A, Magill PJ, Bolam JP, Brown P. Directional analysis of coherent oscillatory field potentials in the cerebral cortex and basal ganglia of the rat. *J Physiol*. 2005; 562(3):951–963. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.073189> PMID: 15550466

[14] Sharott a, Gulberti a, Zittel S, Tudor Jones aa, Fickel U, Munchau a, et al. Activity Parameters of Sub-thalamic Nucleus Neurons Selectively Predict Motor Symptom Severity in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*. 2014; 34(18):6273–6285. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1803-13.2014> PMID: 24790198

[15] Soares J, Kliem MA, Betarbet R, Greenamyre JT, Yamamoto B, Wichmann T. Role of external pallidal segment in primate parkinsonism: Comparison of the effects of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydro-pyridine-Induced parkinsonism and lesions of the external pallidal segment. *Neurobiology of Disease*. 2004; 24(29):6417–6426.

[16] Brown P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Tonali P, Di Lazzaro V. Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2001; 21(3):1033–1038. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-03-01033.2001> PMID: 11157088

[17] Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of Neurophysiology*. 1994; 72(2):507–520. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.2.507> PMID: 7983515

[18] Tinkhauser G, Pogosyan A, Tan H, Herz DM, Kühn AA, Brown P. Beta burst dynamics in Parkinson's disease off and on dopaminergic medication. *Brain*. 2017; 140(11):2968–2981. <https://doi.org/10.1093/brain/awx252> PMID: 29053865

[19] Timmermann L, Wojtecki L, Gross J, Lehrke R, Voges J, Maarouf M, et al. Ten-hertz stimulation of sub-thalamic nucleus deteriorates motor symptoms in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2004; 19(11):1328–1333. <https://doi.org/10.1002/mds.20198> PMID: 15389990

[20] Roopun AK, Middleton SJ, Cunningham MO, LeBeau FEN, Bibbig A, Whittington MA, et al. A beta-frequency (20-30 Hz) oscillation in nonsynaptic networks of somatosensory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(42):15646–15650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607443103>

- [21] Yamawaki N, Stanford IM, Hall SD, Woodhall GL. Pharmacologically induced and stimulus evoked rhythmic neuronal oscillatory activity in the primary motor cortex in vitro. *Neuroscience*. 2008; 151(2):386–395. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.021> PMID: 18063484
- [22] Sharott A, Gulberti A, Hamel W, Ko`ppen JA, Mu`nchau A, Buhmann C, et al. Spatio-temporal dynamics of cortical drive to human subthalamic nucleus neurons in Parkinson’s disease. *Neurobiology of Dis-ease*. 2018; 112(November 2017):49–62. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.01.001> PMID: 29307661
- [23] McCarthy MM, Moore-Kochlacs C, Gu X, Boyden ES, Han X, Kopell N. Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson’s disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(28):11620–11625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107748108> PMID: 21697509
- [24] Corbit VL, Whalen TC, Zitelli KT, Crilly SY, Rubin JE, Gittis aH. Pallidostriatal projections promote a oscillations in a dopamine-depleted biophysical network model. *Journal of Neuroscience*. 2016; 36(20):5556–5571. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0339-16.2016> PMID: 27194335
- [25] Plenz D, Kital ST. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature*. 1999; 400(6745):677–682. <https://doi.org/10.1038/23281> PMID: 10458164
- [26] Terman D, Rubin JE, Yew AC, Wilson CJ. Activity patterns in a model for the subthalamopallidal net-work of the basal ganglia. *Journal of Neuroscience*. 2002; p. 2963–2976. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02963.2002> PMID: 11923461
- [27] Kumar A, Cardanobile S, Rotter S, Aertsen A. The role of inhibition in generating and controlling Parkin-son’s Disease Oscillations in the Basal Ganglia. *Front Syst Neurosci*. 2011; 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00086> PMID: 22028684
- [28] Rubin JE, McIntyre CC, Turner RS, Wichmann T. Basal ganglia activity patterns in parkinsonism and computational modeling of their downstream effects. *European Journal of Neuroscience*. 2012; 36(2):2213–2228. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08108.x> PMID: 22805066
- [29] Holgado AJN, Terry JR, Bogacz R. Conditions for the generation of beta oscillations in the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30(37):12340–12352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0817-10.2010> PMID: 20844130
- [30] Merrison-Hort R, Borisjuk R. The emergence of two anti-phase oscillatory neural populations in a computational model of the Parkinsonian globus pallidus. *Frontiers in*

computational neuroscience. 2013; 7(December):173. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00173>  
PMID: 24348374

[31] Pavlides A, Hogan SJ, Bogacz R. Computational Models Describing Possible Mechanisms for Generation of Excessive Beta Oscillations in Parkinson's Disease. *PLoS Computational Biology*. 2015; p. 1–29.

[32] Ahn S, Zuber SE, Worth RM, Rubchinsky LL. Synchronized beta-band oscillations in a model of the globus pallidus-subthalamic nucleus network under external input. *Frontiers in Computational Neuroscience*. 2016; 10(December):1–12.

[33] Mirzaei A, Kumar A, Leventhal D, Mallet N, Aertsen A, Berke J, et al. Sensorimotor processing in the basal ganglia leads to transient beta oscillations during behavior. *Journal of Neuroscience*. 2017; 37(46):11220–11232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1289-17.2017>  
PMID: 29038241

[34] Stein E, Bar-Gad I. Beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop during parkinsonism. *Experimental Neurology*. 2013; 245:52–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.07.023> PMID: 22921537

[35] Chen CC, Litvak V, Gilbertson T, Kühn A, Lu CS, Lee ST, et al. Excessive synchronization of basal ganglia neurons at 20A Hz slows movement in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2007; 205 (1):214–221. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.01.027>  
PMID: 17335810

[36] Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science (New York, NY)*. 2009; 324(5925):354–9. <https://doi.org/10.1126/science.1167093>

[37] Wilson HR, Cowan JD. Excitatory and inhibitory interactions in localized populations of model neurons. *Biophysical Journal*. 1972; 12(1):1–24. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(72\)86068-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(72)86068-5) PMID: 4332108

[38] Ledoux E, Brunel N. Dynamics of networks of excitatory and inhibitory neurons in response to time-dependent inputs. *Frontiers in Computational Neuroscience*. 2011; 5:25.  
<https://doi.org/10.3389/fncom.2011.00025> PMID: 21647353

[39] Leblois A, Boraud T, Meissner W, Bergman H, Hansel D. Competition between feedback loops underlies normal and pathological dynamics in the basal ganglia. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(13):3567–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5050-05.2006> PMID: 16571765

[40] Feingold J, Gibson DJ, DePasquale B, Graybiel AM. Bursts of beta oscillation differentiate postperformance activity in the striatum and motor cortex of monkeys performing

movement tasks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112(44):13687–13692. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517629112>

[41] Shin H, Law R, Tsutsui S, Moore CI, Jones SR. The rate of transient beta frequency events predicts behavior across tasks and species. *eLife*. 2017; 6:1–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.29086>

[42] van Ede F, Quinn AJ, Woolrich MW, Nobre AC. Neural oscillations: sustained rhythms or transient burst-events? *Trends in Neurosciences*. 2018; 41(7):415–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.04.004> PMID: 29739627

[43] Leventhal DK, Gage GJ, Schmidt R, Pettibone JR, Case AC, Berke JD. Basal ganglia beta oscillations accompany cue utilization. *Neuron*. 2012; 73(3):523–536. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.032> PMID: 22325204

[44] Lofredi R, Tan H, Neumann WJ, Yeh CH, Schneider GH, Kühn AA, et al. Beta bursts during continuous movements accompany the velocity decrement in Parkinson's disease patients. *Neurobiology of Disease*. 2019; 127:462–471. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.013> PMID: 30898668

[45] Torrecillos F, Tinkhauser G, Fischer P, Green AL, Aziz TZ, Foltynie T, et al. Modulation of beta bursts in the subthalamic nucleus predicts motor performance. *Journal of Neuroscience*. 2018; p. 1314–18.

[46] Cagnan H, Duff EP, Brown P. The relative phases of basal ganglia activities dynamically shape effective connectivity in Parkinson's disease. *Brain*. 2015. <https://doi.org/10.1093/brain/awv093> PMID: 25888552

[47] Wichmann T, Soares J. Neuronal firing before and after burst discharges in the monkey basal ganglia is predictably patterned in the normal state and altered in parkinsonism. *J Neurophysiol*. 2006; 95(4):2120–2133. <https://doi.org/10.1152/jn.01013.2005> PMID: 16371459

[48] Vila M, Périer C, Féger J, Yelnik J, Faucheux B, Ruberg M, et al. Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *European Journal of Neuroscience*. 2000; 12(1):337–344. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00901.x> PMID: 10651888

[49] Breit S, Bouali-Benazzou R, Popa RC, Gasser T, Benabid AL, Benazzou A. Effects of 6-hydroxydopamine-induced severe or partial lesion of the nigrostriatal pathway on the neuronal activity of pallido-subthalamic network in the rat. *Experimental Neurology*. 2007; 205(1):36–47. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.12.016> PMID: 17395181

- [50] Sahasranamam A, Vlachos I, Aertsen A, Kumar A. Dynamical state of the network determines the efficiency of single neuron properties in shaping the network activity. *Scientific Reports*. 2016; 6:26029. <https://doi.org/10.1038/srep26029> PMID: 27212008
- [51] Kunkel S, Morrison A, Weidel P, Eppler JM, Sinha A, Schenck W, et al. *NEST* 2.12.0; 2017.
- [52] Gutenkunst RN, Waterfall JJ, Casey FP, Brown KS, Myers CR, Sethna JP. Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models. *PLoS Computational Biology*. 2007; 3(10):1871–1878. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030189> PMID: 17922568
- [53] Bahuguna J, Tetzlaff T, Kumar A, Hellgren Kotaleski J, Morrison A. Homologous basal ganglia network models in physiological and Parkinsonian conditions. *Frontiers in Computational Neuroscience*. 2017; 11:79. <https://doi.org/10.3389/fncom.2017.00079> PMID: 28878643
- [54] Blanco S, Garay A, Coulombie D. Comparison of frequency bands using spectral entropy for epileptic seizure prediction. *ISRN Neurol*. 2013; 2013:287327. <https://doi.org/10.1155/2013/287327> PMID: 23781347
- [55] Alterations in brain connectivity underlying beta oscillations in Parkinsonism. *PLoS computational biology*. 2011; 7(8):e1002124. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002124> PMID: 21852943
- [56] Dejean C, Arbuthnott G, Wickens JR, le Moine C, Boraud T, Hyland BI. Power fluctuations in beta and gamma frequencies in rat globus pallidus: Association with specific phases of slow oscillations and differential modulation by dopamine D1 and D2 receptors. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31(16):6098–6107. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3311-09.2011> PMID: 21508235
- [57] West TO, Berthouze L, Halliday DM, Litvak V, Sharott A, Magill PJ, et al. Propagation of beta/gamma rhythms in the cortico-basal ganglia circuits of the parkinsonian rat. *Journal of Neurophysiology*. 2018; 119(5):1608–1628. <https://doi.org/10.1152/jn.00629.2017> PMID: 29357448
- [58] Delaville C, McCoy AJ, Gerber CM, Cruz AV, Walters JR. Subthalamic Nucleus Activity in the Awake Hemiparkinsonian Rat: Relationships with Motor and Cognitive Networks. *Journal of Neuroscience*. 2015; 35(17):6918–6930. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-15.2015> PMID: 25926466
- [59] Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput Sci Eng*. 2007; 9(3):90–95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- [60] Bello EP, Casas-Cordero R, Galiñanes GL, Casey E, Belluscio MA, Rodríguez V, et al. Inducible ablation of dopamine D2 receptors in adult mice impairs locomotion, motor skill

learning and leads to severe parkinsonism. *Molecular Psychiatry*. 2017; 22(4):595–604.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2016.105> PMID: 27431292

[61] Deffains M, Iskhakova L, Katabi S, Israel Z, Bergman H. Longer beta oscillatory episodes reliably identify pathological subthalamic activity in Parkinsonism. *Movement Disorders*. 2018; 00(00):1–10.

[62] Cagnan H, Mallet N, Moll CKE, Gulberti A, Holt AB, Westphal M, et al. Temporal evolution of beta bursts in the parkinsonian cortical and basal ganglia network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019; 116(32):16095–16104.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1819975116>

[63] Kita H, Kita T. Role of striatum in the pause and burst generation in the globus pallidus of 6-OHDA-treated rats. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2011; 5:42.  
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00042> PMID: 21713126

[64] Beurrier C, Congar P, Bioulac B, Hammond C. Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19(2):599–609.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00599.1999> PMID: 9880580

[65] Birdno MJ, Grill WM. Mechanisms of deep brain stimulation in movement disorders as revealed by changes in stimulus frequency. *Neurotherapeutics*. 2008; 5(1):14–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.10.067> PMID: 18164480

[66] Meissner W, Leblois A, Hansel D, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A, et al. Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain*. 2005; 128(Pt 10):2372–2382. <https://doi.org/10.1093/brain/awh616> PMID: 16123144

[67] Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL. Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23(5):1916–1923. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01916.2003> PMID: 12629196

[68] Zaghoul Ka, Weidemann CT, Lega BC, Jaggi JL, Baltuch GH, Kahana MJ. Neuronal activity in the human subthalamic nucleus encodes decision conflict during action selection. *Journal of Neuroscience*. 2012; 32(7):2453–60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5815-11.2012> PMID: 22396419

[69] Brittain JS, Watkins KE, Joundi Ra, Ray NJ, Holland P, Green AL, et al. A role for the subthalamic nucleus in response inhibition during conflict. *Journal of Neuroscience*. 2012; 32(39):13396–401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2259-12.2012> PMID: 23015430

[70] Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD. Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nature Neuroscience*. 2013; 16(8):1118–1124. <https://doi.org/10.1038/nn.3456> PMID: 23852117

[71] Ray NJ, Jenkinson N, Brittain J, Holland P, Joint C, Nandi D, et al. The role of the subthalamic nucleus in response inhibition: Evidence from deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Neuropsychologia*. 2009; 47(13):2828–2834. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.06.011> PMID: 19540864

[72] Herz DM, Tan H, Brittain JS, Fischer P, Cheeran B, Green AL, et al. Distinct mechanisms mediate speed-accuracy adjustments in cortico-subthalamic networks. *eLife*. 2017; 6:357–381. <https://doi.org/10.7554/eLife.21481>

[73] Frank MJ, Samanta J, Moustafa Aa, Sherman SJ. Hold your horses: impulsivity, deep brain stimulation, and medication in parkinsonism. *Science*. 2007; 318(5854):1309–12. <https://doi.org/10.1126/science.1146157> PMID: 17962524

[74] Zavala B, Zaghoul K, Brown P. The subthalamic nucleus, oscillations, and conflict. *Movement Disorders*. 2015; 30(3):328–338. <https://doi.org/10.1002/mds.26072> PMID: 25688872

[75] Gajendiran M, Cepeda C, Kha HT, Sison JD, Levine MS. Electrophysiological alterations in subthalamic neurons after unilateral dopamine depletion in the rat. *Journal of Neuroscience Research*. 2005; 80(2):203–210. <https://doi.org/10.1002/jnr.20455> PMID: 15765528

[76] Ammari R, Bioulac B, Garcia L, Hammond C. The Subthalamic Nucleus becomes a Generator of Bursts in the Dopamine-Depleted State. Its High Frequency Stimulation Dramatically Weakens Transmission to the Globus Pallidus. *Frontiers in systems neuroscience*. 2011; 5(June):43. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00043> PMID: 21716635

[77] Lobb C. Abnormal Bursting as a Pathophysiological Mechanism in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia*. 2014; 3(4):187–195. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2013.11.002> PMID: 24729952

[78] Kühn AA, Williams D, Kupsch A, Limousin P, Hariz M, Schneider GH, et al. Event-related beta desynchronization in human subthalamic nucleus correlates with motor performance. *Brain*. 2004; 127(Pt4):735–746. <https://doi.org/10.1093/brain/awh106> PMID: 14960502

[79] Tan H, Pogosyan A, Anzak A, Ashkan K, Bogdanovic M, Green AL, et al. Complementary roles of different oscillatory activities in the subthalamic nucleus in coding motor effort in Parkinsonism. *Exp Neurol*. 2013; 248:187–195. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.06.010> PMID: 23778147

[80] Courtemanche R, Fujii N, Graybiel AM. Synchronous, focally modulated beta-band oscillations characterize local field potential activity in the striatum of awake behaving monkeys.



Journal of Neuroscience. 2003; 23(37):11741–11752. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11741.2003> PMID: 14684876

[81] Androulidakis AG, Doyle LMF, Yarrow K, Litvak V, Gilbertson TP, Brown P. Anticipatory changes in beta synchrony in the human corticospinal system and associated improvements in task performance. *European Journal of Neuroscience*. 2007; 25(12):3758–3765. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05620.x> PMID: 17610595

[82] Park Choongseok, Worth Robert M R LL. Neural dynamics in Parkinsonian brain: The boundary between synchronized and nonsynchronized dynamics. *Physical Review E—Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2011; 23(1):1–7.

[83] Rubchinsky LL, Park C, Worth RM. Intermittent neural synchronization in Parkinson's disease. *Nonlinear Dynamics*. 2012; p. 329–346. <https://doi.org/10.1007/s11071-011-0223-z> PMID: 22582010

[84] Humphries MD, Wood R, Gurney K. Dopamine-modulated dynamic cell assemblies generated by the GABAergic striatal microcircuit. *Neural networks*. 2009; 22(8):1174–88. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2009.07.018> PMID: 19646846

[85] Ponzi A, Wickens J. Sequentially switching cell assemblies in random inhibitory networks of spiking neurons in the striatum. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30(17):5894–5911. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5540-09.2010> PMID: 20427650

[86] Barbera G, Liang B, Zhang L, Gerfen C, Culurciello E, Chen R, et al. Spatially compact neural clusters in the dorsal striatum encode locomotion relevant information. *Neuron*. 2016; 92(1):202–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.037> PMID: 27667003

[87] Klaus A, Martins GJ, Paixao VB, Zhou P, Paninski L, Costa RM. The spatiotemporal organization of the striatum encodes action space. *Neuron*. 2017; 95(5):1171–1180. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.015> PMID: 28858619

[88] Spreizer S, Angelhuber M, Bahuguna J, Aertsen A, Kumar A. Activity dynamics and signal representation in a striatal network model with distance-dependent connectivity. *Eneuro*. 2017; 4(4):ENEURO.0348–16.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0348-16.2017> PMID: 28840190

[89] Brown P. Oscillatory nature of human basal ganglia activity: Relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2003; 18(4):357–363. <https://doi.org/10.1002/mds.10358> PMID: 12671940

[90] Fischer P, Pogosyan A, Cheeran B, Green AL, Aziz TZ, Hyam J, et al. Subthalamic nucleus beta and gamma activity is modulated depending on the level of imagined grip force.

Experimental Neurology. 2017; 293:53–61. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.015>  
PMID: 28342747

[91] Humphries MD, Stewart RD, Gurney KN. A physiologically plausible model of action selection and oscillatory activity in the basal ganglia. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(50):12921–42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3486-06.2006> PMID: 17167083

[92] Priori A, Foffani G, Pesenti A, Tamma F, Bianchi AM, Pellegrini M, et al. Rhythm-specific pharmacological modulation of subthalamic activity in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2004; 189(2):369–379. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.06.001>  
PMID: 15380487

[93] Marceglia S, Foffani G, Bianchi AM, Baselli G, Tamma F, Egidio M, et al. Dopamine-dependent non-linear correlation between subthalamic rhythms in Parkinson's disease. *Journal of Physiology*. 2006; 571 (3):579–591. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.100271> PMID: 16410285