

이노시톨 삼인산 수용체와 미토콘드리아에 의한 심방 근세포 Ca^{2+} 신호전달의 조절

이향진 · 라스클리만* · 마틴모라드* · 우선희*

충남대학교 약학대학, *미국 조지타운대학교 의과대학 약리학교실

(Received November 2, 2004; Revised November 16, 2004)

Regulation of Atrial Ca^{2+} Signaling by Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and Mitochondria

Hyang-Jin Lee, Lars Cleemann*, Martin Morad* and Sun-Hee Woo*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Pharmacology, Georgetown University Medical Center, Washington, DC 20057 USA

Abstract — Atrial myocytes have two functionally separate groups of ryanodine receptors (RyRs): those at the periphery colocalized with L-type Ca^{2+} channels (DHPRs) and those at the cell interior not associated with DHPRs. Ca^{2+} current (I_{Ca}) directly gates peripheral RyRs on action potential and the subsequent peripheral Ca^{2+} release propagates into the center of atrial myocytes. The mechanisms that regulate the Ca^{2+} propagation wave remain poorly understood. Using 2-D confocal Ca^{2+} imaging, we examined the role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) and mitochondria on I_{Ca} -gated local Ca^{2+} signaling in rat atrial myocytes. Blockade of IP_3R by xestospongine C (XeC) partially suppressed the magnitudes of I_{Ca} -gated central and peripheral Ca^{2+} releases with no effect on I_{Ca} . Mitochondrial staining revealed that mitochondria were aligned with $\approx 2\text{-}\mu\text{m}$ separations in the entire cytoplasm of ventricular and atrial myocytes. Membrane depolarization induced rapid mitochondrial Ca^{2+} rise and decay in the cell periphery with slower rise in the center, suggesting that mitochondria may immediately uptake cytosolic Ca^{2+} , released from the peripheral SR on depolarization, and re-release the Ca^{2+} into the cytosol to activate neighboring central RyRs. Our data suggest that the activation of IP_3R and mitochondrial Ca^{2+} handling on action potential may serve as a cofactor for the Ca^{2+} propagation from the DHPR-coupled RyRs to the DHPR-uncoupled RyRs with large gaps between them.

Keywords □ atrial myocyte, Ca^{2+} signaling, mitochondria, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor

심장 근세포의 수축은 활동전위(action potential)에 의해 유도되는 세포질 내의 일시적 칼슘이온농도($[Ca^{2+}]_i$) 증가에 의해 일어난다. 활동전위 발생 시 세포막의 탈분극은 전압 의존성 L-형 Ca^{2+} 채널(L-type Ca^{2+} channel)을 열리게 하고, 열린 채널들을 통해 소량의 Ca^{2+} 이 세포 내로 유입된다. 유입된 Ca^{2+} 에 의해 세포 근형질망(sarcoplasmic reticulum, SR) 막에 있는 Ca^{2+} 유리 채널 즉 ryanodine receptors(RyRs)가 열려 많은 양의 Ca^{2+} 이 세포질로 유리된다.¹⁻⁴⁾ 활동전위에 의해 일어나는 이러한 세포 Ca^{2+} 신호전달(signaling)은 그 국부적인 양상이 심실과 심방에서 현저히 다른데, 이는 주로 세포막의 함몰구조 즉 t-tubule이 심실에는 존재하나 심방 근세포에는 거의 존재하지 않기 때

문이다.⁵⁾ 따라서 세포 주변부(periphery)에 위치한 SR은 세포막과 접합(peripheral junction)을 이루나, 세포 내부(center)의 SR은 그러한 세포막 접합을 형성하지 않는다(non-junctional SR).⁵⁾ 이러한 이유로 주변 접합부 SR에 있는 RyRs는 L-형 Ca^{2+} 채널과 매우 가까이(약 10 nm) 위치하지만, 세포 내부 SR에 있는 RyRs는 L-형 Ca^{2+} 채널과의 접촉이 없다.⁶⁾

심방 근세포에서는 활동전위 발생 시 세포막 L-형 Ca^{2+} 채널이 열려 근처 접합부 SR 막에 있는 RyRs를 먼저 열리게 한다. 주변 접합부 RyRs에 의해 세포질로 유리된 Ca^{2+} 은 세포 내부로 이동하여 이웃한 RyRs를 차례로 자극하여 열리게 한다. 이러한 이유로 활동전위 시에 심방 근세포에서는 세포 주변부에서 내부로 Ca^{2+} 이 이동하는 " Ca^{2+} 전파 웨이브(propagation wave)"가 발생한다.⁷⁻⁹⁾ 이 심방 근세포 Ca^{2+} 전파 웨이브의 속도는, 세포막 전압이 변하여 L-형 Ca^{2+} 채널에 의해 유입되는 Ca^{2+} 양이 달라져도 일정하게 유지되며 Ca^{2+} 의 단순 확산 속도보다 느려서⁹⁾

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5924 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) shwoo@cnu.ac.kr

L-형 Ca^{2+} 채널 이외에 Ca^{2+} 전파 웨이브를 조절하는 다른 세포 인자가 존재할 것으로 생각되고 있다.

심방 근세포의 SR에는 RyRs 뿐만 아니라 IP_3R 가 존재하며 이들 두 단백질은 세포 주변부에서 매우 가까이 위치한다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한 심방 근세포 SR 근처에는 미토콘드리아들이 분포하며, 최근 미토콘드리아에 있는 여러 종류의 이온 수송체가 세포질 Ca^{2+} 양을 조절한다고 보고되고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 따라서 본 연구에서는 RyRs, IP_3R , 미토콘드리아 간의 상호신호조절이 Ca^{2+} 을 매개로 일어날 수 있다는 가설과 이 상호신호조절이 탈분극 시 발생하는 Ca^{2+} 전파 웨이브를 조절한다는 가설을 검증 하고자 하였다.

실험 방법

단일 심방 근세포 분리

심방 근세포의 분리는 Woo 등⁹⁾의 방법으로 시행하였다. 즉, 흰쥐 수컷(Sprague-Dawley, 체중 200~300 g)을 sodium pentobarbital(150 mg/kg, 복강 투여)로 마취한 후 심장을 적출하였다. 심장의 대동맥을 Langendorff 관류 장치의 cannular에 연결하여 고정된 후 대동맥 안으로 0 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액(단위 : mM) 137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1 $MgCl_2$, 10 Glucose, pH 7.4)을 37°C에서 5 분간 관류시켰다. 이어서 0 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 collagenase(Roche, 1.4 mg/ml)와 protease(Type XIV, Sigma, 0.16 mg/ml)를 포함한 용액을 12 분간 관류시킨 다음 마지막으로 0.2 mM $[Ca^{2+}]$ 을 포함한 Tyrode 용액을 약 7 분간 관류시켜 사용된 효소를 제거하였다. 심장을 Langendorff 장치로부터 분리한 후 심방을 취하여 25 mm petri dish에 담긴 0.2 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 두었고, 조직을 여러 번 chopping한 후, mechanical dispersion을 가하였다. 분리된 세포들은 실험에 사용되기 전까지 실온에서 0.2 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 보관하였다.

세포질 및 미토콘드리아의 Ca^{2+} 영상화

Ca^{2+} 영상화는 Woo 등⁹⁾의 방법으로 시행하였다. 즉, Zeiss Axiovert TV135 도립 현미경($\times 40$, water immersion objective)에 연결된 2-D laser scanning confocal microscopy system (Noran Odyssey XL)을 사용하였다. Argon 이온 레이저를 이용하여 488 nm 또는 544 nm의 빛으로 fluo-3와 rhod-2 형광 지시약을 각각 excitation 시켰고 >510 nm 및 >570 의 형광 emission을 PMT(Hamamatsu, NJ, USA)를 이용하여 각각 감지하였다. y 방향의 scanning 속도는 30 Hz(Fig. 5) 또는 240 Hz(Fig. 1)로 조정하였다. Workstation(Indy, Silicon Graphics)의 Intervention 2D acquisition system을 이용하여 영상을 기록하였고 자체 개발한 "Con2" 컴퓨터 프로그램(Visual Basic 6.0으로 작성)의 pixel 측정법으로 형광 영상을 정량하였다. Fluo-3는 세

포질 Ca^{2+} 농도 측정을 위해 patch pipette 용액에 첨가하여 세포내로 직접 투석시켰으며, rhod-2는 미토콘드리아 Ca^{2+} 을 측정하기 위해 AM 형태(5 μM , 30분)로 세포 외부에서 처리하여 세포 내로 도입하였다. Ca^{2+} 농도는 아무런 처리를 하지 않았을 때의 바탕 형광 강도(F_0)에 대해 각 이미지의 형광 강도(F)를 표준화한 값 즉, F/F_0 로 나타내었다.

미토콘드리아 영상 측정

심실과 심방 근세포에 미토콘드리아를 선택적으로 염색하는 MitoTracker Orange(200 nM, Molecular Probes)를 포함한 정상 Tyrode 용액을 약 30 분간 처리한 후 영상을 측정하였다. 영상은 confocal laser scanning microscope system(LSM 510, Carl Zeiss, $\times 40$, oil immersion, argon laser; KBSI)을 사용하여 Zeiss LSM image analyzer로 기록하였으며, 영상의 분석은 OLYSIA BioReport(Olympus)로 시행하였다(Fig. 4).

Patch-clamp 방법

심방 근세포를 이용한 patch-clamp의 시행은 Hamill 등¹⁴⁾의 방법에 따라 whole cell mode에서 시행하였다. 심방 근세포 내에 Cs^+ 이 풍부한(Cs^+ -rich) pipette internal solution(단위 : mM) 0.4 Fluo-3, 110 CsOH, 110 Aspartic Acid, 5 NaCl, 20 TEA-Cl, 10 HEPES, 5 Mg-ATP; CsOH를 이용하여 pH를 7.2로 보정을 투석 시켰으며 pipette의 저항은 2.5~3.5 $M\Omega$ 이었다. L-형 Ca^{2+} 전류를 기록하기 위해 K^+ 및 Na^+ 채널을 zero $[K^+]_o$ (Cs^+ 으로 교환) Tyrode 용액과 tetrodotoxin(30 μM)을 사용하여 각각 억제하였다. Patch clamp amplifier(PC-1, Dagan Co.)로 clamp를 시행하였고 전류를 모니터링 하였다. 전류의 기록과 전압 고정 프로토콜은 A/D converter를 통해 pCLAMP software (version 9, Axon Instruments)로 수행하였다. 단일 세포 외부에 특정 약물을 처리할 때에는 고속 자동용액교환장치를 사용하였다.

통계

실험결과는 평균±표준오차로 표시하였으며 유의성은 Student's *t*-test를 사용하여 표시하였다.

실험 결과 및 고찰

세포질 Ca^{2+} 유리에 대한 IP_3R 억제제 효과

활동전위에 의해 유도되는 심방 근세포의 Ca^{2+} 전파 웨이브가 심방 세포에 존재하는 IP_3R 에 의해 조절되는 지 알아보기 위하여 IP_3R 에 대한 선택적 억제제 xestospongin C(XeC)를 처리하여 고찰하였다. 먼저 정상 조건에서 L-형 Ca^{2+} 전류를 막전압을 -80 mV에서 +60 mV로 고정하여 유도하였을 때(Fig. 1A) 심방 근세포의 주변부(PERI)와 중심부(CEN)에서 각각 Ca^{2+} 의 변

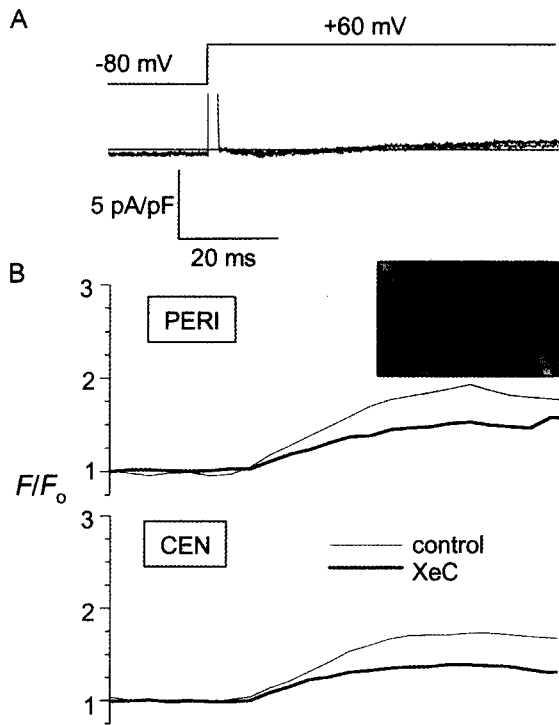


Fig. 1 - Effect of xestospongine C on atrial local Ca^{2+} releases. (A) Superimposed membrane currents elicited by the depolarizing pulse (upper trace) in the presence or absence of xestospongine C (XeC, 5 μ M). (B) Superimposed peripheral (PERI) and central (CEN) local Ca^{2+} transients, measured from the confocal Ca^{2+} images (240 Hz), on depolarization in the control condition and after incubation with XeC. (Inset) Image of pixel masks that were used to measure peripheral (two domain in the cell border) and central Ca^{2+} signal of atrial cell area.

화("Ca²⁺ transients")가 관찰되었다(Fig. 1B). 5 μ M XeC가 포함된 세포 외액을 동일 세포에 처리한 후 같은 전압변화를 일으켰을 때 L-형 Ca²⁺ 전류에는 별 변화가 없었으나(Fig. 1A) 세포 주변부와 내부에서 유리되어 증가하는 Ca²⁺ 양이 현저히 감소되었음을 관찰하였다(Fig. 1B). XeC로 처리한 7개의 심방 근세포에서 유사한 결과를 관찰하였으며, 그 평균 Ca²⁺ transient 억제 효과는 세포 주변부에서 41 \pm 3.2%, 세포 내부에서 49 \pm 5.1%로 각각 관찰되어 통계적으로 유의한 효과를 보였다(n=7, P<0.01). I_{Ca}는 control과 XeC 처리 시 유사하게 관찰되었다(pA/pF: Control, 1.12 \pm 0.22; XeC, 0.97 \pm 0.18, n=7, P>0.05). 이 결과는 막 전압의 탈분극시 SR RyRs에 의한 Ca²⁺ 유리뿐만 아니라 IP₃R에 의한 Ca²⁺의 유리도 일부 기여함을 나타낸다.

쥐 심방 근세포에서 IP₃R는 세포 주변부 RyRs와 근접하여 있으며 내부에는 거의 존재하지 않는다고 알려져 있다.¹⁰⁾ XeC에 의해 억제되는 내부 Ca²⁺ 유리는(Fig. 1B, CEN) XeC에 의해 줄어든 세포 주변부 Ca²⁺에 의해 내부로 확산되는 Ca²⁺ 양이 감소하여 내부 RyRs의 활성화에 영향을 주었기 때문으로 사료된다.

주변부 RyRs에 의해 먼저 증가한 Ca²⁺이 직접 또는 간접적인 기전에 의해 IP₃R를 자극하여 SR로부터 더 많은 Ca²⁺ 유리를 일으켰으리라고 추정되며 이러한 Ca²⁺ 유리 촉진과정은 주변부 RyRs과 바로 이웃하는 세포내부 RyRs 사이에 존재하는 gap¹⁰⁾을 극복하고 Ca²⁺ 전파 웨이브가 성공적으로 일어날 수 있는 하나의 기전이 될 것으로 사료된다.

심근세포 내 미토콘드리아의 분포

활동전위에 의해 유도되는 심방 근세포의 Ca²⁺ 전파 웨이브가 심방 세포에 존재하는 미토콘드리아에 의해 조절되는지 알아



Fig. 2 - Mitochondrial staining in rat ventricular myocyte. (A) Raw cell image. (B) Confocal visualization of mitochondria in the whole myocyte. (C) Magnified image from the boxed area in panel (B).



Fig. 3 - Mitochondrial staining in rat atrial myocyte. (A) Raw cell image. (B) Confocal visualization of mitochondria in the whole myocyte. (C) Magnified image from the boxed area in panel (B).

보기 위해 미토콘드리아를 특이적으로 염색하는 MitoTracker Orange를 사용하여 심근세포 내 미토콘드리아의 분포를 고찰하였다. 관찰된 미토콘드리아는 심실과 심방 근세포 모두에서 세포 전면에 규칙적으로 분포되어 있었다(Fig. 2, 3). 심실 근세포에서 미토콘드리아는 세포의 longitudinal direction으로 배열되어 있었으며(Fig. 2B, C) transverse direction으로 미토콘드리아

사이에 어둡게 보이는 밴드가 약 2 μm 간격의 규칙적인 배열을 이루고 있음을 관찰하였다(Fig. 2C, 화살표). 심방 근세포에서도 심실과 유사하게 미토콘드리아가 longitudinal 방향의 규칙적인 배열을 이루고 있었고(Fig. 3B) 2 μm 간격의 transverse band로 관찰되었다(Fig. 3C). 어둡게 보이는 이 transverse band는 미토콘드리아 사이에 위치하는 SR일 가능성이 가장 크다.⁵⁾

Longitudinal direction으로 배열된 심방 미토콘드리아 형광 신호를 측정하면 약 2 μm 마다 신호가 증가됨을 관찰할 수 있는데(Fig. 4A), 이는 미토콘드리아 사이에 같은 방향으로 근섬유가 규칙적으로 배열되기 때문이다.⁵⁾ 심방 근세포 핵의 가장자리에는 형광 신호가 보다 강하게 기록되었고 이는 미토콘드리아의 높은 밀도를 나타낸다(Fig. 4B, 화살표).

탈분극에 의해 유도된 미토콘드리아 내 Ca²⁺ 양의 변화

Longitudinal direction으로 규칙적인 배열을 이루는 미토콘드리아는 세포 주변부에서 내부로 이동하는 Ca²⁺에 대한 물리적인 장애 벽으로 작용한다. 기존 결과들에 의하면 이 미토콘드리아 내벽에는 다양한 이온 수송체가 존재한다고 알려져 있고,¹⁵⁾ 특히 최근에는 그 중 Ca²⁺을 수송하는 단백질들이 세포질 Ca²⁺ 농도를 생리학적 조건에서 빠른 속도로 조절한다고 보고된 바 있다.^{12,13)}

탈분극에 의해 유도되는 세포질 Ca²⁺의 전파 웨이브가 미토콘드리아에 의해 조절되는지 알아보기 위해 미토콘드리아 내 Ca²⁺ 농도([Ca²⁺]_m)가 탈분극에 의해 변화되는 지 조사하였다. 단일 심방 근세포에 고농도 K⁺(25 mM)을 포함한 용액을 외부에 단시간(500 ms) 빠른 속도로(용액 교환 속도 : 약 50 ms) 처리하여 세포 탈분극을 일으키고 이와 동시에 측정된 미토콘드리아 Ca²⁺ 형광 영상으로부터 세포 주변부와 내부의 형광을 측정하여 변화를 관찰하였다. 탈분극 직후 세포 주변부 [Ca²⁺]_m는 일시적으로 급격히 증가하였다가 감소하였고(Fig. 5A, a), 약 250 ms 후부터 다시 서서히 증가하였다(Fig. 5A, b). 세포 중심부 [Ca²⁺]_m는 주변부에 비해 약 30 ms 지연되어 최고치에 도달하였고(Fig. 5B, 점선 참조) 다시 소량 감소 후 서서히 증가하였다. 초기 탈분극 직후 [Ca²⁺]_m의 증가는 중심부에 비해 주변부에서 훨씬 컸고(ΔF/F₀ : 주변, 0.69±0.11; 중심, 0.35±0.06, n=14, P<0.05) 후기 느린 속도의 증가는 두 지역에서 유사한 정도로 나타났다(ΔF/F₀ : 주변, 0.52±0.12; 중심, 0.55±0.08, n=14, P>0.05). 초기 미토콘드리아 Ca²⁺ 농도의 증가는 탈분극시 L-형 Ca²⁺ 전류에 의해 주변부 SR로부터 세포질로 유리된 Ca²⁺이 미토콘드리아 내로 들어가기(uptake) 때문이다. 이는 주변부 [Ca²⁺]_m가 세포 내부 보다 현저히 빠르고 많이 증가한 것으로 알 수 있다. 그 후 [Ca²⁺]_m가 감소하는 것은 Ca²⁺이 미토콘드리아 밖으로 다시 유출된 것을 나타내며, 이 Ca²⁺ 유출은 주변부 세포질 Ca²⁺의 증가뿐만 아니라 내부의 Ca²⁺을 증가시킬 수 있다.

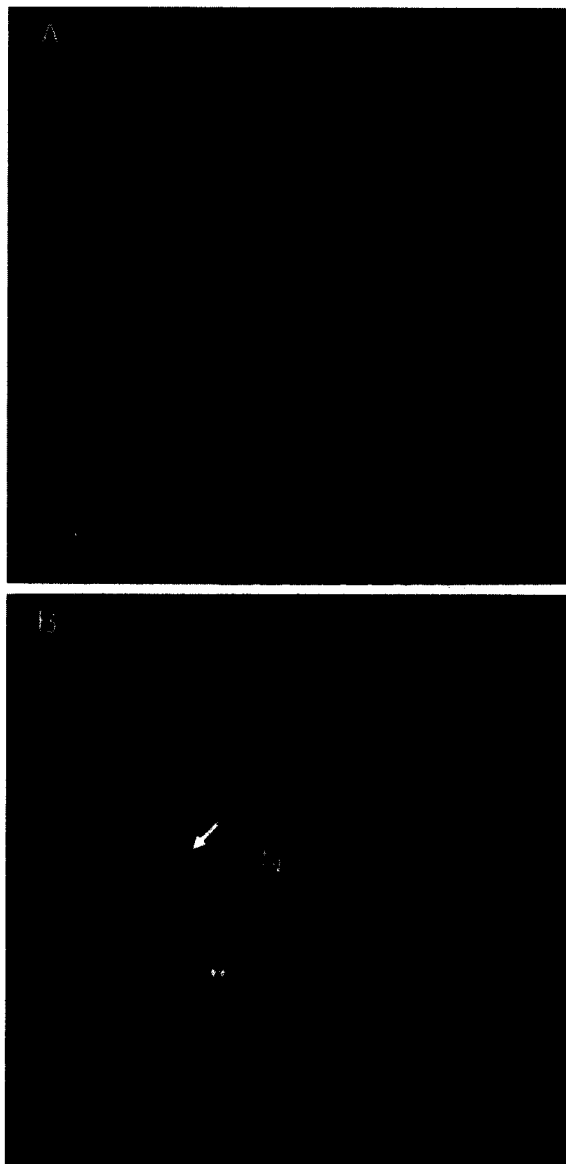


Fig. 4 – Regular arrangement of mitochondria within the atrial myocyte. (A) Lower trace indicates fluorescence intensity measured by transverse line scanning (see the single straight line). Mitochondria were aligned in a longitudinal direction with 2-μm interval throughout the cytoplasm except nucleus. (B) Lower traces indicate fluorescence intensities measured by longitudinal line scanning (see the two straight lines). Note that the signal is denser around the nucleus ("N"). In each 2-μm domain mitochondrial signal was divided by double peaks.

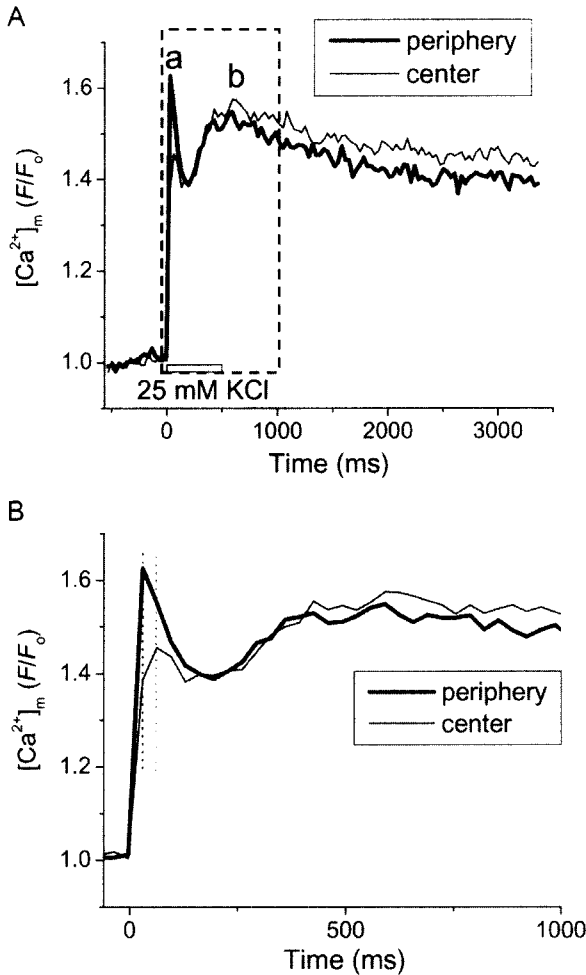


Fig. 5 - Effect of high K⁺ pulse on mitochondrial Ca²⁺ in rat atrial myocyte. (A) Peripheral and central Ca²⁺ transients measured from 2-D Rhod-2 confocal fluorescence images (30 Hz). (B) Expanded recording of Ca²⁺ transients for the time marked by the box in panel (A).

특히 주변부 [Ca²⁺]_m의 감소 폭이 현저히 큰데 이는 초기 uptake 양이 많은 것과 관련이 있을 것이다. 이차적으로 느리게 일어나는 [Ca²⁺]_m의 증가는 이차적인 세포질 Ca²⁺ 증가에 기인할 것이다. 실제 활동전위 지속기에 상응하는 생리학적 조건에서는 1 단계로 빠르게 일어나는 [Ca²⁺]_m transient(Fig. 5Aa)만 해당된다. 250 ms 탈분극 후 변하는 [Ca²⁺]_m은 지속되는 탈분극에 의해 주로 작동하는 세포막 Na⁺-Ca²⁺ exchanger에 의한 Ca²⁺ 유리 과정일 가능성이 가장 크다.

결 론

본 연구 결과는 심방 근세포의 흥분-수축 연결과정(excitation-contraction coupling) 시 일어나는 Ca²⁺ 신호전달 과정을 SR RyRs뿐만 아니라 IP₃R가 조절하고 있다는 증거이며, 심방 근세

포 내 Ca²⁺ 증가가 미토콘드리아에 의해 조절되고 있음을 또한 보여준다. 세포 내부 전면에 분포하는 근섬유의 일률적인 수축이 곧 심근의 수축력을 결정하기 때문에 심방 세포 내부 Ca²⁺ 증가는 심근의 수축력에 직접적인 영향을 준다. 본 연구는 심방 근세포에 현저하게 존재하는 IP₃R 및 미토콘드리아가 세포질 Ca²⁺ 증가에 기여하고 있음을 보여주고 있다. 이러한 새로운 Ca²⁺ 조절 기전은 IP₃R와 미토콘드리아의 중요한 생리학적 기능을 보여 줄 뿐만 아니라 심장 부전의 새로운 발병 기전일 수 있으므로, 심장질환 약물 개발에 대한 새로운 표적 분자로써의 응용 가치를 가질 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었으며(KRF-2003-042-E00009), 이에 감사드립니다. 공춧점 현미경 시스템을 제공하여준 한국기초과학지원연구원(KBSI)과, 사 용을 자세히 보조해 주신 한국기초과학지원연구원 이지원 박사님께 감사드립니다.

문 헌

- 1) Fabiato, A. : Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* **85**, 291 (1985).
- 2) Barcenas-Ruiz, L. and Wier, W. G. : Voltage dependence of intracellular [Ca²⁺]_i transients in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* **61**, 148 (1987).
- 3) Cannell, M. B., Berlin, J. R. and Lederer, W. J. : Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* **238**, 1419 (1987).
- 4) Nabauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. : Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* **244**, 800 (1989).
- 5) Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. and Ramesh, V. : Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* **77**, 1528 (1999).
- 6) Carl, S. L., Felix, K., Caswell, A. H., Brandt, N. R., Ball, W. J. Jr., Vaghy, P. L., Meissner, G. and Ferguson, D. G. : Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J. Cell. Biol.* **129**(3), 672 (1995).
- 7) Huser, J., Lipsius, S. L. and Blatter, L. A. : Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* **494**(Pt 3), 641 (1996).
- 8) Kockskamper, J., Sheehan, K. A., Bare, D. J., Lipsius, S. L., Mignery, G. A. and Blatter, L. A. : Activation and propagation

- of Ca^{2+} release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys. J.* **81**(5), 2590 (2001).
- 9) Woo, S. H., Cleemann, L. and Morad, M. : Ca^{2+} current-gated focal and local Ca^{2+} release in rat atrial myocytes: evidence from rapid 2-D confocal imaging. *J. Physiol.* **543**(Pt 2), 439 (2002).
- 10) Mackenzie, L., Bootman, M. D., Laine, M., Berridge, M. J., Thuring, J., Holmes, A., Li, W. H. and Lipp, P. : The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca^{2+} signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J. Physiol.* **541**(Pt 2), 395 (2002).
- 11) Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B. and Thomas, A. P. : Decoding of cytosolic calcium oscillation in the mitochondria. *Cell* **82**, 415 (1995).
- 12) Straub, S. V., Giovannucci, D. R. and Yule, D. I. : Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: Functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J. Gen. Physiol.* **116**, 547 (2000).
- 13) Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-sancho, J. and Alvarez, J. : Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nature Cell Biol.* **2**, 57 (2000).
- 14) Hamil, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**(2), 85 (1981).
- 15) Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B. and Hille, B. : Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J. Cell Biol.* **136**(4), 833 (1997).