

## ОЦЕНКА ЕМКОСТИ ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ БУФЕРОВ В НЕРВНОЙ КЛЕТКЕ В СЛУЧАЕ ИХ ГЕТЕРОГЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Поступила 30.01.09

Значение отношения времени спада до половины амплитуды кальциевых транзиентов, измеренных с помощью кальцийчувствительных флуоресцентных красителей с низким и высоким сродством, может быть использовано для оценки буферной емкости цитозольных эндогенных кальциевых буферов ( $k_{\text{буф}}$ ); с этой целью сравниваются параметры, полученные в модели и натуральных экспериментах. Если же распределение эндогенных буферов отличается высокой гетерогенностью, отношение времени полуспада флуоресцентных транзиентов зависит не только от  $k_{\text{буф}}$ , но и от характера распределения кальциевых каналов. Наше моделирование показало, что, несмотря на значительное замедление флуоресцентных ответов при использовании кальциевого индикатора Oregon Green ВАРТА-1, значение  $k_{\text{буф}}$  в дендритных окончаниях гранулярных клеток мозжечка может достигать 300–500. Это может происходить в тех случаях, если эндогенный кальциевый буфер, обладающий большой емкостью, локализуется, согласно нашему предположению [1], в апикальных участках дендритных окончаний данных клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эндогенный буфер, кальциевый ток, гранулярные клетки мозжечка, модель, флуоресцентный кальциевый индикатор.

### ВВЕДЕНИЕ

Для оценки буферной емкости кальциевых эндогенных буферов в цитозоле клеток ( $k_{\text{буф}}$ ) часто используются два метода, предложенных Неером и Огестином [2]. Эти методы основаны на существовании прямой пропорциональной зависимости постоянной времени спада кальциевого транзиента и обратной – вызванного изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) от добавленной буферной емкости индикатора (красителя, обладающего свойствами экзогенного кальциевого буфера). Данные методы были использованы для определения  $k_{\text{буф}}$  в соме [3], дендритах [4, 5] и аксонных терминалях [6, 7] различных нейронов. Однако такой подход применим только в тех случаях, когда кальциевые транзиенты (изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) могут быть описаны при помощи однокомпарментной модели, а скорость удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля линейно зависит от  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Поэтому о свойствах эндогенных буферов иногда судят на основании результатов сравнения параметров кальциевых сиг-

налов, измеренных в натурном эксперименте, и аналогичных сигналов, полученных с использованием модели [8, 9]. В нашей предыдущей работе [1] мы показали, что взаимоднозначное соответствие между отношением времени спада до половины амплитуды (полуспада,  $t_{1/2}$ ) моделируемых транзиентов концентраций индикаторов, связанных с  $\text{Ca}^{2+}$  и обладающих разным сродством к указанным ионам, и тем значением  $k_{\text{буф}}$ , которое позволяет воспроизвести измеренные в эксперименте флуоресцентные транзиенты, может быть получено при условии однородного распределения в клетке фиксированного буфера. В данном сообщении мы рассмотрим, как оценка  $k_{\text{буф}}$  зависит от гетерогенного распределения эндогенных кальциевых буферов; эта зависимость анализируется на основе результатов, полученных с использованием мультикомпарментной модели нейрона [1].

### МЕТОДИКА

Мультикомпарментная модель гранулярной клетки (ГрК) мозжечка и моделирование динамики  $\text{Ca}^{2+}$  в такой клетке были детально описаны нами ранее

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: esaft@biph.kiev.ua (Е. Э. Сафтенку).

[1]. Вкратце, модельная клетка состояла из сомы и материнского дендрита, который заканчивался тремя пальцеобразными отростками. В присутствии блокаторов АТФаз сарко(эндо)плазматического ретикулула вызванные деполяризацией кальциевые транзиенты определяются процессом входа  $Ca^{2+}$  ( $R_{\text{вход}}$ ), связыванием этих ионов с буферами (буферизацией  $-R_{\text{буф}}$ ), выделением  $Ca^{2+}$  из клетки ( $R_{\text{выдел, ПМ}}$ ), его утечкой через плазматическую мембрану ( $R_{\text{ПМ, ут}}$ ) и диффузией ( $R_{\text{диф}}$ ):

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]_i}{\partial t} = R_{\text{диф}} + R_{\text{буф}} + R_{\text{выдел, ПМ}} + R_{\text{ПМ, ут}} + R_{\text{вход}}$$

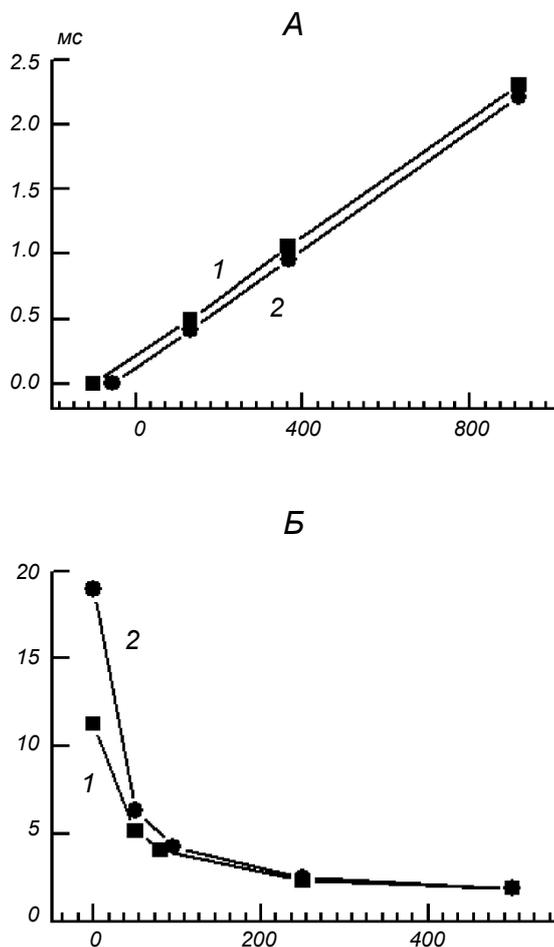
Кальциевые ответы в окончаниях дендритов ГрК, которые были вызваны длящейся 200 мс деполяризацией плазматической мембраны от  $-70$  до  $0$  мВ, моделировались, и полученные данные сравнивались с опубликованными результатами экспериментальных измерений таких ответов, т. е. относительных изменений интенсивности флуоресценции по сравнению с ее изначальным значением ( $\Delta F/F$ ) [10]. Было показано [1], что митохондриальный транспорт  $Ca^{2+}$  не может заметно влиять на подобные транзиенты. Значения максимальной кальциевой проводимости ( $g_{\text{max, Ca}}$ ) и максимальной скорости выведения кальция ( $v_{\text{max, ПМ}}$ ) подгонялись таким образом, чтобы воспроизвести усредненное изменение флуоресценции в окончаниях дендритов ГрК, измеряемое в конфигурации «целая клетка» с помощью индикатора Oregon Green ВАРТА-1 (OGB1), а также градиент интенсивности флуоресценции вдоль дендрита ГрК. Значение максимального изменения флуоресценции ( $\Delta F/F$ )<sub>max</sub>, при котором происходило полное насыщение OGB1 в экспериментах Гола и соавт. [10], послуживших основой для нашего моделирования, не было определено. Мы предположили, что оно находится в интервале  $0.4-0.6$  [1]. Для расчета пиковой амплитуды кальциевого тока ( $I_{Ca}$ ) полученная в модели пиковая амплитуда плотности этого тока в каждом компартменте клетки умножалась на площадь поверхности такого компартмента и среднее число компартментов в зрелой ГрК [10] (сوما, четыре материнских дендрита и 12 пальцеобразных отростков).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка  $k_{\text{буф}}$  при наличии по-разному распределенных эндогенных буферов анализировалась с по-

мощью модели кальциевой сигнализации в ГрК мозжечка [1]. Сначала мы включили в модель однородно распределенный эндогенный буфер с низким сродством (константа диссоциации  $K_d = 10$  мкМ) и общей концентрацией  $[Буф]_T = 500$  мкМ. Как видно из рис. 1, А, использование графика зависимости  $t_{1/2}$  изменения  $[Ca^{2+}]_i$  от буферной емкости добавленного индикатора OGB1 ( $k_{\text{OGB1}}$ ) не позволяет получить надежную оценку  $k_{\text{буф}}$  в дендритных окончаниях модельной ГрК. Несмотря на кажущийся линейный характер зависимости  $t_{1/2}$  от  $k_{\text{OGB1}}$ , оценка  $k_{\text{буф}} = 100$ , которая была установлена соответственно пересечению оси абсцисс графиком зависимости  $t_{1/2}$  от  $k_{\text{OGB1}}$ , отделяющему негативные значения, оказывается существенно большей, чем значение  $k_{\text{буф}}$  эндогенного буфера, которое мы использовали в модели (50). Если же скорость выведения  $Ca^{2+}$  из модельной клетки линейно зависела от  $[Ca^{2+}]_i$ , мы получали оценку  $k_{\text{буф}}$  ( $\sim 55$ ) со значительно меньшей погрешностью. В отличие от этого подхода моделирование изменений концентраций связанных с  $Ca^{2+}$  двух индикаторов с высоким и низким сродством – OGB1 ( $K_d = 0.2$  мкМ) и Маг-Фура-2 ( $K_d = 25$  мкМ), а затем расчет отношения значений  $t_{1/2}$  транзиентов упомянутых концентраций OGB1 и Маг-Фура2 (ООФ), полученных в модели и в натуральных экспериментах, могут дать весьма точную оценку  $k_{\text{буф}}$  (Б). Однако последнее утверждение будет справедливым только в том случае, если эндогенный буфер распределен в клетке однородно. Если же такой буфер распределен гомогенно в дендритных окончаниях, но гетерогенно в материнском дендрите, а для оценки  $k_{\text{буф}}$  в дендритных окончаниях используется модель с однородным распределением буфера в клетке, ошибка в оценке значения  $k_{\text{буф}}$  может достигать 20 % (Б). В случае же, когда в апикальной части дендритных окончаний локализуется буфер, имеющий достаточно большую емкость (соответствующее предположение было сделано в нашей предыдущей работе [1]), ошибка в оценке  $k_{\text{буф}}$ , основанная на некорректной предпосылке, становится намного больше.

Одинаковая плотность кальциевых каналов в пределах всего дендритного окончания привела бы к большому продольному потоку  $Ca^{2+}$  из части дендритного окончания, в которой буфер, обладающий большой емкостью, отсутствует, в ту его часть, где данный буфер концентрируется. По этой причине наблюдался бы очень быстрый спад флуоресцентного транзиента, измеряемого посередине дендритного окончания. Приблизительно одинаковый временной ход флуоресцентных транзиентов во всех



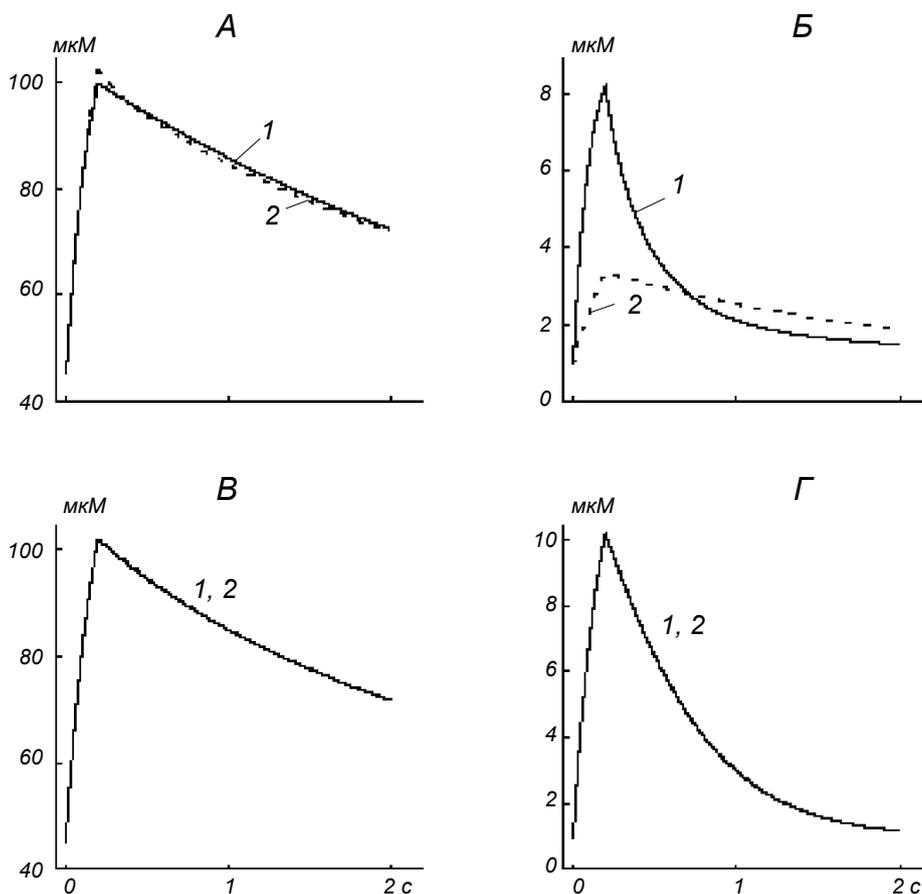
**Р и с. 1.** Оценка буферной емкости эндогенных буферов по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $k_{\text{буф}}$ ) на основании кинетического анализа кальциевых транзиентов, вызванных деполяризацией плазматической мембраны.

**А** – влияние добавленной кальциевой буферной емкости OGB1 на динамику  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в дендритном окончании. По оси абсцисс – буферная емкость OGB1; по оси ординат – время полуспада кальциевых транзиентов, мс. Эндогенная буферная емкость оценивалась по пересечению графиком оси абсцисс. Общая концентрация эндогенного буфера  $[\text{Буф}]_T = 500$  мкМ. Для моделирования нелинейного выведения  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки (1) концентрация, при которой скорость его выведения была равна 50 % максимальной, полагалась равной 0.83 мкМ. Линейный характер выведения  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки (2) моделировался как  $R_{\text{выдел, ПМ}} = v_{\text{max, ПМ}}([\text{Ca}^{2+}]_i - [\text{Ca}^{2+}]_{i,0}^{2+})$ , где  $v_{\text{max, ПМ}}$  – максимальная скорость выведения,  $[\text{Ca}^{2+}]_{i,0}^{2+} - [\text{Ca}^{2+}]_i$  в состоянии покоя. Для 1 и 2 максимальная кальциевая проводимость  $g_{\text{max, Ca}} = 1.81 \cdot 10^{-5}$  См · см<sup>-2</sup> в дендритных окончаниях и  $0.486 \cdot 10^{-5}$  См · см<sup>-2</sup> в материнских дендритах;  $v_{\text{max, ПМ}} = 3.08$  пмоль/(см<sup>-2</sup> · с)<sup>-1</sup> (1) и  $3.25 \cdot 10^{-3}$  мкм · мс<sup>-1</sup> (2) в обоих сравниваемых компартментах [1]. **Б** – зависимость отношения времени полуспада транзиентов концентраций OGB1 и Маг-Фура-2, связанных с  $\text{Ca}^{2+}$  (ООФ), от буферной емкости фиксированного эндогенного буфера  $k_{\text{буф}}$  в модели с неоднородным распределением потенциалзависимых кальциевых каналов (1) и в модели с неоднородным распределением эндогенного буфера (2), который находился в материнском дендрите в больших концентрациях (14, 16.5, 26.5

частях дендритного окончания ожидался бы только в тех случаях, когда плотность кальциевых каналов была бы намного большей в апикальной части пальцеобразного отростка, чем во всех остальных его частях (рис. 2, А). Следует заметить, что ООФ для участка посередине дендритного окончания, рассчитанный с помощью такой модели, оказался намного больше ООФ, полученного с использованием модели с однородным распределением буферов, в которую был включен эндогенный буфер с низким средством в той же концентрации (рис. 2). Это происходит потому, что отношение общей буферной емкости посередине дендритного окончания и в его апикальной части в присутствии Маг-Фура-2 меньше, чем в случае присутствия OGB1. Значение  $k_{\text{буф}}$  в дендритном окончании зависит не только от общей концентрации буфера, но и от плотности кальциевых каналов в апикальной части пальцеобразного отростка. Для каждого значения максимальной кальциевой проводимости ( $g_{\text{max, Ca}}$ ) в этой области можно подобрать такую величину  $[\text{Буф}]_T$  гомогенно распределенного буфера с низким средством, при которой в модели будет достаточно хорошо воспроизводиться вызванное деполяризацией изменение флуоресценции в дендритном окончании ГрК, измеренное с помощью OGB1, а значение ООФ модельных транзиентов будет соответствовать значению ООФ, полученному в натуральных экспериментах (рис. 3, А). Несмотря на то, что в дендритных окончаниях ГрК значение  $t_{1/2}$  OGB1-ответов по меньшей мере в четыре раза больше, чем  $t_{1/2}$  флуоресцентных ответов в случае использования Маг-Фура-2 (Гол, частное сообщение), значение  $k_{\text{буф}}$  фиксированного буфера в данном компартменте может быть достаточно большим и достигать 300–500. Соответственно, чтобы воспроизвести усредненный экспериментальный флуоресцентный транзиент, должны быть подобраны и большие значения  $g_{\text{max, Ca}}$ , чем в случае гомогенного распределения эндогенных буферов [1]. Результаты таких модельных реализаций дают дополнительное объяснение расхождению между характеристиками

и 39 мМ для четырех точек соответственно), чем в дендритном окончании. Для подгонки параметров максимальное изменение интенсивности флуоресценции  $(\Delta F/F)_{\text{max}}$  было принято равным 0.6. Подробные объяснения в тексте.

**Р и с. 1.** Оцінка буферної ємності ендогенних буферів відносно  $\text{Ca}^{2+}$  ( $k_{\text{буф}}$ ) на основі кінетичного аналізу кальцієвих транзиентів, викликаних деполяризацією плазматичної мембрани.



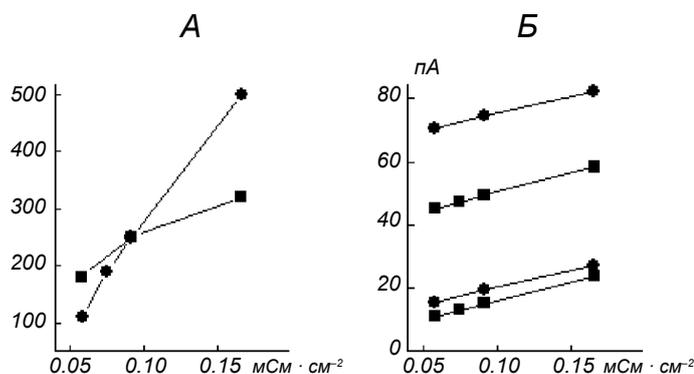
**Р и с. 2.** Моделирование флуоресцентных транзиентов, вызванных деполяризацией плазматической мембраны, в дендритных окончаниях гранулярных клеток.

*A–Г* – изменения концентрации связанного с  $\text{Ca}^{2+}$  красителя OGB1 – [CaOGB1] (*A, B*) и концентрации связанного с  $\text{Ca}^{2+}$  Маг-Фура-2 – [CaMgFura] (*B, Г*). Профили показаны для участков, находящихся посередине (*1*) и в апикальной части (*2*) дендритного окончания. На всех фрагментах *A–Г* в модель включен буфер с константой диссоциации  $K_d = 10$  мкМ и  $[\text{Буф}]_T = 800$  мкМ. *A* и *B* – в условиях добавления буфера со свойствами кальретинина, который локализован в апикальной части дендритных окончаний и обладает 40 мМ мест связывания с  $\text{Ca}^{2+}$ . На *B* транзиент *1* убывает в 9.5 раза быстрее, чем на *A*, а на *Г* – в четыре раза быстрее, чем на *B*. На *A* и *B* в апикальной части дендритного окончания  $g_{\text{max, Ca}} = 92 \cdot 10^{-5} \text{ См} \cdot \text{см}^{-2}$  и  $v_{\text{max, ПМ}} = 200$  пмоль  $(\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$ , в остальной части дендритного окончания  $g_{\text{max, Ca}} = 1.99 \cdot 10^{-5} \text{ См} \cdot \text{см}^{-2}$  и  $v_{\text{max, ПМ}} = 3.66$  пмоль  $(\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$  и в материнском дендрите  $g_{\text{max, Ca}} = 0.52 \cdot 10^{-5} \text{ См} \cdot \text{см}^{-2}$  и  $v_{\text{max, ПМ}} = 3.66$  пмоль  $(\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$ . На *B* и *Г*  $g_{\text{max, Ca}} = 1.93 \cdot 10^{-5} \text{ См} \cdot \text{см}^{-2}$  в дендритном окончании и  $0.52 \cdot 10^{-5} \text{ См} \cdot \text{см}^{-2}$  в материнском дендрите,  $v_{\text{max, ПМ}} = 2.34$  пмоль  $(\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$  в обоих компартаментах. Графики *1* и *2* совпадают. По оси абсцисс – время, с; по оси ординат – [CaOGB1], мкМ (на *A* и *B*) и [CaMgFura2], мкМ (на *B* и *Г*).

**Р и с. 2.** Моделювання флуоресцентних транзентів, викликаних деполаризацією плазматичної мембрани, у дендритних закінченнях гранулярних клітин.

типичных измеряемых кальциевых токов ( $I_{\text{Ca}}$ ) в ГрК мозжечка (пиковая амплитуда 120–150 пА [11]) и  $I_{\text{Ca}}$ , полученных в модели с однородным распределением эндогенного буфера (5–9 пА для  $(\Delta F/F)_{\text{max}}$  в интервале 0.4–0.6). Чтобы согласовать результаты экспериментальных измерений и данные, полученные в модели, мы предположили, что буфер с высоким сродством (предположительно кальретинин)

локализуется как в соме, так и в апикальных частях дендритных окончаний ГрК [1]. При допущении гетерогенности распределения буфера в соме ГрК мы получили пиковую амплитуду  $I_{\text{Ca}}$  в модели, равную 24–49 пА [1]. При допущении же локализации буфера со свойствами кальретинина как в соме, так и в дендритах ГрК пиковая амплитуда  $I_{\text{Ca}}$  в модели составляла 45–82 пА (*B*).



**Рис. 3.** Зависимость емкости эндогенных кальциевых буферов ( $k_{\text{буф}}$ ) и амплитуды кальциевого тока ( $I_{\text{Ca}}$ ), рассчитанных с использованием модели, от плотности кальциевых каналов.

*A* – график зависимости  $k_{\text{буф}}$  при котором ООФ в модели равен 4.0, от значения  $g_{\text{max, Ca}^{2+}}$  в апикальной части дендритного окончания.  $(\Delta F/F)_{\text{max}} = 0.6$  (для 1) и 0.4 (для 2). *B* – зависимость рассчитанного  $I_{\text{Ca}}$  от  $g_{\text{max, Ca}^{2+}}$  в апикальной части дендритного окончания в моделях с буфером большой емкости, локализованным только в апикальной части дендритных окончаний (1, 2) или и в апикальной части дендритных окончаний, и в соме (3, 4).  $(\Delta F/F)_{\text{max}} = 0.6$  (1, 3) и 0.4 (2, 4);  $v_{\text{max, ПМ}} = 200 \text{ пмоль} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{c})^{-1}$ . В случае однородного распределения буферов в дендритном окончании  $k_{\text{буф}} = 50$  (для  $(\Delta F/F)_{\text{max}} = 0.4$ ) и 80 (для  $(\Delta F/F)_{\text{max}} = 0.6$ ). По оси абсцисс –  $g_{\text{max, Ca}^{2+}}$ ,  $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; по оси ординат –  $k_{\text{буф}}$  (на *A*) и  $I_{\text{Ca}}$ ,  $\text{пА}$  (на *B*). Подробные объяснения в тексте.

**Рис. 3.** Залежність ємності ендогенних кальцієвих буферів ( $k_{\text{буф}}$ ) і амплітуди кальцієвого струму, розрахованих з використанням моделі, від щільності кальцієвих каналів.

Наши результаты показывают, что в случае локализации некоторого эндогенного буфера непосредственно под плазматической мембраной в местах больших входящих потоков  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку [12] ООФ, измеренный в том или ином сегменте дендрита, может существенно зависеть не только от буферной емкости эндогенного буфера в данном сегменте, но и от гетерогенности распределения кальциевых каналов в плазматической мембране дендрита. Поэтому значительное замедление флуоресцентных кальциевых транзиентов в тех случаях, когда измерения выполняются с помощью индикатора с большим сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ , может вовсе не означать, что емкость кальциевых эндогенных буферов по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$  невелика. Если характер распределения эндогенных буферов в клетке неизвестен, сравнение значений ООФ в модели и эксперименте даже при том условии, что свойства буферов и параметры выведения  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки выяснены достаточно детально, может дать не более надежную оценку

$k_{\text{буф}}$ , чем графики зависимости постоянной времени убывания кальциевых транзиентов от добавленной буферной емкости индикатора. Если же допустить, что буфер с большой емкостью локализован под плазматической мембраной и дендритных окончаний, и сомы и что распределение кальциевых каналов в дендритных окончаниях ГрК мозжечка отличается высокой гетерогенностью, рассчитанные параметры  $I_{\text{Ca}}$  соответствуют значениям типичных вызванных деполяриацией  $I_{\text{Ca}}$  в ГрК, измеренных в натурном эксперименте.

*О. Е. Сафтенку*<sup>1</sup>

### ОЦІНКА ЄМНОСТІ ЕНДОГЕННИХ КАЛЬЦІЄВИХ БУФЕРІВ У НЕЙРОНІ В РАЗІ ЇХ ГЕТЕРОГЕННОГО РОЗПОДІЛУ

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Значення відношення часу спаду до половини амплітуди кальцієвих транзиентів, виміряних за допомогою кальцій-чутливих флуоресцентних барвників з низькою та високою спорідненістю, може бути використано для оцінки буферної ємності цитозольних ендогенних кальцієвих буферів ( $k_{\text{буф}}$ ); з цією метою порівнюються параметри, отримані в моделі та натурних експериментах. Якщо ж розподіл ендогенних буферів вирізняється гетерогенністю, відношення часу напівспаду флуоресцентних транзиентів залежить не тільки від  $k_{\text{буф}}$ , але й від характеру розподілу кальцієвих каналів. Наше моделювання показало, що, незважаючи на значне сповільнення флуоресцентних відповідей при використанні кальцієвого індикатора Oregon Green BAPTA-1, значення  $k_{\text{буф}}$  у дендритних закінченнях гранулярних клітин мозочка може досягати 300–500. Це може відбуватись у тих випадках, якщо ендогенний кальцієвий буфер з великою ємністю локалізується, згідно з нашим припущенням [1], в апікальних ділянках дендритних закінчень даних клітин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. E. Saftenku, "Computational study of non-homogeneous distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  handling systems in cerebellar granule cells," *J. Theor. Biol.*, **1257**, 228-244 (2009).
2. E. Neher and G. J. Augustine, "Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells," *J. Physiol.*, **450**, 273-301 (1992).
3. J. Palecek, M. B. Lips, and B. U. Keller, "Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord," *J. Physiol.*, **520**, Part 2, 485-502 (1999).
4. F. Helmchen, K. Imoto, and B. Sakmann, "Ca<sup>2+</sup> buffering and action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites of pyramidal neurons," *Biophys. J.*, **70**, No. 2, 1069-1081 (1996).

5. B. L. Sabatini, T. G. Oertner, and K. Svoboda, "The life cycle of  $Ca^{2+}$  ions in dendritic spines," *Neuron*, **33**, No. 3, 439-452 (2002).
6. S. D. Brenowitz and W. G. Regehr, "Reliability and heterogeneity of calcium signaling at single presynaptic boutons of cerebellar granular cells," *J. Neurosci.*, **27**, No. 30, 7888-7898 (2007).
7. M. B. Jackson and S. J. Redman, "Calcium dynamics, buffering, and buffer saturation in the boutons of dentate granule-cell axons in the hilus," *J. Neurosci.*, **23**, No. 5, 1612-1621 (2003).
8. F. D. Marengo and J. R. Monck, "Development and dissipation of  $Ca^{2+}$  gradients in adrenal chromaffin cells," *Biophys. J.*, **79**, No. 4, 1800-1820 (2000).
9. D. A. Rusakov, F. Saitow, K. P. Lehre, and S. Konishi, "Modulation of presynaptic  $Ca^{2+}$  entry by AMPA receptors at individual GABAergic synapses in the cerebellum," *J. Neurosci.*, **25**, No. 20, 4930-4940 (2005).
10. D. Gall, F. Prestori, E. Sola, et al., "Intracellular calcium regulation by burst discharge determines bidirectional long-term synaptic plasticity at the cerebellum input stage," *J. Neurosci.*, **25**, No. 19, 4813-4822 (2005).
11. P. Rossi, E. D'Angelo, J. Magistretti, et al., "Age-dependent expression of high-voltage activated calcium currents during cerebellar granule cell development *in situ*," *Pflügers Arch.*, **429**, No. 1, 107-116 (1994).
12. N. J. Hack, M. C. Write, K. M. Charters, et al., "Developmental changes in the subcellular localization of calretinin," *J. Neurosci.*, **20**, No. 7, RC67 (2000).