

СТРУКТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ КАЛЬЦИЕВОЙ ДИНАМИКИ В ДЕНДРИТАХ НЕЙРОНА ПУРКИНЬЕ ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ПАЧЕЧНЫХ РАЗРЯДОВ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 18.02.10

На модели мозжечкового нейрона Пуркинье с реконструированными активными дендритами исследовали влияние соотношения объемов эндоплазматического ретикулума (органельного кальциевого депо) и цитозоля на динамику уровней Ca^{2+} в асимметричных частях дендритного разветвления в процессе генерации нейроном разных структурозависимых паттернов пачечной импульсной активности. Тоническое синаптическое возбуждение, однородно распределенное по дендритам (пространственно однородный постоянный входной сигнал), вызывало в дендритах пространственно неоднородные изменения мембранного потенциала (МП), сопровождавшиеся генерацией периодических или аperiodических пачек потенциалов действия на выходе клетки. Зарегистрированные при этом изменения МП в сегментах асимметричных дендритов далее подавали на мембрану выделенных дендритных сегментов в качестве командного напряжения в режиме динамической фиксации. Относительный размер депо в данных сегментах варьировали. Тем самым обеспечивались одинаковые локальные кальциевые токи и потоки в цитозоль сегмента, по-разному заполненного органельным депо. При любых паттернах импульсации микрогеометрия сегмента и депо модулировала кальциевые транзиенты точно таким же образом, как это было установлено в предыдущих исследованиях электрических и концентрационных ответов моделируемого нейрона на локальное фазное синаптическое возбуждение. Пиковые значения вызванных деполяризационными сдвигами всплесков цитозольной концентрации Ca^{2+} увеличивались параллельно с возрастанием части внутриклеточного объема, занимаемой депо. Наиболее важным фактором, определяющим эту структурную зависимость, было отношение площади мембранной поверхности и свободного от органелл объема дендритного сегмента. Существенную специфику демонстрировали значения концентрации Ca^{2+} , депонированного в одинаковых по размеру сегментах асимметричных частей дендритного разветвления, в которых наблюдались асинхронные разновеликие изменения МП при генерации аperiodической пачечной импульсации на выходе. Больше кальция депонировалось в сегментах, которые в среднем дольше пребывали в состоянии высокой деполяризации (это приводило к интенсивной активации кальциевых каналов и усиливало соответствующий поток Ca^{2+} в цитозоль). Таким образом, локальная динамика концентраций Ca^{2+} непосредственно зависит от локальной микрогеометрии и опосредованно – от глобальной макрогеометрии дендритного разветвления, поскольку последняя обуславливает связанные с пространственной асимметрией разновеликие транзиенты в разных частях дендритного разветвления, обладающего активными мембранными свойствами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реконструированный нейрон Пуркинье, шипиковый дендрит, динамика уровня Ca^{2+} , эндоплазматический ретикулум.

¹Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара (Украина).

Эл. почта: ber_linn@yahoo.com (Т. С. Новородовская).

ВВЕДЕНИЕ

Изменения концентрации кальция – универсального вторичного посредника в процессах внутриклеточной сигнализации – существенно влияют на многие фундаментальные функции нейронов – высвобождение нейротрансмиттеров, интеграцию входных сигналов в дендритах, синаптическую пластичность и др. [1–4]. Практически каждый нейрон оснащен богатым набором механизмов, обеспечивающих регуляцию уровня внутриклеточного Ca^{2+} , в частности кальциевыми каналами и насосами плазматической мембраны, внутриклеточными кальцийсвязывающими буферами и аккумулирующими кальций органеллами. Мозжечковые нейроны Пуркинье благодаря своим геометрическим характеристикам (в частности, уплощенной форме дендритного дерева) стали одними из наиболее доступных объектов экспериментальных микронейрофизиологических исследований [5–8], в том числе и в аспекте изучения кальциевой динамики. В определенной степени это обусловлено тем фактом, что нейроны Пуркинье относительно мало повреждаются в ходе приготовления переживающих срезов. Однако методические ограничения в подобных экспериментах все еще остаются очень существенными. Мало изучены такие актуальные вопросы структурно-функциональной организации упомянутых нейронов, как сопряжение электрических процессов и изменений концентрации Ca^{2+} , а также связь упомянутых процессов с особенностями клеточной и субклеточной морфологии. Актуальность указанной проблематики не в последнюю очередь обусловлена тем обстоятельством, что в процессе нормального развития и при разных видах клеточной патологии размерные характеристики и форма нейронов Пуркинье, как и других нервных клеток, изменяются; в данном случае меняются также размеры и численность внутриклеточных органелл [9–11].

Особенности клеточной и субклеточной геометрии могут быть важными факторами, серьезно влияющими на функциональные характеристики нейрона, поскольку в зависимости от пространственной/объемной организации кальцийаккумулирующих органелл обмен Ca^{2+} между объемами внутриклеточного пространства через разделяющие эти объемы поверхности (мембраны) будет происходить по-разному. В связи с очевидной ограниченностью возможностей натурального эксперимента источником существенной информации о роли структурных факторов в кальциевой динамике мо-

гут быть результаты вычислительных экспериментов на моделях клеток и субклеточных структур [12–14]. На моделях реконструированных нейронов Пуркинье было показано [15, 16], что не только свойства активной мембраны, но и такие особенности геометрии, как метрическая асимметрия дендритов, являются существенными факторами, определяющими формирование специфических пространственно-временных паттернов электрических и концентрационных сигналов в масштабах целого дендритного разветвления. В данных моделях, однако, использовалось весьма упрощенное описание кальциевой динамики [12, 13], и это не позволяло детально исследовать, какую роль в динамике концентрационных кальциевых сигналов играют органелльные кальциевые депо (в частности, как влияет на подобные сигналы степень наполненности такими депо внутриклеточного объема). В то же время есть основания полагать, что роль указанных структурных факторов (относительных размеров депо) может быть достаточно существенной. В дендритных стволах и шипиках нейронов Пуркинье присутствует такой важнейший вид органелльных депо, как цистерны эндоплазматического ретикула (ЭР) [17–19]. Размеры и форма ЭР значительно изменяются в зависимости от физиологических/патологических состояний клетки [19, 20]. Структурная изменчивость присуща и дендритным шипикам данных нейронов; геометрические характеристики этих компартментов весьма вариабельны [21–23]. Изменения соотношения размеров ЭР и свободного от органелл цитозоля оказывают существенное модулирующее влияние на динамику внутриклеточного Ca^{2+} , что было продемонстрировано в недавних исследованиях на моделях дендритных фрагментов нейронов Пуркинье. В указанных моделях механизмы обмена Ca^{2+} между ЭР и цитозолем были учтены весьма детально [24–26]. В этих исследованиях рассматривались электрические и концентрационные транзиенты, вызванные в данных фрагментах одиночным возбуждающим синаптическим воздействием. Настоящая же работа представляет собой дальнейшее развитие упомянутого выше направления исследований: она посвящена выяснению влияния соотношений геометрических размеров кальциевого депо ЭР и безорганельного цитозоля на динамику Ca^{2+} в реконструированных «реалистических» дендритных разветвлениях нейронов Пуркинье при генерации достаточно сложных паттернов импульсной активности – периодических и аperiodических пачечных разрядов, иницииро-

ванных распределенным тоническим возбуждением дендритных синапсов. Изменения мембранного потенциала (МП) клетки с активными асимметричными дендритами в процессе генерации импульсных паттернов разной сложности существенно отличаются от мембранных событий, генерируемых под воздействием локального фазного синаптического возбуждения (именно последний вид воздействий обычно применяется в экспериментальных исследованиях кальциевой динамики). То, как механизмы регуляции уровней внутриклеточного Ca^{2+} реагируют на электрические транзиенты в указанных выше условиях (значительно более близких к естественным), пока остается практически не изученным, а актуальность этого вопроса вполне очевидна. Для решения данной задачи в качестве исходной мы использовали модель нейрона Пуркинье. Для нейронов указанного типа характерен богатый репертуар паттернов импульсной активности – как периодических пачек потенциалов действия (ПД) разной сложности, так и аperiodических (стохастических) последовательностей ПД [27]. В эту модель была интегрирована разработанная нами детальная модель обмена кальция между ЭР, цитозолем и внеклеточным пространством [24–26]. Сравнительный анализ соответствующих процессов обеспечивался использованием специально разработанного подхода, основанного на принципе динамической фиксации потенциала. Вначале на исходной модели в результате подачи возбуждающих воздействий имитировали генерацию периодических или аperiodических пачечных разрядов, сопровождавшихся характерными изменениями МП и сдвигами внутриклеточной концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$ (кальциевыми транзиентами) в разных частях реконструированного дендритного разветвления. Записи изменений МП в участках разных асимметричных дендритов использовали затем в качестве командных сигналов напряжения, подаваемых на мембрану соответствующего дендритного сегмента, который включал в себя ЭР. Результаты сравнительного

анализа концентрационных процессов в цитозоле и ЭР, наблюдаемых при разной наполненности внутридендритного объема указанным органелльным депо, убедительно свидетельствуют о том, что субклеточная дендритная геометрия оказывает существенное непосредственное модулирующее влияние на динамику уровней внутриклеточного Ca^{2+} в условиях генерации разных по сложности паттернов поддерживающейся импульсной активности нейронов Пуркинье мозжечка. Глобальная макрогеометрия дендритного разветвления оказывает на эти концентрационные процессы также существенное (хотя и опосредованное) влияние, определяя характер пространственной неоднородности электрических процессов, а следовательно, различия трансмембранных потоков Ca^{2+} в асимметричных дендритах.

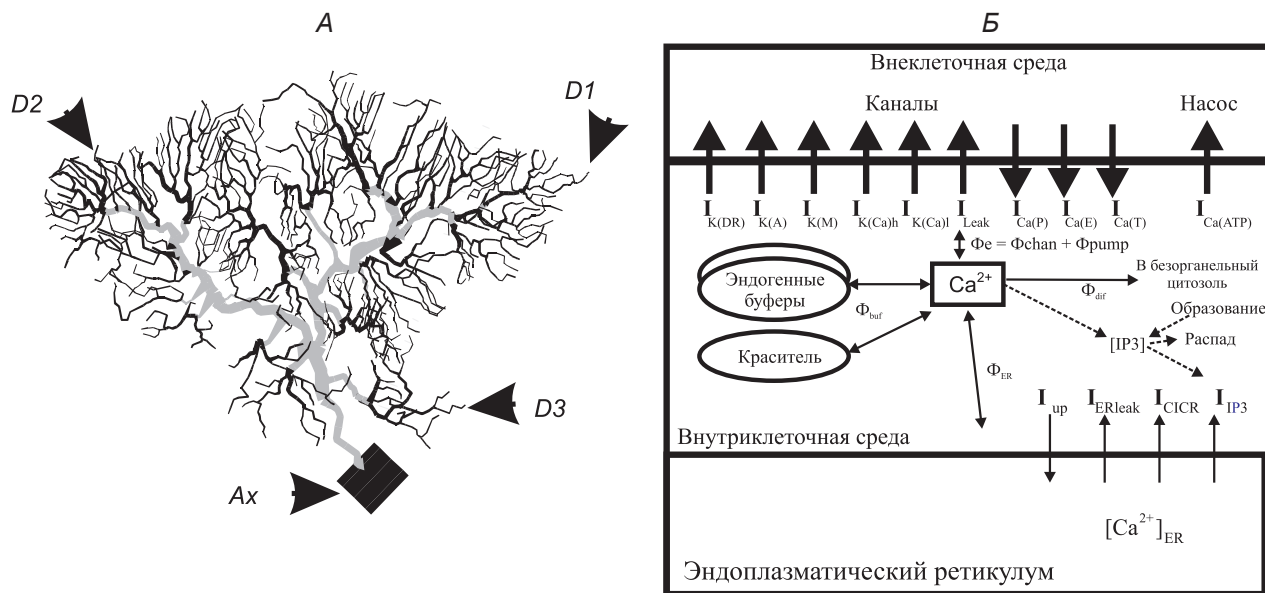
ОПИСАНИЕ МОДЕЛЕЙ

Исследования были выполнены на моделях двух типов (рис. 1). Модель типа 1 соответствовала дендритному разветвлению нейрона Пуркинье мозжечка, которое было реконструировано с высоким пространственным разрешением [15] (А). К типу 2 относились однокомпарментные модели, которые соответствовали цилиндрическим фрагментам, взятым из разных частей вышеуказанного реконструированного разветвления. Для таких фрагментов ранее было показано наличие существенных зависящих от геометрии различий пассивных передаточных свойств и соотношений фаз колебательных электрических и концентрационных процессов [15, 16, 27]. Локализация рассматриваемых фрагментов D1, D2 и D3 в дендритной структуре конкретного нейрона Пуркинье представлена на рис. 1, А. Длины (l) и диаметры (d) фрагментов D1, D2 и D3 были равны соответственно 8.71 и 0.7, 8.76 и 0.6 и 8.65 и 0.6 мкм. В структуру моделей типа 2 включали ЭР, представленный цилиндрической цистерной той

Параметры связывающих кальций буферов и флуоресцентного красителя Параметри буферів та флуоресцентного барвника, що зв'язують кальцій

Вещества	Константа скорости связывания, мМ · мс ⁻¹	Константа скорости распада, мс ⁻¹	Концентрация, мМ
Парвальбумин [B ₁]	6	0.9 · 10 ⁻³	0.54
Кальмодулин [B ₂]	100	0.1	0.03
Fura-4F [D]	120	0.12	0.1

Примечание. Подробные объяснения в тексте.



Р и с. 1. Структура реконструированного дендритного дерева моделируемого нейрона Пуркинью мозжечка (А) и схема имеющихся в дендритах мембранных и внутриклеточных механизмов (Б). Стрелками на А указаны места регистрации электрических и кальциевых концентрационных сигналов в разветвлениях дендритов (D1–D3) и аксоне (Ax). Подробные пояснения к схеме Б приведены в тексте.

Р и с. 1. Структура реконструированного дендритного дерева моделируемого нейрона Пуркин'є мозочка (А) і схема наявних у дендритах мембранных і внутрішньоклітинних механізмів (Б).

же протяженности l , что и сам дендритный компартмент [24–26]. Диаметр цистерны ЭР (d_{ER}) варьировали таким образом, что она занимала от 1 до 36 % объема компартмента.

Во всех моделях плазматическая мембрана обладала ионными каналами и насосами (схема на рис. 1, Б, указано толстыми стрелками), характерными для дендритов названных нейронов. В дополнение к набору каналов, использованному в наших предыдущих работах [15, 16], в рассматриваемую в настоящем исследовании модель были включены каналы, которые обеспечивали генерацию быстрых электрических процессов, в частности ПД и их пачек [13, 27]. Вкратце, плазмолемма дендритов включала в себя каналы входящего кальциевого тока P-, E- и T-типов ($I_{Ca(P)}$, $I_{Ca(E)}$, $I_{Ca(T)}$), выходящего калиевого тока задержанного выпрямления ($I_{K(DR)}$), калиевых токов А-, D- и М-типов ($I_{K(A)}$, $I_{K(D)}$ и $I_{K(M)}$), кальцийзависимых низко- и высокопотенциального калиевых токов ($I_{K(Ca)l}$ и $I_{K(Ca)h}$ соответственно), неспецифического тока утечки (I_{leak}), а также ток кальциевого насоса (Ca^{2+} -АТФазы – $I_{Ca(ATP)}$). Вosome присутствовали также каналы быстрого инактивирующегося и стойкого натриевого токов ($I_{Na(F)}$ и $I_{Na(P)}$ соответственно), а также калиевого тока аномального выпрямления ($I_{K(h)}$).

В модели типа 1 рассматривались изменения концентрации Ca^{2+} в тонком (толщина $\delta = 0.1$ мкм) примембранном слое. Данная концентрация увеличивалась при генерации трансмембранного тока $I_{Ca(P,E,T)}$ и уменьшалась под действием работы насоса $I_{Ca(ATP)}$, а также за счет спада $[Ca^{2+}]_i$ до базального уровня ($[Ca^{2+}]_{bulk} = 40$ нМ) с определенной постоянной времени. Это было эквивалентно диффузии Φ_{dif} кальция из примембранного слоя в более глубокие слои цитоплазмы и могло также рассматриваться как *невяное* отображение общего действия всех внутриклеточных кальцийсвязывающих механизмов (так, как это было представлено в ряде работ [12, 13, 15, 16]).

Модели типа 2 оснащались механизмами регуляции $[Ca^{2+}]$, которые были либо упрощенными, как в модели типа 1, либо такими, как в наших предыдущих работах [24–26] (см. схему на рис. 1, Б). Иными словами, данные модели в *явном* виде учитывали обмен Ca^{2+} между цитозолем, внеклеточной средой, ЭР, эндогенными протеиновыми кальциевыми буферами («быстрым» – кальмодулином и «медленным» – парвальбумином), а также флуоресцентным красителем (Fura-4), обладающим свойствами экзогенного буфера. Обмен Ca^{2+} с ЭР происходил благодаря потокам этих ионов через

органельные насосы и каналы поглощения ($\Phi_{\text{уп}}$), пассивной утечки (Φ_{ERleak}), а также высвобождению Ca^{2+} , индуцированного кальцием (Φ_{CICR}), и высвобождению Ca^{2+} через каналы, чувствительные к инозитол-3-фосфату— IP3 (Φ_{IP3}). Учитывались также процессы продукции/распада IP3 (сдвиги [IP3]), а также процессы буферизации Ca^{2+} и диффузия кальция в соседние компартменты (Φ_{dif}). Основными переменными, характеризующими поведение моделей, были трансмембранный потенциал (E), а также концентрации Ca^{2+} в цитозоле и ЭР ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ соответственно). Наряду с основными переменными вычислялись трансмембранные токи и равновесные потенциалы для Ca^{2+} . Изменения во времени переменных состояния, ионных токов и потоков описывались дифференциальными уравнениями, приведенными в наших предыдущих работах [24–26].

Построение и исследование моделей осуществляли в программной среде моделирования «НЕЙРОН» [28].

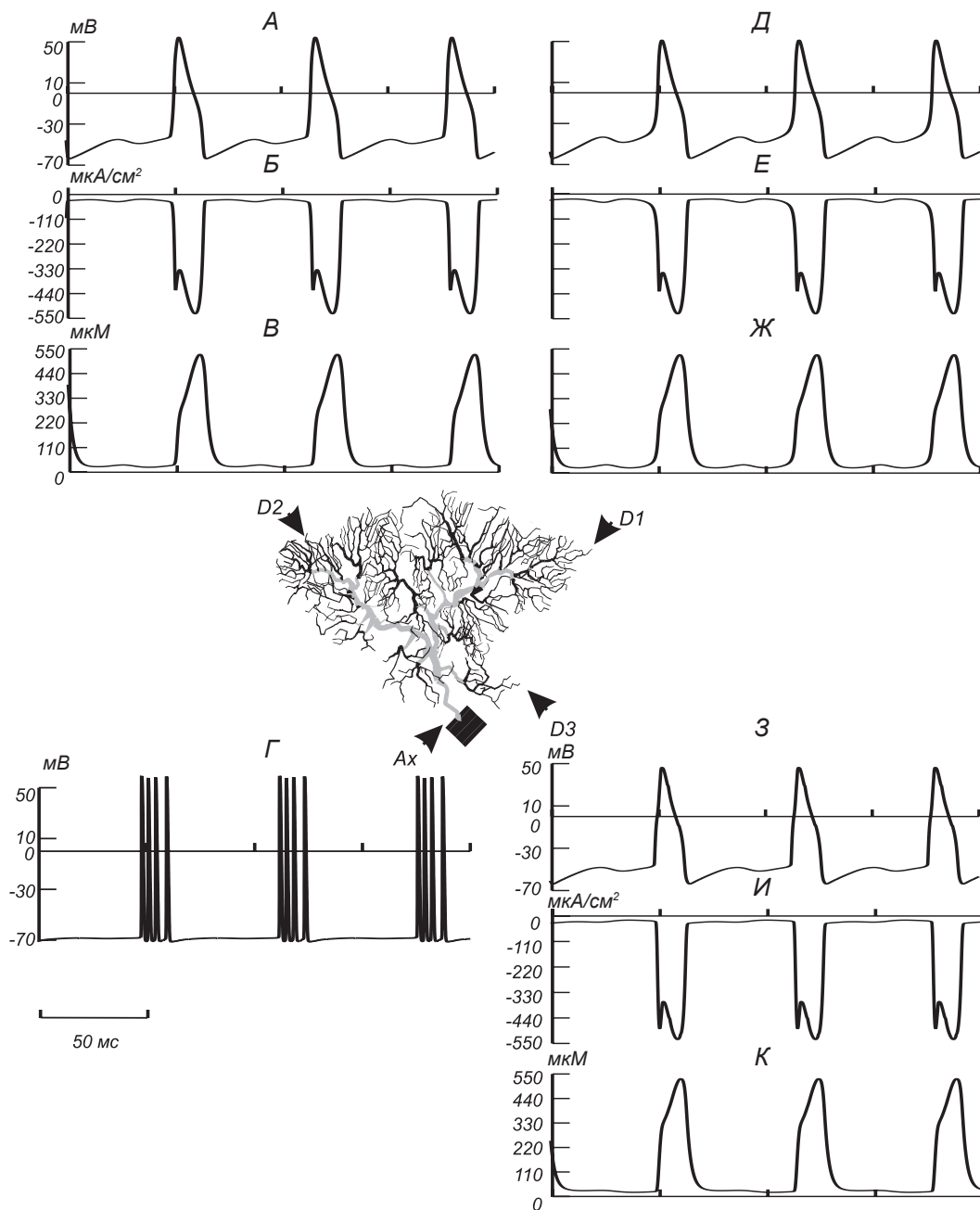
Модели типа 2 исследовали с применением «динамической фиксации потенциала» (dynamic voltage clamp), используя в качестве командных напряжений сигналы, полученные на модели типа 1 при генерации периодических или аperiodических пачек ПД в ответ на тоническую синаптическую активацию. Полученные на модели реконструированного нейрона значения МП дендритных фрагментов D1, D2 и D3 записывали с интервалом 0.025 мс в соответствующие файлы. Далее, считывая эти записи, формировали командные напряжения, которые подавали на мембрану моделируемого дендритного фрагмента с применением специальной опции Vector/Play программы «НЕЙРОН» (аналога выхода операционного усилителя) [28]. Рассчитывали возникавшие под действием указанного командного напряжения изменения потенциалзависимых проводимостей ионных каналов плазматической мембраны, ионных токов и концентраций. Использование такого протокола было обосновано данными предыдущих исследований, продемонстрировавшими идентичность изменений МП, которые генерировались в ответ на одиночное локальное синаптическое действие, и существенные различия кальциевых транзиентов, которые наблюдались в одиночном компартменте с депо разных типов, занимавшими разные относительные части внутриклеточного объема (рис. 2, [25]). В описываемых ниже экспериментах идентичность изменений МП компартмента обеспечивалась динамической фиксацией,

что позволяло в идентичных условиях исследовать особенности кальциевой динамики, обусловленные интересующими нас структурными факторами — прежде всего, заполненностью внутриклеточного объема органельными депо.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электрические процессы и кальциевые транзиенты (концентрационные сигналы) в асимметричных дендритах нейрона Пуркинье. В первой серии вычислительных экспериментов (рис. 2; 3) изучали электрические и концентрационные процессы, которые возникали в реконструированном дендритном разветвлении нейрона Пуркинье мозжечка, обладавшем активной мембраной. Эти процессы инициировали тоническим синаптическим возбуждением, внося однородную электропроводность, распределенную по всей поверхности дендритной мембраны (потенциал равновесия синаптического тока 0 мВ). При относительно низкой интенсивности синаптического действия (вносимая проводимость 50 мкС/см²) наблюдалась генерация периодических пачек из четырех ПД (рис. 2, Г), а при более высокой интенсивности (68 мкС/см²) генерировались аperiodические последовательности пачек разной структуры и одиночные ПД (рис. 3, Г). В процессе генерации периодического пачечного разряда, распространяющегося по аксону (рис. 2, Г), в дендритных участках D2, D1 и D3 наблюдались незатухающие периодические колебания МП (А, Д и З соответственно), кальциевого тока (Б, Е и И соответственно) и цитозольной концентрации Ca^{2+} (В, Ж и К соответственно). В указанных участках период колебаний был одним и тем же (64 мс), но фазовые отношения различались. По отношению к колебаниям в точке D1 колебания в точках D2 и D3 запаздывали на 1.15 и 0.18 мс соответственно. В случае генерации аperiodического (стохастического) выходного импульсного паттерна (рис. 3, Г) электрические и концентрационные процессы в тех же участках дендритов были асинхронными и разновеликими (Д–Ж, А–В и З–К соответственно). Записи изменений МП в дендритах (Д, А и З на рис. 2 и 3) были использованы далее в качестве командных напряжений, подаваемых в режиме динамической фиксации потенциала на выделенные компартменты.

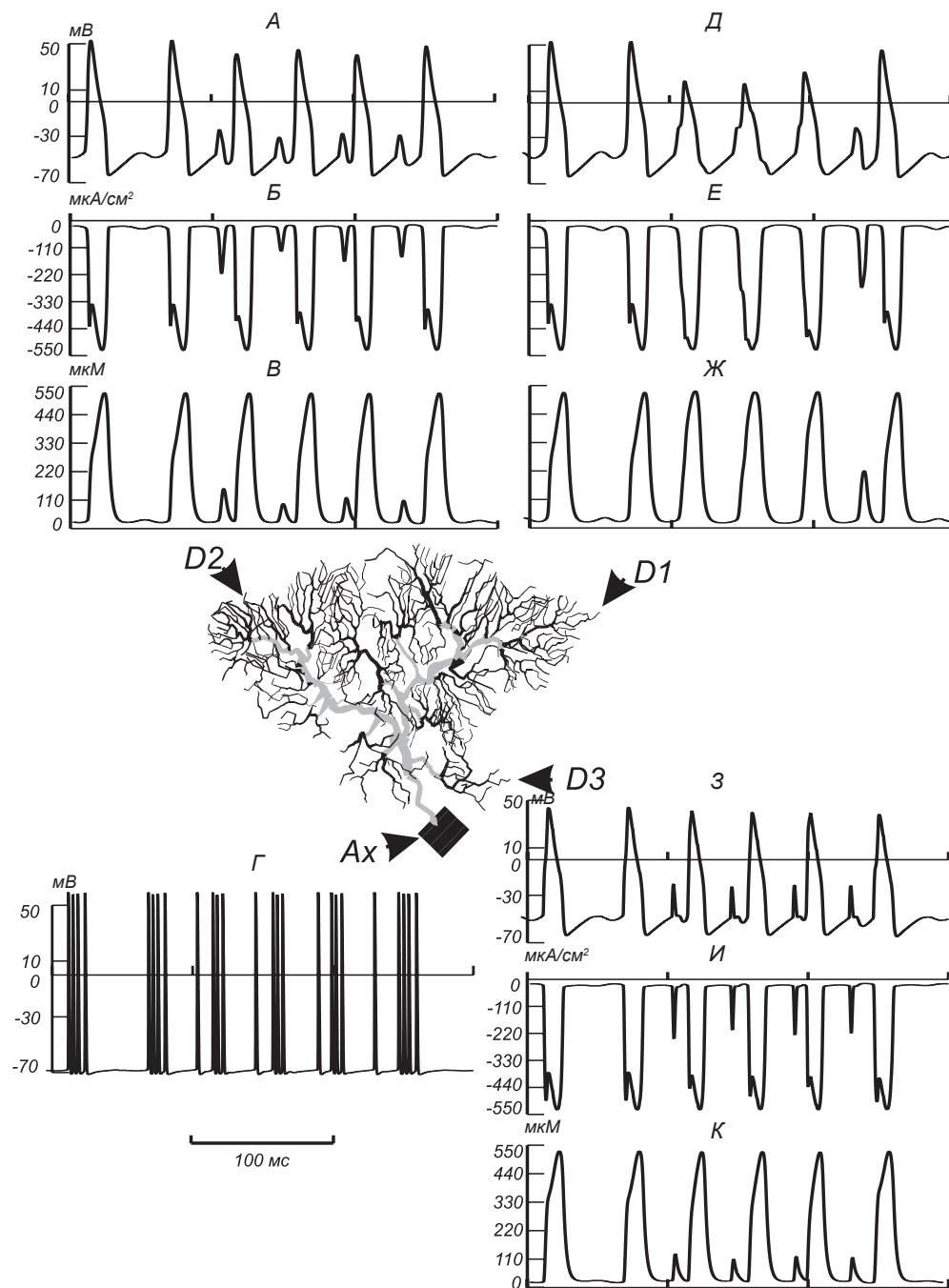
Электрические и концентрационные сигналы в дендритном участке с разными механизмами ре-



Р и с. 2. Электрические сигналы и кальциевые транзенты (концентрационные сигналы) в разных участках реконструированного дендритного дерева нейрона Пуркинье мозжечка во время генерации периодических пачечных импульсных разрядов при тонической активации синаптических входов, распределенных по дендритам.

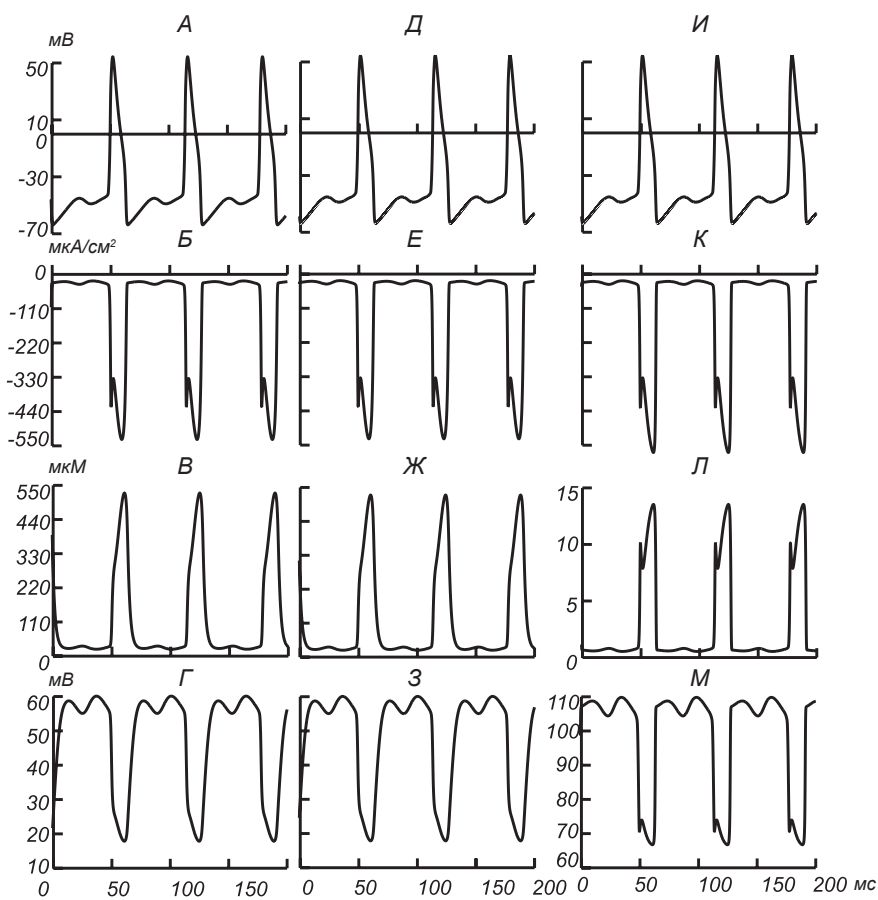
A, Д, З – изменения мембранного потенциала (МП), мВ, *Б, Е, И* – кальциевых токов через единицу поверхности дендритной мембраны, мкА/см² и *В, Ж, К* – концентрации Ca²⁺ в цитозоле, мкМ, зарегистрированные соответственно в участках *D2, D1* и *D3* (локализация указана стрелками на вставке); *Г* – изменения МП в аксоне (*Ax*), мВ.

Р и с. 2. Електричні сигнали і кальцієві транзенти (концентраційні сигнали) у різних ділянках реконструйованого дендритного дерева нейрона Пуркін'є мозочка під час генерації періодичних пачкових імпульсних розрядів при тоничній активації синаптичних входів, розподілених по дендритах.



Р и с. 3. То же, что и на рис. 2, но во время генерации аperiodических (стохастических) разрядов.

Р и с. 3. Те ж саме, що й на рис. 2, але під час генерації аперіодичних (стохастичних) розрядів.



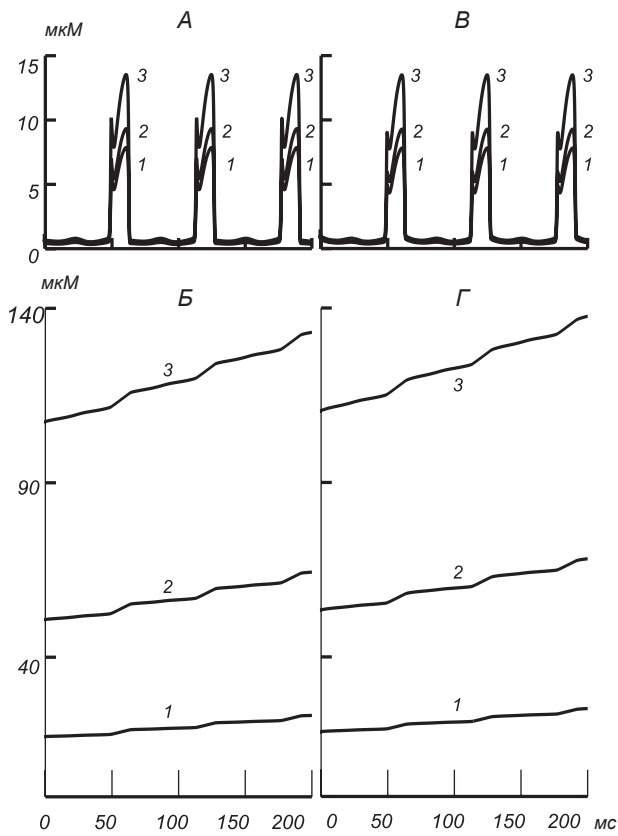
Р и с. 4. Электрические сигналы и кальциевые транзиенты в участке D2 реконструированного дендритного дерева нейрона Пуркинье (А–Г) во время генерации импульсной активности, показанной на рис. 2, а также при динамической фиксации изменений потенциала в изолированном участке дендрита с такими же мембранными свойствами и геометрией, но с разными механизмами регуляции динамики уровня Ca^{2+} (Д–М).

А, Д, И – изменения мембранного потенциала, мВ, Б, Е, К – плотности трансмембранного кальциевого тока, мкА/см², В, Ж, Л – концентрации Ca^{2+} в цитозоле, мкМ и Г, З, М – потенциала равновесия (реверсии) для кальциевого тока, мВ, рассчитанные без учета (А–З) и с учетом (И–М) обмена Ca^{2+} между цитозолем и эндоплазматическим ретикулумом.

Р и с. 4. Електричні сигнали і кальцієві транзиенти в ділянці D2 реконструйованого дендритного дерева нейрона Пуркін'є (А–Г) під час генерації імпульсної активності, показаної на рис. 2, а також при динамічній фіксації змін потенціалу в ізолюваній ділянці дендрита з такими самими мембранними властивостями та геометрією, але з різними механізмами регуляції динаміки рівня Ca^{2+} (Д–М).

гуляции [Ca^{2+}], наблюдаемые в процессе генерации периодического выходного импульсного паттерна. Типичные результаты сравнительного исследования периодических электрических и концентрационных процессов в выделенных дендритных компартментах нейрона Пуркинье, имеющих различные механизмы регуляции уровней внутриклеточного Ca^{2+} , показаны на примере дендритного участка D2 (рис. 4). За основу для сравнения принимали записи (рис. 2, А–В), полученные на модели реконструированного нейрона с упрощенным представлением механизмов кальциевой динамики, которые идентичны таковым на рис. 2 и к которым добавлен график изменений равновесного потенциала для кальциевого тока (Г). Вначале исследовали процессы в выделенном компартменте (модель типа 2), имевшем те же размеры, мембранные и внутриклеточные механизмы, что и участок D2 реконструированного разветвления (модель типа 1). Соответствующие результаты представлены на рис. 4, Д–З. Изменения МП в компартменте

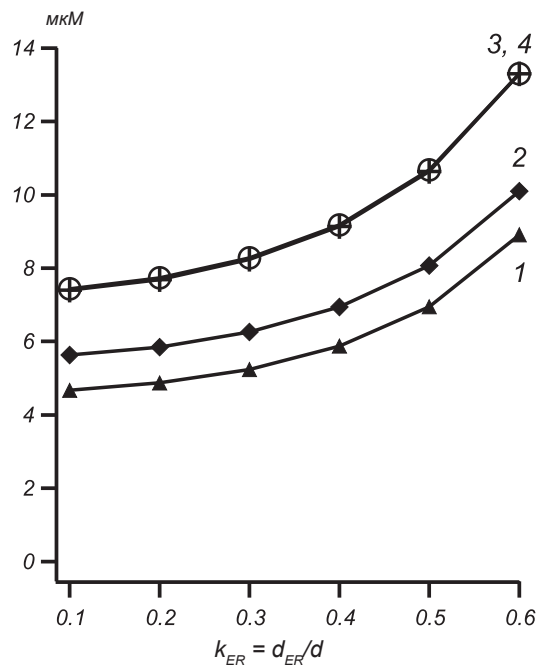
(Д) полностью определялись подаваемым в режиме динамической фиксации командным напряжением. В качестве последнего использовалась запись потенциала на участке D2 модели целого нейрона (А). Наблюдаемые в этих условиях изменения трансмембранного кальциевого тока (Е), цитозольной концентрации Ca^{2+} (Ж) и потенциала равновесия для кальциевого тока – E_{Ca} (З) были практически идентичными таковым, полученным на модели 1 (Б–Г соответственно). Таким образом, были обеспечены не только идентичность изменений МП, но и поступление внутрь дендритного компартмента таких же, как в модели целого нейрона, порций Ca^{2+} при генерации периодического импульсного паттерна. Тем самым была подтверждена адекватность использования модели выделенного компартмента в режиме динамической фиксации напряжения в качестве базы для сравнительного исследования влияний типа и пространственной организации оргanelльных депо, функционирующих как регуляторы кальциевой динамики.



Р и с. 5. Влияние относительного размера цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭР) на динамику концентрации Ca^{2+} в цитозоле (А, В) та ЭР (Б, Г) при наличии (Б, Г) и отсутствии (А, В) буферов и флуорофора в дендритном участке D2 в условиях динамической фиксации потенциала, которая соответствует периодическому паттерну импульсной активности нейрона Пуркин'е, показанному на рис. 2. Кривые 1–3 на А–Г построены соответственно отношениям диаметра цистерны ЭР к диаметру дендритного сегмента, равным 0.2, 0.4 и 0.6.

Р и с. 5. Вплив відносного розміру цистерни ендоплазматичного ретикулума (ЕР) на динаміку концентрації Ca^{2+} у цитозолі (А, В) та ЕР (Б, Г) при наявності (Б, Г) та відсутності (А, В) буферів і флуорофору в дендритній ділянці D2 в умовах динамічної фіксації потенціалу, що відповідає періодичному патерну імпульсної активності нейрона Пуркін'є, показаному на рис. 2.

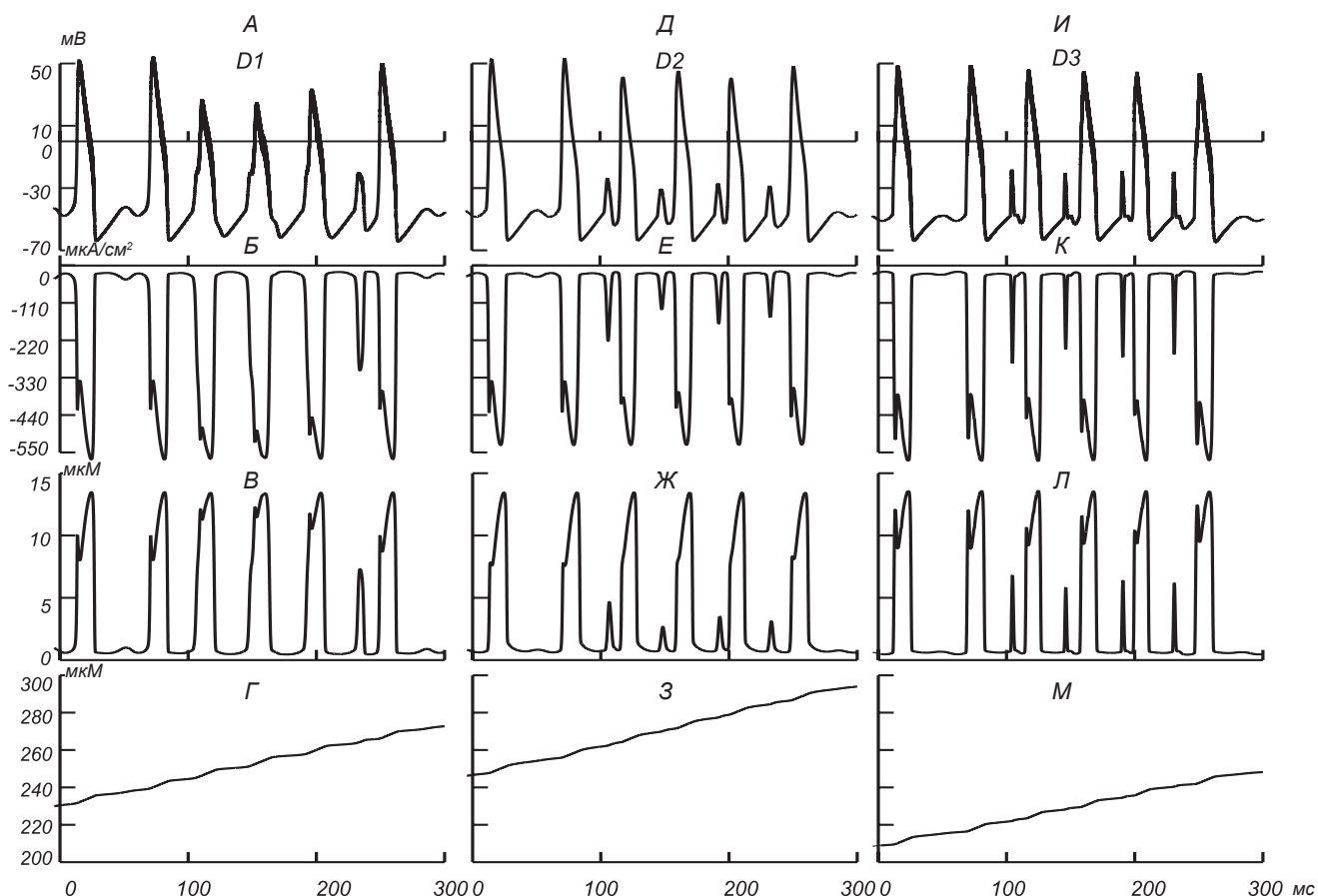
Опираясь на описанный выше результат, далее в рассматриваемый компартмент вместо упрощенного механизма регуляции уровней Ca^{2+} встраивали модифицированный механизм, учитывающий в явном виде обмен с буферами и ЭР (см. схему на рис. 1, Б), и повторяли тот же протокол динамической фиксации потенциала. При подаче командного напряжения (И), такого же, как и в предыдущем вычислительном эксперименте (Д), наблюдались периодически изменявшиеся кальциевые токи (К), у



Р и с. 6. Зависимость пиковых значений раннего «быстрого» (1, 2) и позднего «медленного» (3, 4) компонентов колебаний концентрации Ca^{2+} в цитозоле (ось ординат, мкМ) от относительного диаметра цистерны эндоплазматического ретикулума (ось абсцисс) при наличии (1, 3) и отсутствии (2, 4) буферов и флуорофора в дендритном участке D2 в условиях динамической фиксации потенциала, соответствующей импульсному паттерну на рис. 2.

Р и с. 6. Залежність пікових значень раннього «швидкого» (1, 2) і пізнього «повільного» (3, 4) компонентів коливань концентрації Ca^{2+} у цитозолі (вісь ординат, мкМ) від відносного діаметра цистерни ендоплазматичного ретикулума (вісь абсцисс) при наявності (1, 3) і відсутності (2, 4) буферів і флуорофору в дендритній ділянці D2 в умовах динамічної фіксації потенціалу, що відповідає імпульсному патерну на рис. 2.

которых амплитуды как «быстрого», так и «медленного» компонентов были большими, чем в предыдущих случаях (Б и Е). Разницы были небольшими (-429.6 и -426 мкА/см²) у «быстрых» компонентов и значительными (-572.67 и -529.6 мкА/см²) – у «медленных». Эти различия токов связаны с наблюдаемыми различиями концентрационнозависимых равновесных потенциалов для Ca^{2+} (ср. Г, 3 и М). Пиковые значения E_{Ca} в модифицированной модели были сдвинуты в сторону деполяризации (около +65 мВ относительно начального МП; М) по сравнению с исходными (около +20 мВ; Г и 3). Это обуславливало большие значения движущего потенциала для входящего кальциевого тока E_{Ca} при тех же значениях потенциалзависимых проводимостей кальциевых каналов. В свою очередь, различия равновесных потенциалов E_{Ca} обусловлены тем, что в



Р и с. 7. Электрические сигналы и кальциевые транзенты в изолированных участках D1 (А–Г), D2 (Д–З) и D3 (И–М) реконструированного дендритного дерева нейрона Пуркин'е в условиях динамической фиксации потенциала, которая соответствует аperiodическому паттерну импульсации, показанному на рис. 3.

А, Д, И – изменения мембранного потенциала, мВ, Б, Е, К – плотности мембранного кальциевого тока, мкА/см², В, Ж, Л – концентрации Ca²⁺ в цитозоле и Г, З, М – в эндоплазматическом ретикулуме, мкМ.

Р и с. 7. Електричні сигнали та кальцієві транзєнти в ізолюваних ділянках D1 (А–Г), D2 (Д–З) і D3 (И–М) реконструйованого дендритного дерева нейрона Пуркін'є в умовах динамічної фіксації потенціалу, що відповідає аперіодичному патерну імпульсації, показаному на рис. 3.

исходных моделях концентрации Ca²⁺ рассчитывались в тонком примембранном слое; значит, они имели бóльшие значения (В и Ж) на фоне сходных величин кальциевого тока по сравнению с таковыми в модифицированной модели малого компартмента, в котором концентрация рассчитывалась в рамках предположения о достаточно высокой скорости перемешивания (так называемые well-stirred models [24]) и потому имела меньшие пиковые значения (Л).

Влияние объема ЭР и буферов на кальциевые сигналы в дендритном компартменте при генерации периодического импульсного паттерна. В последующих вычислительных экспериментах на модели изолированного участка D2 (результаты представ-

лены на рис. 5) исследовали зависимость динамики [Ca²⁺] в цитозоле и ЭР от относительного размера ЭР (А–Г) в условиях наличия (В, Г) и отсутствия (А–Б) эндогенных буферов и флуорофора. Варьируя диаметр цистерны ЭР d_{ER} (0.12, 0.24 и 0.36 мкм; 1, 2 и 3 соответственно), рассчитывали ответы на приложение того же командного напряжения, что и в предыдущей серии вычислительных экспериментов (рис. 4, А), – изменения концентрации Ca²⁺ в цитозоле ([Ca²⁺]_{cyt}, мкМ) и ЭР ([Ca²⁺]_{ER}, мкМ). Равные приращения диаметра ЭР обуславливали разные (прогрессивно увеличивающиеся) значения приращений пиковой концентрации Ca²⁺ в цитозоле (А, В) и депо ЭР (Б, Г). Наличие эндогенных буферов и красителя сказывалось на этих изменени-

ях весьма незначительно (порядка 0.12–0.13 % для $[Ca^{2+}]_i$ и 0.9–2.5 % для $[Ca^{2+}]_{ER}$) (B, Г).

В условиях варьирования диаметра цистерны ЭР концентрация цитозольного Ca^{2+} на этапе развития как раннего («быстрого»), так и более позднего («медленного») компонентов периодических кальциевых транзиентов изменялась и при наличии, и при отсутствии буферов по закону (рис. 6, 1–4), который практически соответствовал полученному ранее ([24], рис. 5, А) в исследованиях структурозависимости локальных кальциевых ответов на предъявление одиночных фазных синаптических стимулов. Графики зависимости пиковых концентраций Ca^{2+} от отношения диаметров ЭР и дендрита (1–4), построенные по результатам вычислительных экспериментов (рис. 5), были сдвинуты в область больших концентраций, но по своему виду оставались подобными друг другу и упомянутому графику ([24], А). Следовательно, такие зависимости могут быть аппроксимированы однотипной функцией. Она, как было показано ранее [24], определяется отношением поверхности компартмента к объему безорганельной части цитозоля.

Такие же результаты были получены и на других участках асимметричных дендритов, в которых развивались синхронные, но сдвинутые по фазе электрические и концентрационные процессы (не иллюстрировано).

Электрические и кальциевые концентрационные сигналы в участках асимметричных дендритов, наблюдаемые в процессе генерации аperiодического выходного импульсного паттерна. В завершающей серии вычислительных экспериментов сравнивали электрические и концентрационные транзиенты в изолированных компартментах (соответствовавших участкам D1, D2 и D3 реконструированного дендритного разветвления) при подаче на них командных напряжений, идентичных генерируемым на указанных участках в условиях аperiодичности (стохастичности) паттерна разрядов на выходе нейрона. Соответственно наблюдаемым в этих участках различиям аperiодических транзиентов МП (рис. 7, А, Д, И) отмечались существенные различия кальциевых токов (B, E, K) и цитозольных концентрационных кальциевых транзиентов (B, Ж, Л). В случае генерации на выходе нейрона аperiодических пачек и одиночных импульсов в асимметричных частях дендритного разветвления обнаруживались асинхронные медленные всплески деполяризации разной интенсивности (А, Д, И). Во время этих всплесков регистрировались входящие

кальциевые токи (B, E, K). У них, как и в случае синхронных периодических импульсных паттернов (рис. 4, B, E, K), выделялись «быстрый» и «медленный» компоненты. В данном случае соотношения амплитуд «быстрых» и «медленных» компонентов кальциевого тока существенно варьировали (главным образом за счет более значительной вариации «быстрого» компонента). Это заметно отличало наблюдаемую картину от одинаковых соотношений амплитуд «быстрых» и «медленных» компонентов кальциевого тока, характерных для случая периодических паттернов (рис. 4, B, E, K).

При сравнении аperiодических процессов в рассматриваемых участках обращают на себя внимание существенные различия уровней депонированного Ca^{2+} (рис. 7, Г, З, М). По мере продолжения активности концентрация Ca^{2+} в депо всех участков нарастала монотонно с приблизительно одинаковой скоростью, но значения концентрации Ca^{2+} в депо, расположенных в разных участках, демонстрировали существенные различия. Так, к концу рассматриваемого интервала времени концентрация Ca^{2+} , запасенного в депо участка D2, достигала 293 мкМ (З). Это значение было заметно большим такового в депо D1 (273 мкМ; Г); разница по сравнению со значением в депо участка D3 (250 мкМ; М) была еще более существенной. Поскольку при фиксированной кинетике депонирования количество Ca^{2+} , поступающего в депо, определяется концентрацией данного иона в цитозоле [26], наиболее вероятной причиной наблюдаемых различий является то, что в течение одного и того же временного отрезка продолжающейся импульсной активности в разные участки из внеклеточной среды количества поступающего Ca^{2+} были неодинаковыми. Такое возможно в том случае, если дендриты, включающие в себя сравниваемые участки, в условиях генерации асинхронного аperiодического паттерна пребывали в состоянии высокой деполяризации, обеспечивающей открывание кальциевых каналов, разное время; соответственно, и вход этих ионов в клетку был различным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивность и временное течение кальциевых сигналов в таких малоразмерных частях нейронов, как синаптические бутоны, тонкие дендриты или дендритные шипики, зависят как от микрогеометрии этих частей, так и от кинетических харак-

теристик процессов поступления Ca^{2+} в клетку и его связывания эндогенными неорганическими буферами и органельными депо. Среди редких пока публикаций, посвященных данному аспекту, выделяется недавнее сообщение [30]. Авторы исследовали, как наличие ЭР в дендритных шипиках пирамидных нейронов гиппокампа влияет на постсинаптическую сигнализацию. Было обнаружено, что синаптическое возбуждение вызывало в шипиках, содержащих в себе ЭР, транзиенты очень большой амплитуды. Следствием этого были существенные функциональные сдвиги (развитие постсинаптической депрессии). В большинстве шипиков, лишенных ЭР, напротив, подобные эффекты отсутствовали. Авторы заключили, что особенности микроанатомии шипика являются надежным индикатором наличия/отсутствия специфических механизмов, управляющих пластичностью в «микронном» масштабе. Результаты наших модельных исследований согласуются с данными упомянутых выше натуральных экспериментов и указывают на такой возможный механизм наблюдавшихся в присутствии ЭР увеличенных транзиентов, как уменьшение свободного объема цитозоля за счет занятия части дендритного пространства органельным депо.

Сравнительное изучение влияний упомянутых выше структурных и кинетических факторов на динамику уровней Ca^{2+} в дендритах представляется весьма актуальной областью исследований. Выявленные в последние годы разнообразные пространственно-временные паттерны кальциевых сигналов в дендритах обуславливают специфические биохимические эффекты, определяющие, например, развитие длительной потенциации или депрессии синаптических ответов в нейронах Пуркинье [29]. Решение соответствующих задач в натурном эксперименте практически невозможно из-за пока непреодолимых методических ограничений. Оно достаточно затруднено и в вычислительных экспериментах, так как требует вариации неких определенных параметров моделей (например, структурных) в условиях фиксации всех остальных (например, кинетических). В нашей работе для выделения влияния микрогеометрических факторов на динамику уровней Ca^{2+} был использован оригинальный подход, не применявшийся до настоящего времени. Вначале мы регистрировали МП в дендритных сегментах, расположенных в разных частях дендритного разветвления; такие изменения МП происходили при генерации на выходе

клетки разных паттернов пачечной импульсной активности – периодических и аperiodических. Затем эти записи использовали в качестве командных сигналов напряжения, подаваемых в режиме динамической фиксации потенциала на мембрану того же сегмента, в котором мы варьировали относительный размер кальциевых депо. Тем самым обеспечивались поступления в цитозоль исследуемого сегмента одинаковых количеств Ca^{2+} , причем в одинаковом темпе, поскольку одни и те же командные напряжения одинаково активировали каналы входящего кальциевого тока. Наблюдаемые в этих условиях изменения интенсивности концентрационных процессов (изменений уровня Ca^{2+} , кальциевых транзиентов) определялись исключительно влияниями вариаций микрогеометрии депо.

Следует отметить, что использованные здесь в качестве командных электрические транзиенты, регистрировавшиеся в дендритах при генерации аperiodических и периодических пачечных выходных разрядов нейрона, существенно отличались по временному течению от таковых, наблюдаемых в случае локальной фазной синаптической стимуляции [24]. В то же время результаты сравнения представленных здесь сложных паттернов (рис. 5) и описанных ранее ответов на локальную фазную стимуляцию [24–26] свидетельствуют о том, что микрогеометрия депо оказывает в принципе одинаковое модулирующее влияние на интенсивность совершенно различных по своему происхождению и, соответственно, по временному течению (кинетики) кальциевых транзиентов. На это указывал одинаковый тип функциональной зависимости пиковых концентраций Ca^{2+} в цитозоле от отношения диаметров ЭР и исследуемого компартмента при отмеченных выше существенно разных типах электрической активности. Функциональная зависимость в случае генерации нейроном собственных пачечных разрядов в значительной мере повторяла зависимость, полученную в случае локальных ответов на одиночную синаптическую стимуляцию [24], и отличалась лишь некоторым сдвигом в область больших концентраций (рис. 6). Это означает, что вид функций, которые, как было показано ранее [24], обеспечивали наилучшее приближение данной зависимости, был одинаковым. Определяющим фактором оказалось отношение поверхности компартмента к объему его части, свободной от ЭР.

Существенно новым результатом явилась демонстрация значительных различий процессов накоп-

ления Ca^{2+} в депо, которые одинаково заполняют одинаковые по размеру компартменты асимметричных дендритов, обладающие активными мембранными свойствами и подвергающиеся воздействию однородного тонического синаптического возбуждения. Как необходимо отметить, именно метрическая асимметрия обуславливает то, что однородное по пространству и постоянное во времени синаптическое возбуждение (входной сигнал) приводит к генерации пространственно неоднородных электрических процессов в активном дендритном разветвлении и сложных временных паттернов разрядов ПД на выходе клетки. Упомянутые различия процессов депонирования были особенно выражены в случае генерации аperiodических выходных импульсных паттернов, сопровождавшихся асинхронными разновеликими изменениями МП и цитозольной концентрации Ca^{2+} в асимметричных дендритах (рис. 7, Г, З, М).

При сходных абсолютных и относительных размерах расположенных в разных дендритах компартментов и депо большее накопление наблюдалось в компартментах тех дендритов, которые в среднем дольше пребывали в состоянии высокой деполяризации; это обуславливало поступление большего количества Ca^{2+} в цитозоль (З). Описанное выше поведение моделей согласуется с тем, которое отмечалось в случае генерации периодических паттернов, сопровождающихся синхронными и одинаковыми по величине кальциевыми транзидентами в разных компартментах (рис. 2; 5); такие ситуации использовались для сравнения ранее. Одинаковые периодические кальциевые транзиденты обуславливали одинаковое депонирование кальция, которое было тем большим, чем выше была амплитуда транзидентов (например, при увеличенной доле ЭР в объеме компартментов; рис. 5, Б, Г).

Таким образом, выявилась не только прямая зависимость динамики дендритной концентрации Ca^{2+} от локальной микрогеометрии данного дендрита, но и косвенная зависимость этой концентрации от глобальной макрогеометрии всего асимметричного дендритного разветвления. Глобальная макрогеометрия дендритов оказывает особенно выраженное влияние на локальные концентрационные процессы; ее особенности обуславливают асинхронность и разную величину электрических транзидентов в асимметричных частях дендритного разветвления при генерации нейроном сложных аperiodических импульсных паттернов. Эти структурозависимые особенности дендритной кальциевой сигнализа-

ции представляют особый интерес, если учитывать установленную ранее широкую изменчивость размеров и формы как дендритов нейронов Пуркинье так и элементов ЭР, находящихся в указанных дендритах. Подобные вариации наблюдаются не только в ходе нормального развития данных клеток, но и в условиях разнообразных патологий.

Авторы благодарны проф. С. М. Корогоду за полезные замечания и комментарии к настоящей работе.

Т. С. Новородовська¹, І. Б. Кулагіна¹

СТРУКТУРНА ЗАЛЕЖНІСТЬ КАЛЬЦІЄВОЇ ДИНАМІКИ В ДЕНДРИТАХ НЕЙРОНА ПУРКІН'Є ПРИ ГЕНЕРАЦІЇ ПАЧКОВИХ РОЗРЯДІВ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара (Україна).

Резюме

На моделі мозочкового нейрона Пуркін'є з реконструйованими активними дендритами досліджували вплив співвідношення об'ємів ендоплазматичного ретикулула (органельного кальцієвого депо) і цитозолу на динаміку рівнів Ca^{2+} в асиметричних частинах дендритного розгалуження в процесі генерації нейроном різних структурозалежних паттернів пачкової імпульсної активності. Тонічне синаптичне збудження, однорідно розподілене по дендритах (просторово однорідний постійний вхідний сигнал), викликало в дендритах просторово неоднорідні зміни мембранного потенціалу (МП), які супроводжувалися генерацією періодичних або аперіодичних пачок потенціалів дії на виході клітини. Зареєстровані при цьому зміни МП в сегментах асиметричних дендритів далі подавали на мембрану виділених дендритних сегментів як командну напругу в режимі динамічної фіксації. Відносний розмір депо в даних сегментах варіювали. Тим самим забезпечувались однакові локальні кальцієві струми та потоки в цитозоль сегмента, по-різному заповненого органельним депо. При будь-яких паттернах імпульсації мікрогеометрія сегмента й депо модулювала кальцієві транзиденти таким самим чином, як це було встановлено в попередніх дослідженнях електричних і концентраційних відповідей модельованого нейрона на локальне фазне синаптичне збудження. Пікові значення викликаних деполяризаційними зрушеннями сплесків цитозольної концентрації Ca^{2+} збільшувалися паралельно зі зростанням частини внутрішньоклітинного об'єму, котру займає депо. Найважливішим фактором, який визначає цю структурну залежність, було відношення площі мембранної поверхні та вільного від органел об'єму дендритного сегмента. Найістотнішу специфіку демонстрували значення концентрації Ca^{2+} , депонованого в однакових за розміром сегментах асиметричних частин дендритного розгалуження, в яких спостерігались асинхронні різні за величиною

зміни МП при генерації аперіодичної пачкової імпульсації на виході. Більше Ca^{2+} депонувалося в сегментах, котрі в середньому довше перебували в стані високої деполяризації (це призводило до інтенсивної активації кальцієвих каналів та посилювало відповідний потік Ca^{2+} у цитозоль). Таким чином, локальна динаміка концентрацій Ca^{2+} безпосередньо залежить від локальної мікрогеометрії та опосередковано – від глобальної макрогеометрії дендритного розгалуження, оскільки остання зумовлює пов'язані з просторовою асиметрією неоднакові за величиною транзєнти в різних частинах дендритного розгалуження з активними мембранними властивостями.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. G. Kostyuk and A. Verkhratsky, *Calcium Signalling in the Nervous System*, Wiley, Chichester (1995).
2. M. J. Berridge, "Neuronal calcium signalling," *Neuron*, **21**, No. 1, 13-26 (1998).
3. *Calcium as a Cellular Regulator*, E. Caraffi and C. Klee (eds.), Oxford Univ. Press, New York (1999).
4. L. D. Pozzo-Miller, J. A. Connor, and S. B. Andrews, "Microheterogeneity of calcium signalling in dendrites," *J. Physiol.*, **525**, 53-61 (2000).
5. J. Meldolesi, A. Villa, P. Podini, et al., "Intracellular Ca^{2+} stores in neurons. Identification and functional aspects," *J. Physiol.*, **86**, Nos. 1/3, 23-30 (1992).
6. W. G. Regehr and D. W. Tank, "Dendritic calcium dynamics," *Current Opin. Neurobiol.*, **4**, No. 3, 373-382 (1994).
7. J. Eilrs and A. Konnerth, "Dendritic signal integration," *Current Opin. Neurobiol.*, **7**, No. 3, 385-390 (1997).
8. M. Canepari, K. Vogt, and D. Zecevic, "Combining voltage and calcium imaging from neuronal dendrites," *Cell Mol. Neurobiol.*, **28**, No. 8, 1079-1093 (2008).
9. K. Takei, G. A. Mignery, E. Mugnaini, et al., "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells," *Neuron*, **12**, 327-342 (1994).
10. A. Verkhratsky, "Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons," *Physiol. Rev.*, **85**, 201-279 (2005).
11. M. Bootman, O. Petersen, and A. Verkhratsky, "The endoplasmic reticulum is a focal point for co-ordination of cellular activity," *Cell Calcium*, **32**, 231-234 (2002).
12. E. De Schutter and J. Bower, "An active membrane model of the cerebellar Purkinje cell I. Simulation of current-clamps in slice," *J. Neurophysiol.*, **71**, 375-400 (1994).
13. T. Miyasho, H. Takagi, H. Suzuki, et al., "Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca^{2+} spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study," *Brain Res.*, **891**, 106-115 (2001).
14. P. Achard and E. De Schutter, "Calcium, synaptic plasticity and intrinsic homeostasis in Purkinje neuron models," *Front Comput. Neurosci.*, **2**, 8 (2008).
15. I. B. Kulagina, S. M. Korogod, G. Horscholle-Bossavit, et al., "The electro-dynamics of the dendritic space in Purkinje cells of the cerebellum," *Arch. Ital. Biol.*, **145**, Nos. 3/4, 211-233 (2007).
16. I. B. Kulagina, "Phase relationship between calcium and voltage oscillations in different dendrites of Purkinje neuron," *Neurophysiology*, **40**, Nos. 5/6, 477-485 (2008).
17. C. A. Ross, J. Meldolesi, T. A. Milner, et al., "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons," *Nature*, **339**, No. 6224, 468-470 (1989).
18. P. Volpe, A. Nori, A. Martini, et al., "Multiple/heterogeneous Ca^{2+} stores in cerebellum Purkinje neurons," *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, **105**, No. 2, 205-211 (1993).
19. K. Takei, G. A. Mignery, E. Mugnaini, et al., "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells," *Neuron*, **12**, 327-342 (1994).
20. M. Bootman, O. Petersen, and A. Verkhratsky, "The endoplasmic reticulum is a focal point for co-ordination of cellular activity," *Cell Calcium*, **32**, 231-234 (2002).
21. D. Hillman and S. Chen, "Plasticity of synaptic size with constancy of total synaptic contact area on Purkinje cells in the cerebellum," *Prog. Clin. Biol. Res.*, Ser. A, **59**, 229-245 (1981).
22. J. Takas and J. Hamori, "Developmental dynamics of Purkinje cells and dendritic spines in rat cerebellar cortex," *J. Neurosci. Res.*, **38**, No. 5, 515-530 (1994).
23. H. Kim, I. Kim, K. J. Lee, et al., "Specific plasticity of parallel fiber/Purkinje cell spine synapses by motor skill learning," *NeuroReport*, **13**, No. 13, 1607-1610 (2002).
24. С. М. Корогод, Т. С. Новородовська, "Вплив геометричних характеристик органельного депо та безорганельного цитозолу на динаміку рівнів внутрішньоклітинного кальцію в дендриті: модельне дослідження", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **41**, № 1, 19-31 (2009).
25. Т. С. Новородовская, С. М. Корогод, "Сравнительный модельный анализ кальциевого обмена между цитозолем и депо митохондрий или эндоплазматического ретикулаума", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **41**, № 5, 367-380 (2009).
26. Т. С. Новородовская, "Модельное исследование особенностей кальциевой динамики, обусловленных обменом между цитозолем и органельными депо", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **41**, № 5, 450-459 (2009).
27. S. M. Korogod and S. Tyč-Dumont, *Electrical Dynamics of the Dendritic Space*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York, Melbourne, et al. (2009).
28. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
29. T. Inoue, *Dynamics of Calcium and Its Roles in the Dendrite of the Cerebellar Purkinje Cell*, Divis. Mol. Neurobiol., The Inst. Med. Sci., The Univ. Tokyo, Tokyo (2002).
30. N. Holbro, A. Grunditz, and T. G. Oertner, "Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, No. 35, 15055-15060 (2009).