

Metabolismo miocardico del calcio nell'insufficienza cardiaca: dalla fisiologia ai nuovi orizzonti terapeutici

Cosma Casaburi, Francesca Di Rella, Giuseppe Riccio, Nicola Angelillo, Gianluca Ettari, Angela Troise, Giuseppe De Simone, Salvatore Longobardi, Serafino Fazio, James P. Morgan*, Antonio Cittadini

Dipartimento di Medicina Clinica, Scienze Cardiovascolari ed Immunologiche, Università degli Studi "Federico II", Napoli, *Division of Cardiology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, USA

Key words:
Heart failure;
Calcium handling;
Gene therapy.

Development of heart failure is associated with an impairment of intracellular calcium handling. The precise mechanisms involved are still obscure. When membrane depolarization occurs, a small amount of extracellular calcium enters the intracellular milieu through the L-type channels. Such "trigger" calcium acts on specific receptors of the sarcoplasmic reticulum, that, in turn, according to the so-called calcium entry-calcium release mechanism, allows the release of a larger amount of calcium from the sarcoplasmic reticulum. Removal of calcium from the cytosol is the key event of the diastolic phase. Calcium removal from cytosol occurs through specific membrane pumps. Recent therapeutic approaches involving gene targeting of calcium pumps have yielded promising results. Specifically, increased levels of SERCA 2 in the myocardium have shown to enhance cardiac contractility under normal circumstances and in experimental heart failure. Future research is needed to confirm these findings in human heart failure.

(Ital Heart J Suppl 2000; 1 (6): 766-771)

Ricevuto il 28 febbraio 2000; nuova stesura il 12 aprile 2000; accettato il 14 aprile 2000.

Per la corrispondenza:

Dr. Antonio Cittadini

III Divisione di
Medicina Interna
Università degli Studi
"Federico II"
Via S. Pansini, 5
80131 Napoli
E-mail: cittadin@unina.it

Sia in modelli sperimentali che nell'uomo, lo sviluppo di insufficienza cardiaca si associa ad una serie di modificazioni nei meccanismi subcellulari che regolano i livelli intracellulari di calcio¹. Si assiste infatti a cambiamenti di tipo, di numerosità ed affinità dei recettori presenti sulla membrana, ad alterazioni strutturali dei canali ionici, della pompa del calcio del reticolo sarcoplasmatico (RS), nonché ad alterazioni strutturali degli stessi elementi contrattili. I meccanismi molecolari che sono alla base di tali eventi sono tuttora ancora da chiarire, così come nessuno studio ha potuto identificare come causa unica e definitiva della disfunzione contrattile, cui si assiste nello scompenso cardiaco, nessuna di queste modificazioni.

Accoppiamento eccitazione-contrazione

Il processo di eccitazione-contrazione (Fig. 1) ha inizio con la depolarizzazione della membrana cellulare che permette, durante la fase di *plateau* del potenziale d'azione cardiaco, ad una piccola quota di calcio *trigger* di entrare nella cellula, prevalentemente attraverso i canali del Ca²⁺ di tipo L.

Il calcio *trigger* agisce sulle riserve intracellulari di calcio, stipato in massima parte nel RS, inducendo il rilascio di quantità maggiori di calcio. Il fatto che il calcio che entra attraverso i canali di tipo L sia la molla per il rilascio di altro calcio dal RS rappresenta un paradosso. Infatti non si riusciva a spiegare come lo stesso calcio rilasciato dal RS non potesse funzionare esso stesso da *trigger*, stimolando ulteriore liberazione di calcio dal RS. L'introduzione della microscopia laser a scansione confocale e lo sviluppo degli indicatori fluorescenti sensibili al calcio hanno reso possibile misurare l'elevazione del calcio locale non propagantesi (Ca²⁺ *sparks*) a livello dei singoli sarcomeri²; esso rappresenta il rilascio di calcio da uno o più gruppi di canali del RS (*ryanodine receptors*). Tali scoperte hanno reso possibile elaborare l'ipotesi del controllo locale dell'accoppiamento elettromeccanico del cuore^{3,4}. Secondo questa ipotesi esiste uno spazio ristretto attraverso cui il calcio penetra il sarcolemma e causa il rilascio di calcio attraverso i *ryanodine receptors* situati nell'adiacente RS giunzionale. In altre parole il rilascio di calcio dal RS è controllato da eventi localizzati nella re-

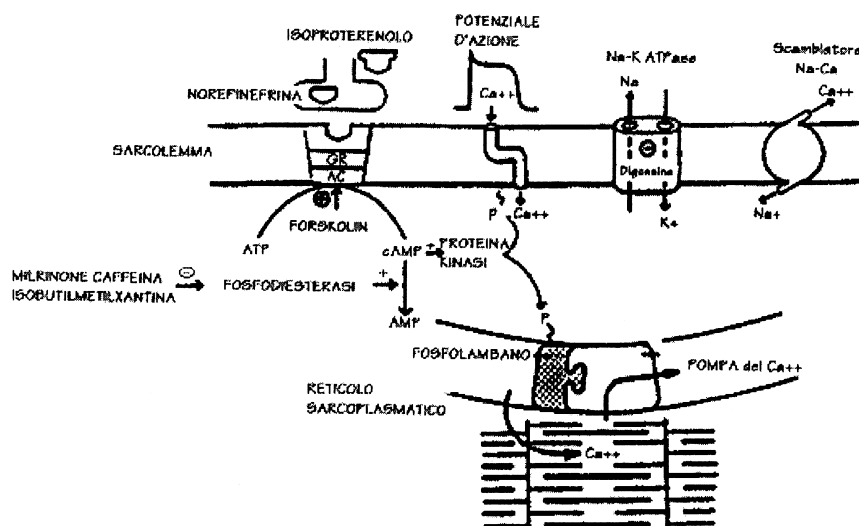


Figura 1. Nel cuore di mammifero, l'accoppiamento eccitazione-contrazione inizia con la depolarizzazione che permette al Ca^{2+} trigger di entrare nei miociti attraverso i canali localizzati nel sarcolemma. Questo Ca^{2+} trigger permette il rilascio di una grande quantità di Ca^{2+} dai depositi intracellulari contenuti nel reticolo sarcoplasmatico. Il Ca^{2+} rilasciato interagisce con la troponina C del complesso regolatorio sui miofilamenti per iniziare la contrazione cardiaca; il rilascio inizia quando il Ca^{2+} si dissocia dall'apparato contrattile ed è sequestrato dalla pompa del calcio energia-dipendente del reticolo sarcoplasmatico. L'omeostasi del Ca^{2+} è mantenuta attraverso i meccanismi del sarcolemma che estrudono Ca^{2+} nello spazio extracellulare che includono lo scambiatore sodio-calcio ed una pompa Ca^{2+} energia-dipendente (non mostrata). L'evento eccitatorio iniziale della depolarizzazione della membrana è anche associato all'ingresso del Na^+ , che è infine espulso dalla pompa Na^+-K^+ energia-dipendente (ATPasi) o dallo scambiatore sodio-calcio, che non sembra richiedere ATP. Ciascuno di questi passaggi rappresenta un potenziale sito d'azione per i farmaci inotropi.

gione dei *ryanodine receptors* dello stesso RS e questi eventi sono molto diversi da quelli che possono essere osservati nella cellula *in toto*.

Il calcio liberato nel citoplasma interagisce con i miofilamenti, inducendo la contrazione cardiaca (per un'approfondita descrizione degli eventi si rimanda il lettore a testi specifici). L'incremento della concentrazione di calcio citosolico è immediatamente seguito dalla rimozione del calcio stesso che causa la susseguente disattivazione del sistema contrattile e il rilasciamento del miocardio.

Sistemi di rimozione del calcio dal citosol

La rimozione del calcio dal citosol avviene attraverso l'attivazione di: 1) pompa del RS; 2) scambio Na^+/Ca^{2+} posto sul sarcolemma; 3) pompa mitocondriale; 4) pompa del calcio della membrana plasmatica.

Bers⁵ ha dimostrato che nel miocardio ventricolare di ratto circa il 92% del calcio viene rimosso attraverso la pompa del RS e solo il 7% attraverso lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} . Lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} localizzato a livello del sarcolemma sembra essere la principale via attraverso cui viene espulso il calcio *trigger* che entra nella cellula ad ogni battito cardiaco. Esso opera nei confronti di un gradiente di concentrazione del sodio provvedendo a scambiare 3 Na^+ per 1 Ca^{2+} per cui quando opera con direzione verso l'esterno è in grado di espellere Na^+ e creare un potenziale negativo all'interno della cellula. I processi che aumentano le concentrazioni intracellulari di Na^+ , come ad esempio avviene nell'inibizione dell'ATPasi Na^+/K^+ operata dalla digos-

sina, aumentano l'ingresso del calcio all'interno della cellula grazie all'attivazione di questo meccanismo di scambio ionico⁶. Evidenze sperimentali suggeriscono che questo scambiatore può operare con direzione verso l'esterno o verso l'interno a seconda della fase del ciclo cardiaco: favorisce l'efflusso di calcio dalla cellula durante la diastole mentre ne favorisce l'entrata nella cellula durante la sistole.

La funzione della pompa del calcio posta sul sarcolemma è stata valutata da un recente studio di Hammes et al.⁷. Si tratta di una pompa calcio-ATPasi calmodulina-dipendente (PMCA), presente anche su cellule non eccitabili. Ne sono state clonate quattro diverse isoforme di cui tre sembrano essere espresse sul tessuto miocardico. La PMCA non ha omologia con la Ca^{2+} -ATPasi del RS. Hammes et al. hanno costituito una linea di ratti transgenici che "overesprimono" la PMCA in cui però non si sono evidenziate differenze significative nei parametri emodinamici rispetto al gruppo di controllo. Questi dati confermano che la PMCA non contribuisce significativamente all'eliminazione del calcio nei miociti cardiaci. È stato invece notato un incremento della sintesi proteica nei miociti neonatali dei ratti transgenici; ciò potrebbe indicare che la PMCA è implicata nei processi che regolano la crescita cellulare.

Uno scambiatore non direttamente implicato nel metabolismo intracellulare del Ca^{2+} , che però rappresenta uno dei più importanti sistemi di trasporto della membrana del cardiomiocita è la pompa Na^+/K^+ ATPasi. Il gradiente che essa genera gioca un ruolo centrale nel mantenere la composizione cellulare ed indirettamente partecipa nella regolazione della contrattilità. Il ruolo diretto della pompa è quello di ripulire il ci-

tosol dalla piccola quantità di Na^+ che entra nella cellula ad ogni potenziale d'azione, controllando così la concentrazione intracellulare di Na^+ che costituisce un fattore determinante nel regolare la contrattilità del miocita⁸.

Secondi messaggeri coinvolti nel metabolismo miocardico del calcio

Oltre al calcio, esistono all'interno del miocita altri sistemi di secondi messaggeri che svolgono un ruolo importante nella modulazione dei livelli intracellulari di calcio, tra cui i più importanti sono costituiti dall'adenosin-monofosfato ciclico, dall'inositol-fosfato e dal diacilglicerolo^{9,10}. L'adenosin-monofosfato ciclico modula i livelli intracellulari di Ca^{2+} attraverso l'attivazione di una proteinchinasi (cA chinasi)¹¹. Nel cuore, i siti di fosforilazione del sarcolemma, nel RS e nel complesso regolatore troponina-tropomiosina, hanno un profondo effetto sia sulle concentrazioni sistoliche che diastoliche di Ca^{2+} . La fosforilazione dei canali del calcio di tipo L, voltaggio-dipendenti, del sarcolemma aumenta l'ingresso del calcio ionizzato durante la depolarizzazione. Contemporaneamente, la cA chinasi fosforila il fosfolambano, la subunità regolatrice della pompa del calcio che si trova a livello del RS, aumentando la ricaptazione degli ioni Ca^{2+} ¹². La fosforilazione del complesso troponina-tropomiosina riduce invece l'affinità della troponina C per il calcio e facilita la dissociazione del complesso Ca^{2+} -troponina C¹³. La fosforilazione del fosfolambano e della troponina I aumenta invece la velocità del rilasciamento diastolico del cuore. L'attività della chinasi A varia da battito a battito con il massimo durante la sistole¹⁴.

Meccanismi di regolazione della performance cardiaca: *upstream* e *downstream*

La performance contrattile del cuore può essere regolata attraverso i seguenti meccanismi: a) meccanismi

upstream che agiscono sulla quantità e sul tempo di permanenza del Ca^{2+} transitorio e/o modificando l'affinità della troponina C per il Ca^{2+} ; b) meccanismi *downstream* che alterano la responsività dei miofilamenti al complesso troponina C- Ca^{2+} ^{1,15}. L'importanza clinica di questa distinzione è dimostrata da due esempi di insufficienza cardiaca acuta. La figura 2 illustra gli effetti dell'ipossia e, dopo un periodo di recupero, dell'ischemia sullo stesso preparato di cuore isolato e perfuso. Nei grafici A e B sono rappresentati la concentrazione di calcio intracellulare, la pressione ventricolare sinistra e la pressione di perfusione coronarica. L'ipossia è stata ottenuta sostituendo nel perfusato l'ossigeno con l'azoto. Essa viene seguita da un decremento dei livelli sistolici e da un incremento dei livelli telediastolici di calcio. Queste modificazioni nei livelli di calcio sono associate ad una diminuzione della pressione generata dal ventricolo sinistro durante il picco sistolico e ad un incremento della pressione telediastolica. Poiché le modificazioni funzionali (per esempio la pressione ventricolare sinistra) sembrano essere conseguenza dei cambiamenti nei livelli di calcio, è possibile definire la risposta all'ipossia come un effetto calcio-dipendente (meccanismo *upstream*). Al contrario, quando il cuore è reso ischemico, "clampando" il flusso coronarico, si verifica una risposta del tutto diversa. Nonostante i livelli intracellulari di calcio raggiungano valori molto alti, la performance sistolica del ventricolo sinistro si deteriora progressivamente e la pressione telediastolica non si modifica significativamente dopo che l'iniziale perdita del turgore coronarico produce una rapida caduta nella pressione telediastolica. Nel caso dell'ischemia, quindi, le modificazioni dei livelli di calcio intracellulare non appaiono associate a cambiamenti nella funzione sistolica e diastolica ventricolari. Pertanto, l'ischemia è una situazione in cui i meccanismi *downstream* predominano; probabilmente ciò riflette la riduzione della sensibilità dei miofilamenti al calcio dovuta verosimilmente all'aumento del fosfato inorganico derivato dalla scissione dell'ATP ed all'acidosi che in questo caso si sviluppa rapidamente.

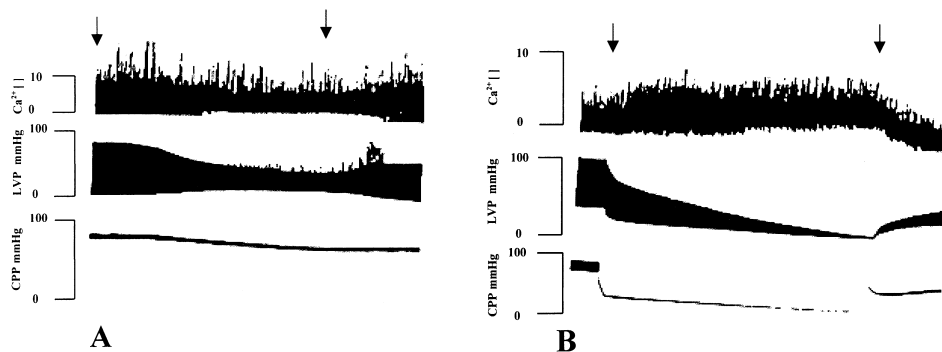


Figura 2. Registrato da un buffer di cuore isolato e perfuso a 30°C stimolato a 125-130 b/min. Registrazione simultanea del transito intracellulare di calcio (grafico in alto), pressione ventricolare sinistra isovolumetrica (grafico al centro) e pressione di perfusione coronarica (grafico in basso) durante 5 min di ipossia seguiti da riossigenazione (A) o 3 min di ischemia globale seguiti da riperfusione (B). Da notare che il calcio intracellulare e la pressione ventricolare sinistra appaiono collegati nell'ipossia ma non nell'ischemia. Le frecce indicano l'inizio rispettivamente dell'ischemia e della riperfusione. CPP = pressione di perfusione coronarica; LVP = pressione ventricolare sinistra.

Tra le molecole biologiche che agiscono sulla funzione contrattile del cuore agendo con un meccanismo *downstream* vi è l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1). Esso è il mediatore di molti degli effetti dell'ormone della crescita sui tessuti periferici, miocardio compreso¹⁶. Dati sperimentali¹⁷ hanno dimostrato che l'effetto inotropo dell'IGF-1 non è associato all'incremento della concentrazione del calcio transitorio; al contrario c'è una significativa riduzione del picco sistolico in assenza di significative modificazioni delle concentrazioni diastoliche di Ca^{2+} (Fig. 3). Verosimilmente l'IGF-1 esplica la sua azione sia aumentando l'affinità della troponina C per il Ca^{2+} e sia aumentando l'affinità dei miofilamenti per il complesso troponina- Ca^{2+} (meccanismo *downstream*).

Alterazioni dei meccanismi di modulazione del metabolismo miocardico del calcio nell'insufficienza cardiaca

L'insufficienza cardiaca è associata ad una serie di alterazioni strutturali e biochimiche che influenzano il metabolismo miocardico del Ca^{2+} e che a loro volta possono spiegare le modificazioni della performance cardiaca che si evidenziano in questa patologia^{1,18}. A livello della membrana plasmatica del cardiomiocita sono state segnalate anomalie nel numero e della funzione sia dei recettori adrenergici¹⁹ che dei canali voltaggio-dipendenti del calcio. Sul RS vi è una riduzione della densità dei siti per la ricaptazione del calcio, così come risultano alterati i meccanismi che regolano il rilascio di calcio dallo stesso RS. Questi dati sono supportati da studi effettuati utilizzando indicatori fluorescenti della concentrazione intracellulare di calcio (aequorina) che hanno dimostrato che con lo sviluppo di insufficienza cardiaca vi è una diminuzione del picco di calcio intracellulare disponibile per la contrazione¹⁸.

Anche studi di biologia molecolare hanno confermato i dati prima esposti. Vi è, infatti, con lo sviluppo di insufficienza cardiaca, una minore espressione del gene che codifica per la pompa del calcio del RS (-50% dell'mRNA rispetto a cuori di controllo)²⁰. È stata inoltre riportata una drastica riduzione del fosfolambano (-25% dell'mRNA) che procede parallelamente con la riduzione della RS Ca^{2+} -ATPasi¹⁹. I dati riguardanti l'espressione dei *ryanodine receptors* non sono univoci: in studi effettuati su animali da esperimento, si è vista una diminuzione della densità dei recettori²¹ che non è confermata da misurazioni effettuate nello scompenso cardiaco umano, in cui vi è una diminuzione del contenuto di mRNA (-28%) senza apprezzabili variazioni della quantità di proteina^{22,23}.

Ricapitolando, le proteine coinvolte nella mobilizzazione del calcio dal RS sono "downregolate" in parallelo, suggerendo che l'attività del RS è mantenuta ridotta per fenomeni adattativi. In contrasto, durante lo stadio finale dell'insufficienza cardiaca, è stato propo-

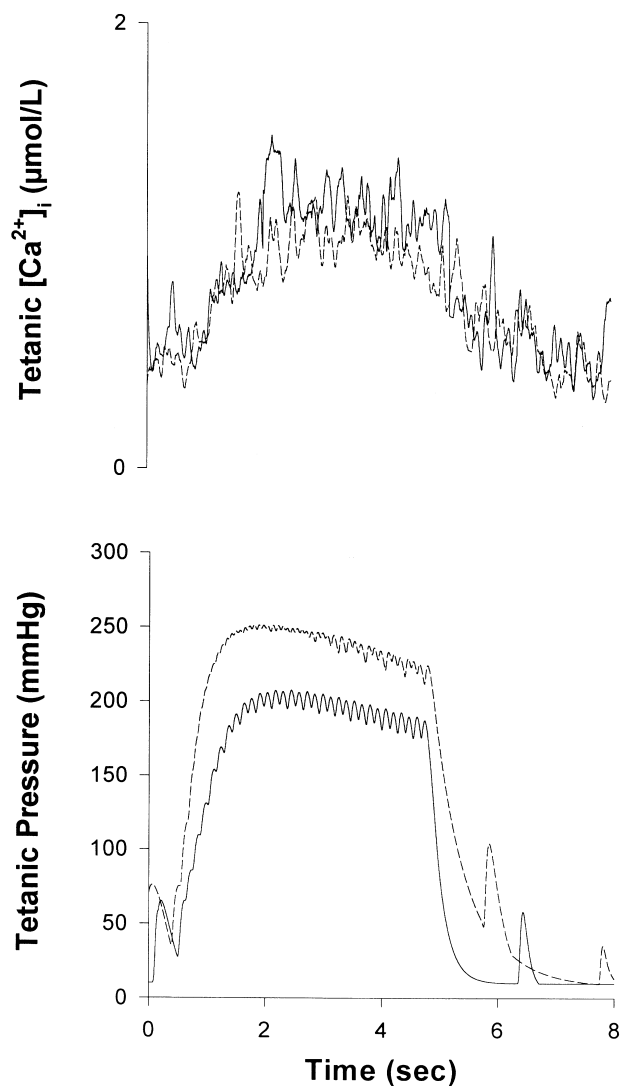


Figura 3. Rappresentazione del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tetanico (in alto) e della pressione tetanica (in basso) nei cuori perfusi con *insulin-like growth factor-1* (linea tratteggiata) e nei controlli (linea continua). La tetania è stata indotta con 4 s di stimolazione elettrica a 15 Hz con un'ampiezza di 50 ms. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nel perfusato era 6.0 mmol/L.

sto che, in seguito a modifiche ormonali, vi sia una normale concentrazione di *ryanodine receptors*, che però non è compensata dal parallelo aumento della concentrazione della pompa del calcio del RS.

Nuove frontiere terapeutiche: terapia genica

Un nuovo approccio per il trattamento dello scompenso cardiaco potrebbe essere la stimolazione dell'attività della pompa del Ca^{2+} del RS, incrementando così il carico di calcio di questo organello, ottenendo un miglioramento sia della funzione sistolica che di quella diastolica. L'attività della pompa è inibita dal fosfolambano e questa inibizione è revertita dalla fosforilazione del fosfolambano da parte della proteinchinasi A o dalla chinasi Ca^{2+} calmodulina-dipendente. Per questo mo-

tivo interventi che determinino un incremento della fosforilazione del fosfolambano, una diminuzione dei livelli di fosfolambano, o che inibiscano l'interazione fosfolambano-pompa potrebbero essere promettenti possibilità terapeutiche per il trattamento dello scompenso cardiaco. Alternativamente la funzione nell'insufficienza miocardica potrebbe essere migliorata "overesprimendo" la pompa del calcio del RS. La calcio-ATPasi del RS è codificata da tre geni, ne esistono cinque diverse isoforme: l'isoforma del muscolo scheletrico dell'adulto (SERCA 1a) e la sua alternativa neonatale (SERCA 1b), l'isoforma a lento *twitch* cardiaco/muscolo scheletrico (SERCA 2a) e la sua alternativa muscolo striato/forma non muscolare ed una isoforma espressa in una grande varietà di tessuti (SERCA 3). La strategia per migliorare la contrattilità attraverso l'"overespressione" di SERCA è supportata dai dati di He et al.²⁴ che hanno realizzato dei topi transgenici che "overesprimono" SERCA 2 grazie al trasferimento adenovirus-mediato²⁵ del gene di SERCA 2a in miociti cardiaci di ratti neonati. Tale condizione era associata ad un moderato miglioramento della funzione contrattile e di rilasciamento sia nell'animale *in toto* che in miociti isolati. Inoltre Loukianov et al.²⁶ hanno dimostrato che in ratti transgenici che "overesprimono" specificamente SERCA 1a regolata dal promotore cardiaco-specifico della catena pesante dell' α -miosina²⁷ vi era un incremento di 2.5 volte dei livelli della pompa del calcio del RS ed un incremento di 1.7 volte della velocità massima di uptake del calcio. In tali animali transgenici a dispetto dell'incremento totale dei livelli di SERCA, l'espressione di SERCA 2a endogeno era ridotta del 50%, indicando che il SERCA 1a esogeno può sostituire il SERCA 2a endogeno. Ciò può essere spiegato dalla grande omologia strutturale esistente tra le due isoforme. Questi studi sono però limitati dall'assenza del fosfolambano e di altre proteine regolatorie che agiscono in maniera similare sulle diverse isoforme di SERCA.

È importante inoltre tenere presente che il miocardio dei ratti e dei topi è considerevolmente diverso da quello umano per ciò che riguarda l'accoppiamento eccitazione-contrazione e per le diverse isoforme delle proteine contrattili. In particolare il miocardio del topo appare più tollerante al sovraccarico di calcio rispetto ad altre specie. È però indubbio che avendo i disturbi del metabolismo del calcio un ruolo significativo nella fisiopatologia dello scompenso cardiaco, una "overespressione" di SERCA e verosimilmente di altre pompe del calcio possa influenzare positivamente il metabolismo del calcio miocardico ottenendo così un miglioramento della funzione cardiaca.

Riassunto

Lo sviluppo di insufficienza cardiaca si associa ad una serie di modificazioni dei meccanismi subcellulari che regolano i livelli intracellulari di calcio. I meccani-

smi che sono alla base di tali eventi però sono tuttora ancora da chiarire. La depolarizzazione della membrana permette attraverso i canali di tipo L ad una piccola quantità di calcio di entrare nella cellula. Questo agisce su specifiche aree del reticolo sarcoplasmatico causando la liberazione di una quantità maggiore dello stesso calcio. Dopo la contrazione della cellula, l'evento chiave per la disattivazione del sistema contrattile è la rimozione del calcio dal citosol. Ciò avviene con l'attivazione di una serie di pompe che a seconda della loro ubicazione e tipo espellono calcio nello spazio extracellulare o (modalità prevalente) lo immagazzinano nel reticolo sarcoplasmatico. Meccanismi che quindi agiscono sulla quantità e sul tempo di permanenza del calcio transitorio e/o che modificano l'affinità dello stesso calcio per le varie proteine del sistema contrattile possono quindi influenzare la performance cardiaca. In prospettiva futura, quindi interventi che determinino un aumento del calcio disponibile per la contrazione, ad esempio incrementando i livelli di SERCA 2 nel miocardio, potrebbero essere promettenti possibilità terapeutiche per il trattamento dello scompenso cardiaco.

Parole chiave: Scompenso cardiaco; Metabolismo del calcio; Terapia genica.

Bibliografia

1. Morgan JP. Mechanisms of disease. Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N Engl J Med* 1991; 325: 625-32.
2. Cheng H, Lederer WJ, Cannel MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 1993; 262: 740-4.
3. Santana LF, Cheng H, Gómez AM, Cannel MB, Lederer WJ. Relation between the sarcolemmal Ca^{2+} current and Ca^{2+} -sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res* 1996; 78: 166-71.
4. Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* 1992; 63: 497-517.
5. Bers DM. Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. In: Hasenfus G, Just H, eds. Alterations of excitation-contraction coupling in the failing human heart. New York, NY: Springer-Verlag, 1998: 1-16.
6. Eisner DA, Smith TW. The Na-K pump and its effectors in cardiac muscle. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. The heart and cardiovascular system. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1992: 863-902.
7. Hammes A, Oberdorf-Maass S, Rother T, et al. Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats. *Circ Res* 1998; 83: 877-88.
8. Sheu S-S, Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and control of cell calcium and contractility in cardiac and vascular smooth muscles. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. The heart and cardiovascular system. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1992: 903-43.
9. Katz AM. Interplay between inotropic and lusitropic effects of cyclic adenosine monophosphate on the myocardial cell. *Circulation* 1990; 82 (Suppl): I7-I11.
10. Williamson JR, Monch JR. Second messengers of inositol lipid metabolism and Ca^{2+} signaling. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. The

- heart and cardiovascular system. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1992: 1729-44.
11. Snabb JB, Corbin JD. Protein phosphorylation in the heart. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. The heart and cardiovascular system. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1992: 1539-62.
 12. Tada M, Kirchberger MA, Katz AM. Phosphorylation of a 22 000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1975; 250: 2640-7.
 13. Katz AM. Cyclic adenosine monophosphate effects on the myocardium. A man who blows hot and cold with one breath. *J Am Coll Cardiol* 1993; 2: 143-9.
 14. Krause E-G, Bartel S, Beyerdorfer I, et al. Transient changes in cyclic AMP and in the enzymic activity of protein kinase and phosphorylase during the cardiac cycle in the canine myocardium and the effect of propranolol. *Mol Cell Biochem* 1989; 89: 181-6.
 15. Blinks JR, Endoh R. Modification of myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} as an inotropic mechanism. *Circulation* 1986; 73: 85-98.
 16. Saccà L, Cittadini A, Fazio S. Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 1994; 15: 555-73.
 17. Cittadini A, Ishiguro Y, Strömer H, et al. Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca^{2+} through a wortmannin-sensitive pathway. Studies in rat and ferret isolated muscles. *Circ Res* 1998; 83: 50-9.
 18. Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossmann W, Gwathmey JK. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 1990; 81: III21-III32.
 19. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, et al. β -adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990; 82: I12-I25.
 20. Linck B, Boknik P, Eschenhagen T, et al. Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR- Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 625-32.
 21. Matsui H, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rabbit. *Am J Physiol* 1995; 268: C252-C258.
 22. Go LO, Moschella LC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1995; 95: 888-94.
 23. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92: 778-84.
 24. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, et al. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 1997; 95: 423-9.
 25. Giordano FJ, He H, McDonough P, Meyer M, Sayen MR, Dillmann WH. Adenovirus-mediated gene transfer reconstitutes depressed sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transients. *Circulation* 1997; 96: 400-3.
 26. Loukianov E, Ji Y, Grupp IL, et al. Enhanced myocardial contractility and increased Ca^{2+} transport function in transgenic hearts expressing the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Circ Res* 1998; 83: 889-97.
 27. Inesi G, Lewis D, Sumbilla C, et al. Cell-specific promoter in adenovirus vector for transgenic expression of SERCA1 ATPase in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1998; 274: C645-C653.