

---

**I recettori dell'angiotensina**  
**Dalla biologia molecolare**  
**alla terapia con gli antagonisti recettoriali**

Raffaello Buoninconti

Raffaello Buoninconti

# **I recettori dell'angiotensina**

**Dalla biologia molecolare  
alla terapia  
con gli antagonisti recettoriali**

RAFFAELLO BUONINCONTI  
Professore Associato fr  
Facoltà di Medicina  
Seconda Università degli Studi di Napoli

ISBN 978-88-470-0566-2

Springer fa parte di Springer Science+Business Media  
springer.com  
© Springer-Verlag Italia 2007

Quest'opera è protetta dalla legge sul diritto d'autore. Tutti i diritti, in particolare quelli relativi alla traduzione, alla ristampa, all'uso di figure e tabelle, alla citazione orale, alla trasmissione radiofonica o televisiva, alla riproduzione su microfilm o in database, alla diversa riproduzione in qualsiasi altra forma (stampa o elettronica) rimangono riservati anche nel caso di utilizzo parziale. Una riproduzione di quest'opera, oppure di parte di questa, è anche nel caso specifico solo ammessa nei limiti stabiliti dalla legge sul diritto d'autore, ed è soggetta all'autorizzazione dell'Editore. La violazione delle norme comporta sanzioni previste dalla legge.

L'utilizzo di denominazioni generiche, nomi commerciali, marchi registrati, ecc., in quest'opera, anche in assenza di particolare indicazione, non consente di considerare tali denominazioni o marchi liberamente utilizzabili da chiunque ai sensi della legge sul marchio.

In copertina: figura originale dell'autore (v. p. 101)

Progetto grafico della copertina: Simona Colombo, Milano  
Progetto grafico e impaginazione: Rudi Olivi, Signum s.r.l., Bollate (Mi)  
Stampa: Signum s.r.l., Bollate (Mi)

*Stampato in Italia*  
Springer-Verlag Italia Srl, Via Decembrio 28, I-20137 Milano

*ad Angela*

*“Almost all aspects of the life are engineered at the molecular level, and without understanding molecules, we can only have a very sketchy understanding of life itself”*

Francis Crick  
Of Molecules and Men - 1966

*“In medicine, the final test of the usefulness of an idea is its effect on therapy”*

G. Pickering  
1961

## Ringraziamenti

Se (come spero) sono riuscito a raccogliere in una unica trattazione i lavori più importanti finora pubblicati sul SRA, il merito va anche a tutti coloro che con pazienza mi hanno aiutato nella difficile ricerca di voci bibliografiche introvabili, di fotocopie e di collegamenti in rete.

In particolare desidero ringraziare:

la Sig.ra Sbordone Castillett e le sue collaboratrici della biblioteca centralizzata della Facoltà di Medicina (SUN);

il Dr. Scielzo, bibliotecario dell'Istituto di Clinica Medica (SUN);

la Sig.ra Faller e le sue collaboratrici della biblioteca della Stazione Zoologica A. Dohrn.

La mia sincera affettuosa gratitudine va anche ai miei figli Mario e Roberto, che con la loro conoscenza del computer hanno trasformato la mia incomprensibile grafia in un testo chiaro e leggibile e hanno tradotto in immagini comprensibili qualche mia ipotesi personale.

Infine, non posso dimenticare le Dr. Hofmann, Rizza e Born, che hanno validamente contribuito a risolvere i tanti problemi editoriali, ed hanno dato anche a questo mio nuovo lavoro una veste degna delle tradizioni di Springer.

# Introduzione

La storia del Sistema Renina-Angiotensina (SRA), che si sarebbe sviluppata tumultuosamente durante tutto il XX secolo, inizia nel 1898, con la pubblicazione di un lavoro intitolato semplicemente “Rene e Circolazione”, nel quale gli AA, fisiologi dell’Università di Stoccolma (Tigerstedt e Bergman 1898) descrivevano le proprietà ipertensivanti di una sostanza da essi identificata in un estratto salino del rene di coniglio e pertanto denominata Renina (R) (“... *there is indeed a substance in the kidney that causes increase in blood pressure by means of vascular contractions*”).

Nello stesso lavoro i due ricercatori avanzavano anche l’ipotesi che questa sostanza fosse responsabile dell’ipertrofia miocardica osservata nelle malattie renali e che un’eccessiva produzione di essa fosse dannosa per l’apparato cardiovascolare<sup>1</sup>.

Pur non avendo suscitato molto interesse negli ambienti scientifici dell’epoca, la scoperta della R apriva comunque un capitolo nuovo nella medicina del 19° secolo e quindi avrebbe meritato ulteriori ricerche per definire meglio la struttura e le funzioni di questa sostanza. Invece, dopo quel primo lavoro i due AA abbandonarono l’argomento e lasciarono Stoccolma per dedicarsi ad attività completamente diverse: Tigerstedt (che intanto era ritornato nella sua patria d’origine, la Finlandia) a ricerche sul metabolismo, e Bergman alla professione medica nella città di Malmo (Aurell 1998; Phillips e Schmidt-Otto 1999).

Indipendentemente dai motivi che lo determinarono<sup>2</sup>, il comportamen-

<sup>1</sup> “We would like to point out, however, that we do not put forward a new hypothesis concerning renal disease and hypertrophy of the heart because that would require many experiments. We would only suggest a role for this pressure-elevating substance from the kidney” (Tigerstedt e Bergman 1898).

<sup>2</sup> Tra i tanti motivi invocati per spiegare il comportamento di Tigerstedt vi è quello patriottico, ossia il suo desiderio di ritornare in Finlandia (in quel tempo sotto il dominio russo), ove egli si dedicò attivamente anche alla cura dei prigionieri di guerra; oppure quello “opportunistico” e cioè che il lavoro sulla Renina gli servisse solo come presentazione al Congresso di Medicina di Mosca, del quale egli era stato eletto presidente. Un’altra spiegazione potrebbe essere l’accoglienza piuttosto fredda, a volte addirittura critica, che la comunità scientifica dell’epoca riservò al suo lavoro e che durò a lungo, tanto che ancora nel 1933 Starling non lo citò nel suo trattato di fisiologia (Phillips e Schmidt-Otto 1999).

to di Tigerstedt rimane comunque difficile da spiegare, perché da un lato egli continuò a citare il suo lavoro fino al 1923 in tutte le 10 edizioni del suo trattato di fisiologia (quindi era consapevole della sua importanza), ma dall'altro non si interessò più dell'argomento, probabilmente perché non intuì che la Renina da lui scoperta era soltanto il primo passo per l'identificazione di un sistema biologico, il SRA, fondamentale per il controllo dell'omeostasi nella maggior parte degli organismi viventi.

Programmato milioni d'anni fa, quando questi organismi passarono dall'acqua alla terraferma e dovettero quindi sviluppare nuovi meccanismi per adattarsi al nuovo *habitat* (Henderson e coll. 1993; Nishimura 2004), questo sistema ha infatti il compito di conservare il patrimonio idrico-elettrolitico e di mantenere la perfusione adeguata alle esigenze dei vari organi: quindi è a tutti gli effetti un sistema indispensabile per la sopravvivenza - ("*survival system*") (Sealey e Laragh 1995).

In particolari condizioni fisiopatologiche e per effetto di meccanismi non sempre identificabili, tale sistema può tuttavia non rispondere più al *feedback* che normalmente arresta il suo funzionamento quando l'omeostasi cardiocircolatoria e idrico-elettrolitica si sono normalizzate, per cui esso continua a funzionare in misura sproporzionata alle esigenze dell'organismo, ed i suoi effetti finiscono per danneggiare proprio quegli organi (cervello, cuore e vasi, reni) dei quali esso dovrebbe preservare la funzione (Unger 2002).

Questi effetti – che possono essere pertanto benefici o dannosi, a seconda del modo in cui lavora il sistema – si realizzano grazie ad una complessa organizzazione strutturale e funzionale, in quanto:

- 1) esistono due SRA, uno circolante ed uno tessutale (Dzau 1988)<sup>3</sup>, quest'ultimo definito anche con il termine di "*local angiotensin generating system*" (Danser 2004) perché la sua sintesi sembra legata ad uno o più componenti (renina e/o prorenina) provenienti dalla circolazione. I due sistemi sono strettamente collegati fra loro, ma possono anche funzionare indipendentemente l'uno dall'altro, quello circolante con un meccanismo esocrino e quello tessutale con un meccanismo auto- e/o paracrino (Dzau e Pratt 1993);

<sup>3</sup> Secondo Dzau ("*The Renin Angiotensin System: A Billion years of evolution*": 13<sup>th</sup> Scientific Meeting of the ISH, Montreal 1990) l'esistenza di due SRA – uno locale e l'altro endocrino, ma entrambi capaci di agire sugli stessi organi bersaglio – potrebbe essere spiegata dal punto di vista dell'evoluzione ammettendo che questo processo si sia svolto in tempi diversi per ciascuno dei due sistemi: l'identificazione della R nei vasi renali di alcuni pesci, la cui esistenza sembra risalire a cinquecento milioni d'anni fa, suggerisce che il sistema tessutale è quello primordiale ed è deputato soprattutto al controllo del tono vasale, mentre quello circolante sarebbe comparso più tardi, quando fu necessario fornire agli organismi viventi dei meccanismi di risposta rapida per il controllo cardiovascolare e del volume dei liquidi corporei.

- 2) per funzionare entrambi i sistemi dispongono, oltre che dell'Angiotensina II, anche di alcuni suoi metaboliti (Angiotensina III, Angiotensina IV, Ang-(1-7)) (Ardaillou e Chansel 1998; Campbell 2001), ciascuno dei quali produce effetti biologici altrettanto significativi ed, in alcuni casi, anche opposti a quelli prodotti dalla molecola d'origine;
- 3) all'interno dei due sistemi esistono molteplici siti di legame per questi polipeptidi, ciascuno capace di riconoscere in maniera selettiva il proprio ligando e di tradurre i suoi messaggi in risposte biologiche (Chiu e coll. 1994; de Gasparo e coll. 1995a).

Questi siti rappresentano pertanto l'elemento indispensabile per la comparsa di queste risposte e l'identificazione dei loro diversi sottotipi (recettori AT1, AT2, AT4, Ang-(1-7)) – realizzata prima con metodiche biochimiche (DDT) (Whitebread e coll 1989) e poi in via farmacologica, mediante farmaci in grado di antagonizzarli (Timmermanns e coll. 1993) – ha aumentato notevolmente le nostre conoscenze sui meccanismi con cui lavora il SRA ed ha suggerito anche le modalità per inibirlo (Ferrario e coll. 2006 a e b).

L'uso sempre più ampio di questi antagonisti – ed in particolare di quelli che antagonizzano i recettori AT1 – ha dimostrato però che soprattutto questi ultimi, inizialmente sintetizzati con lo scopo di curare in maniera più razionale l'IA, sono in realtà capaci di produrre effetti benefici anche in altre condizioni morbose (dall'Alzheimer al diabete mellito, dalle malattie renali a quelle respiratorie), che almeno in via primitiva non appaiono legate ad un alterato funzionamento del SRA.

I meccanismi con cui si realizzano tutti questi effetti non sono ancora chiari, per cui sono in corso altre ricerche, con lo scopo di vedere che cosa avviene realmente “dietro la facciata” di questi recettori, quando essi sono stimolati dall'agonista o bloccati dall'antagonista. I dati finora acquisiti sono sicuramente promettenti, tuttavia ciascuno di essi riguarda quasi sempre un solo aspetto della biologia recettoriale e, per di più, i risultati sono “frammentati” in pubblicazioni prodotte da ricercatori di estrazione diversa – biologi molecolari, biochimici, fisiologi o farmacologi, per cui non sempre è possibile avere una visione completa dello stato dell'arte.

La presente rassegna è nata con lo scopo di riunire in una trattazione per quanto possibile unitaria tutte queste conoscenze, in modo da inserirle in un unico contesto, nel quale i dati sperimentali abbiano la loro naturale conclusione in quelli clinici e questi ultimi, a loro volta, trovino la loro spiegazione nelle premesse fornite dal laboratorio.

Essa è stata divisa in due parti. Nella prima sono discusse le ricerche che hanno reso possibile la classificazione di questi recettori, la definizione della loro struttura e dei meccanismi che li attivano e la dimostrazione degli effetti che ciascuno di essi produce. A conclusione di questa prima parte

sono esaminati anche i rapporti tra i diversi recettori del SRA ed il continuo dialogo che si svolge tra di loro e che contribuisce al funzionamento del sistema.

La seconda parte è dedicata alle applicazioni in campo terapeutico scaturite dalle ricerche, quindi nel corso di essa sono descritte le caratteristiche farmacologiche degli antagonisti dei recettori AT1, il loro meccanismo d'azione, gli effetti che producono ed i risultati ottenuti, soprattutto nel trattamento di alcune patologie più diffuse come l'IA, lo scompenso cardiaco, la nefropatia e lo *stroke*.

# Sommario

## Le ricerche di biologia molecolare

<b>Cap. 1</b>	<b>La classificazione dei recettori dell'Angiotensina</b>	1
1.1	I recettori AT1 e AT2	3
1.2	Il recettore AT4	5
1.3	Il recettore dell'Ang-(1-7)	6
1.4	I recettori atipici	8
1.4.1	Il recettore AT3	8
1.4.2	I siti di legame intracellulari	8
<b>Cap. 2</b>	<b>Il recettore AT1: la struttura ed il legame con le GPs</b>	13
2.1	La struttura del recettore AT1	15
2.2	Il legame del recettore AT1 con le GPs	19
2.3	La cascata dei segnali	22
<b>Cap. 3</b>	<b>Il recettore AT1: la fosforilazione, l'internalizzazione e la riattivazione</b>	29
3.1	La fosforilazione del recettore AT1	30
3.2	L'internalizzazione e la riattivazione de recettore AT1	32
<b>Cap. 4</b>	<b>Il recettore AT1: la distribuzione e gli effetti</b>	39
4.1	La distribuzione del recettore AT1	39
4.2	Gli effetti prodotti dal recettore AT1	43
<b>Cap. 5</b>	<b>Il recettore AT2: la struttura, l'attivazione del segnale e la distribuzione</b>	51
5.1	La struttura del recettore AT2	51
5.2	Il recettore AT2 e le GPs	54
5.3	L'attivazione del segnale	55
5.4	La distribuzione del recettore AT2	58
<b>Cap. 6</b>	<b>Il recettore AT2: gli effetti</b>	63
6.1	Gli effetti sulla PA	63
6.2	Gli effetti sul cuore	71

---

6.3	Gli effetti sul rene	72
6.4	Gli effetti a livello del SNC	74
6.5	Gli effetti sulla crescita e sui fenomeni proliferativi	76
6.6	I recettori AT2 e l'apoptosi	79
6.7	Gli effetti sull'aterogenesi	82
<b>Cap. 7</b>	<b>Le risposte atipiche dei recettori AT1 ed AT2 – Il <i>crossstalk</i> e la dimerizzazione</b>	<b>83</b>
7.1	Le risposte atipiche	83
7.2	Il <i>crossstalk</i> e la dimerizzazione	86
<b>Cap. 8</b>	<b>Il recettore AT4</b>	<b>89</b>
8.1	La distribuzione e la farmacologia del recettore AT4	89
8.2	Gli effetti prodotti dai recettori AT4	90
<b>Cap. 9</b>	<b>L' Ang-(1-7) ed il suo recettore</b>	<b>93</b>
<b>Cap. 10</b>	<b>I rapporti dei recettori AT1 e AT2 con quelli AT4 e dell'Ang-(1-7)</b>	<b>99</b>
<b>La terapia con gli antagonisti recettoriali</b>		
<b>Cap. 11</b>	<b>Gli antagonisti dei recettori AT1</b>	<b>105</b>
11.1	La farmacocinetica degli AT1-Antagonisti	107
11.2	La farmacodinamica degli antagonisti dei recettori AT1	111
11.3	Gli effetti prodotti dagli antagonisti del recettore AT1	113
11.4	Gli effetti pleiotropi	118
<b>Cap. 12</b>	<b>Il meccanismo d'azione degli antagonisti dei recettori AT1</b>	<b>123</b>
12.1	Il blocco dei recettori AT1	123
12.2	La partecipazione dei recettori AT2 e degli altri componenti il SRA	124
12.3	Gli effetti mediati dal SNC	126
<b>Cap. 13</b>	<b>La tollerabilità e le reazioni avverse</b>	<b>129</b>
<b>Cap. 14</b>	<b>Le principali indicazioni terapeutiche degli AT1RA – I grandi <i>trials</i></b>	<b>131</b>
14.1	L'ipertensione arteriosa	131
14.2	Lo scompenso cardiaco	139
14.3	La nefropatia	143
14.4	Lo <i>stroke</i>	145

<b>Cap. 15 Esistono differenze nell'efficacia clinica dei diversi antagonisti dei recettori AT1 e qual è la dose giusta di questi farmaci?</b>	149
<b>Conclusioni: il passato, il presente ed il futuro</b>	151
<b>Bibliografia</b>	155
<b>Sigle a singola lettera ed a tre lettere per gli aminoacidi</b>	187
<b>Indice analitico</b>	189

# **Le ricerche di biologia molecolare**

# La classificazione dei recettori dell'Angiotensina

L'esistenza di questi recettori era stata ipotizzata già negli anni '70, quando era stato dimostrato che nell'aorta di coniglio l'Angiotensina II marcata si lega ad alcune strutture specifiche, di tipo recettoriale, collocate sulla membrana cellulare e saturabili con una concentrazione di Angiotensina II di  $10^{-7}$  (Goodfriend e Lin 1970). Successivamente, quando apparve evidente che la risposta al polipeptide variava a seconda delle linee cellulari esaminate (Glossmann e coll. 1974), fu avanzata l'ipotesi che questi siti di legame fossero di tipo diverso (Meyer e coll. 1970), e questa ipotesi fu confermata da Chiu (Chiu e coll. 1989) e Whitebread (Whitebread e coll. 1989), che dimostrarono l'inattivazione di alcuni di questi siti da parte di una sostanza – il DTT –, che riduce la loro capacità di legare l'Angiotensina II, interrompendo i due ponti disolfuro presenti in ciascuna delle quattro anse intracellulari. Altri siti sono invece stimolati da questa sostanza, che aumenta la loro capacità di legame con il peptide.

Infine, partendo dall'osservazione di Furakawa (Furakawa e coll. 1982), secondo cui alcuni derivati imidazolici (S8307 e S8308) si comportano come antagonisti deboli ma specifici dell'Angiotensina II, negli anni '80 furono sintetizzati alcuni composti, mediante i quali fu possibile caratterizzare questi siti recettoriali anche farmacologicamente: infatti, alcune di queste molecole, a struttura difenilimidazolica (DuP 753) erano capaci di antagonizzare i siti inattivati dal DTT, mentre altri, a struttura tetraidroimidazopiridinica (spinacine) (PD123177 ed omologhi), antagonizzavano i siti stimolati dal DTT (Blankley e coll. 1991; Carini e coll. 1991).

Essendo state condotte in laboratori diversi, queste ricerche determinarono tuttavia una certa confusione nella terminologia adottata per indicare i due siti recettoriali: quello sensibile al DuP 753 inizialmente fu denominato AII-1, AII- $\alpha$  o AII-B, mentre quello insensibile fu denominato AII-2, AII- $\beta$  o AII-A. Queste diverse definizioni furono unificate nel 1991, quando una commissione di esperti propose di assegnare ai due tipi di recettori – quello antagonizzato dal Dup 753 e quello antagonizzato dal PD123319 e dal PD123177 – la denominazione rispettivamente di recettori AT1 e AT2, riservando la denominazione di AT1<sub>A</sub> e AT1<sub>B</sub>, AT2<sub>A</sub> ed AT2<sub>B</sub> e così via ad eventuali sottotipi di individuazione successiva (Bumpus e coll. 1991).

Appena quattro anni più tardi fu necessario, però, ampliare questa classificazione (de Gasparo e coll. 1995b), in quanto era stata accertata l'esistenza di altri siti recettoriali, che furono denominati AT3 ed AT4. Tuttavia ad essi non fu possibile dare una collocazione precisa, perché i loro meccanismi di trasduzione erano ignoti, e perché essi non erano stati clonati (e non lo sono tuttora). La definizione di AT3 fu data ad un sito di legame evidenziato nelle linee cellulari Neuro-2A del neuroblastoma del topo (Chaki ed Inagami 1992), caratterizzato da una bassa affinità per l'Angiotensina III, ed insensibile sia al DuP 753 che al PD123319, per cui, esso si comporta come un recettore non-AT1 e non-AT2. Il termine AT4 fu dato, invece, ad un recettore caratterizzato da una significativa affinità per un altro metabolita dell'Angiotensina II – l'Ang 3-8 o Angiotensina IV –, dotato di caratteristiche tali da giustificare la sua differenziazione dai recettori AT1 e AT2 e la sua inclusione tra i recettori del SRA (de Gasparo e coll. 1995b) (Fig. 1).

Più recentemente, il *Council for High Blood Pressure Research* ed il Comitato Internazionale di Farmacologia per la nomenclatura dei recettori (IUPHAR), hanno stabilito tre criteri necessari per poter considerare questi siti come dei veri e propri recettori: 1) operazionale, 2) trasduzionale e 3) strutturale, che riguardano rispettivamente: 1) l'affinità di legame di questi recettori con gli agonisti e gli antagonisti, 2) gli eventi che si verificano allorché si realizza tale legame e 3) la sequenza aminica del recettore e la possibilità di clonarlo (Humphrey e Barnard 1998).

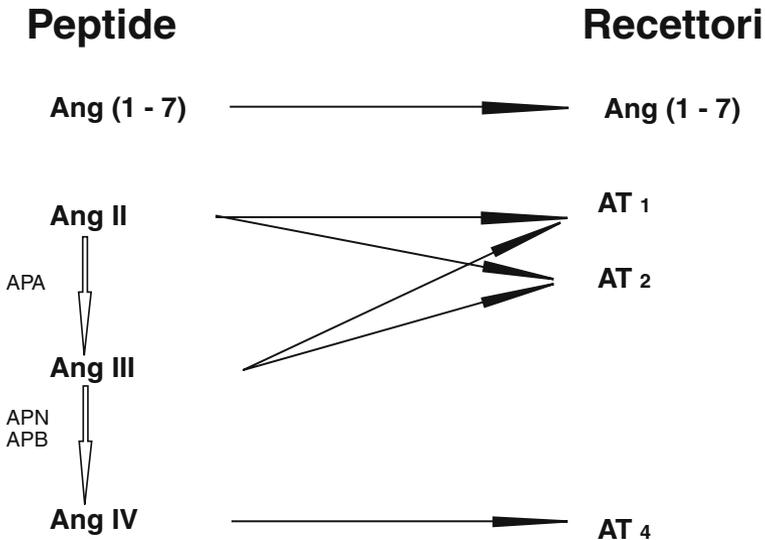


Fig. 1. Peptidi attivi dell'angiotensina e loro recettori (APA = Aminopeptidasi A; APB = Aminopeptidasi B; APN = Aminopeptidasi N)

## 1.1 - I recettori AT1 e AT2

Allo stato attuale delle nostre conoscenze questi due recettori sono gli unici dotati dei tre requisiti richiesti dall'IUPHAR (Humphrey e Barnard 1998; de Gasparo e coll. 2000).

Per indicare la loro classe strutturale, a ciascuno di essi è stato assegnato un codice alfanumerico, che è 2.1 Ang. 01.000.00.00 per quello AT1, e 2.1 Ang. 02.000.00.00 per quello AT2, ove i primi due numeri indicano la classe strutturale, il termine Ang la famiglia recettoriale di appartenenza ed i numeri 01 e 02 il tipo di recettore (AT1 e AT2), mentre gli zeri sono riservati ad eventuali varianti per duplicazione.

Per indicare invece la struttura aminoacidica e la collocazione cromosomica di questi due recettori è stato usato un ulteriore codice (de Gasparo e coll. 2000): nell'uomo il recettore AT1 ha il codice h 359 aa, P30556, chr 3, per indicare che esso contiene 359 aminoacidi, la cui sequenza è riportata al file n. 30556 del Protocollo svizzero, e che il gene che lo codifica si trova sul cromosoma 39 (Q); il recettore AT2 ha invece il codice h 363 aa, P50052, chr X q22-q23, perché contiene 363 aminoacidi e si trova sul cromosoma X q22-q23.

Come suggeriscono questi codici, ciascuno dei due recettori ha delle particolari caratteristiche biochimiche e strutturali, che, tuttavia, possono variare in funzione di fattori diversi come la localizzazione, la specie, lo stato del bilancio sodico, e così via: ad es., i recettori AT1 presenti nel tessuto nervoso mostrano una sensibilità al DTT minore di quelli periferici, ed anche la loro capacità di legame con l'Angiotensina II o con l'antagonista specifico (Losartan) è diversa da specie a specie (ad es. nei bovini è molto minore che in altre specie) (Timmermans e coll. 1993; de Gasparo e coll. 1994a).

Inoltre, nell'uomo ed in alcune specie animali (cane, maiale, coniglio) il recettore AT1 non ha duplicati (Curnow 1996), mentre nel ratto e nel topo ne esistono due sottotipi (de Gasparo e coll. 1994a), che sono probabilmente il risultato di una duplicazione genica avvenuta nel corso dell'evoluzione, dopo il distacco dei roditori dall'albero filogenetico dei mammiferi (Yoshida e coll. 1992). I due sottotipi – definiti AT1<sub>A</sub> e AT1<sub>B</sub> – sono collocati rispettivamente, nel ratto sul cromosoma 17q12 e 2q24, e nel topo su quello 13 e 3, per cui anche il loro codice è diverso: quello del ratto è r359aa, P 29089, P 25095, chr 17, chr 2; quello del topo è m359aa, P 29754, P 29755, chr 13, chr 3 (de Gasparo e coll. 2000).

Nonostante la diversa collocazione, i due sottotipi hanno comunque una eguale capacità di legare l'agonista, e coincidono per il 92% del loro DNA e per il 95% della sequenza aminoacidica, diversificandosi solo nell'ultima ansa extracellulare, che contiene sequenze diverse. A livello di quest'ansa

esiste una certa somiglianza tra il recettore AT1 dell'uomo e quello AT1<sub>B</sub> del ratto; tuttavia il confronto tra la sequenza aminoacidica delle anse ic dei due sottotipi e quella del recettore AT1 dell'uomo, dimostra che quest'ultimo funzionalmente è simile al sottotipo AT1<sub>A</sub> (Inagami 1995).

Il recettore AT2 presenta caratteristiche strutturali simili nell'uomo e nei roditori (72 % di identità tra l'uomo ed il ratto), ed è di tipo unico (de Gasparo e coll. 2000). La possibilità che anche di esso esistano dei sottotipi non può comunque essere esclusa, dal momento che le sue caratteristiche molecolari e funzionali presentano delle differenze, a cominciare dal peso (de Gasparo e coll. 1994a; de Gasparo e coll. 1994b). Quest'ultimo, che normalmente è compreso tra i 60 (miometrio umano) ed i 113 kDa (cellule PC12), in una particolare linea cellulare che esprime prevalentemente questo tipo di recettore - NG 108-15 -, è infatti diverso per la forma glicosilata e quella de-glicosilata, perché è rispettivamente di 92 e 56.2 kDa. Le stesse differenze sono state osservate anche per i recettori AT2 presenti nella granulosa ovarica del ratto e nei fibroblasti R3T3 (che hanno un peso molecolare rispettivamente di 79 e 100 kDa), quindi, è probabile che in queste linee cellulari i recettori AT2 abbiano modalità diverse di glicosilazione (Servant e coll. 1996).

L'esistenza di due sottotipi sembra d'altronde confermata da altre ricerche (Tsutsumi e Saavedra 1992), le quali dimostrano che in ratti di due settimane (caratterizzati da una notevole espressione di recettori AT2) il legame della <sup>125</sup>I-Sar<sup>1</sup>-Ang II con questi recettori è inibito dal pretrattamento con GTPγ<sub>s</sub> o con PTX in alcune strutture dell'encefalo (n. ventrotalamico, n. mediale genicolato e LC), mentre non lo è in altre (n. dell'ipoglosso, oliva inferiore) e nelle cellule R3T3.

In queste strutture è diversa anche la sensibilità al DTT, perché nell'oliva inferiore e nel n. dell'ipoglosso i recettori AT2 appaiono sensibili ad esso, mentre nel n. talamico ventrale ed in quello mediodorsale l'incubazione con DTT riduce soltanto del 40% il legame di questi recettori con l'Angiotensina II (Tsutsumi e Saavedra 1992).

Due sottopopolazioni di recettori AT2 sono state isolate anche in una linea cellulare differenziata del neuroblastoma - N1E-115, caratterizzata da una sensibilità al DTT ed al PD 123319 diversa da quella di altre linee cellulari (Reagan e coll. 1996).

L'esistenza di queste sottopopolazioni è suggerita anche dal fatto che alcuni di questi recettori (definiti AT2<sub>A</sub>) si legano con determinate subunità delle GPs, mentre altri (definiti AT2<sub>B</sub>) sono incapaci di contrarre tale legame (Zhang e Pratt 1996b); ciò fa supporre l'esistenza di una interazione selettiva tra queste subunità delle GPs ed i recettori AT2, in grado di dar luogo a risposte cellulari diverse.

## 1.2 - Il recettore AT4

Il recettore AT4 è stato inserito nel contesto dei recettori del SRA come un razionale per spiegare gli effetti prodotti dall'Angiotensina IV e la presenza in diverse strutture di siti di legame ad alta affinità per questo peptide (de Gasparo e coll. 1995a; Vauquelin e coll. 2002). Esso ha una bassa affinità per l'Angiotensina II, è insensibile agli AT1 – ed agli AT2RA, ed invece è sensibile ad un antagonista specifico – il Divalinal Ang IV (de Gasparo e coll. 2000).

Strutturalmente, questo recettore si presenta come una glicoproteina, costituita da una subunità  $\alpha$  con un peso molecolare di 165 kDa, e da una subunità  $\beta$  con un peso molecolare di 60 kDa (Zhang e coll. 1999a). Tuttavia prima nel surrene, e poi nel cervello, nel cuore e nei reni è stata identificata una banda con un peso molecolare di 225 kDa (Mustafa e coll. 2001); quindi è probabile che esso sia un recettore multimerico. Nell'ippocampo, invece, il suo peso molecolare è minore: 150 kDa (Zhang e coll. 1999a). Inoltre esso non si lega alle GPs, la sua stimolazione con Angiotensina IV non modifica i classici messaggeri (cGMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , inositolo fosfato, acido arachidonico) (Mustafa e coll. 2001), e si internalizza rapidamente.

Alcuni dati sembrano tuttavia mettere in dubbio la possibilità che l'Angiotensina IV sia l'unico ligando per il recettore AT4, in quanto in alcuni sistemi cellulari (cellule epiteliali del tubulo prossimale) il Divalinal Ang IV si comporta come un agonista, perché produce risposte simili a quelle prodotte dall'Angiotensina IV (Handa 2001). Inoltre, nelle strutture cerebrali in cui è presente questa Angiotensina è stato identificato anche un altro peptide, ottenuto per idrolisi della catena  $\beta$  dell'emoglobina – la LVV-emorfina 7 (Moeller e coll. 1997) –, dotato di una significativa affinità per questo recettore, del quale esso potrebbe essere il ligando specifico.

Secondo altri AA (Albiston e coll. 2001; Chai e coll. 2004) l'AT4 si identificherebbe con una proteina di membrana omologa delle aminopeptidasi A ed N – la cosiddetta IRAP (*Insulin-regulated aminopeptidase*), costituita da 916 aminoacidi e capace di eliminare l'aminoacido N-terminale di alcuni peptidi bioattivi, tra i quali l'Angiotensina III e l'Angiotensina IV.

Mediante l'inibizione *in situ* e le metodiche immunoistochimiche è stato anche visto che nel cervello di topo la distribuzione dell'IRAP mRNA è sovrapponibile a quella dei siti di legame della  $\text{Nec}^1$ -Ang IV (Norleucina<sup>1</sup> – Ang IV), e che entrambi i ligandi del recettore AT4 – l'Angiotensina IV e la LWH7 – inibiscono l'attività catalitica dell'IRAP (Albiston e coll. 2001). Tra il recettore AT4 e l'IRAP esiste anche una somiglianza strutturale, dal momento che quest'ultima è costituita anch'essa da una breve terminazione citoplasmatica N-terminale, da un singolo dominio transmembranale e da un grosso dominio C-terminale extracellulare (Chai e coll. 2004).

La possibilità che il sistema IRAP/AT4 rappresenti l'unico sito di ricognizione cellulare per l'Angiotensina IV è invece messa in dubbio dall'osservazione che nell'uomo il recettore AT1 preattivato ha una significativa affinità per l'Angiotensina IV e può essere attivato da essa, come dimostra anche la possibilità di bloccare alcuni degli effetti prodotti da questa Angiotensina mediante un AT1RA (Le e coll. 2002).

### 1.3 - Il recettore dell'Ang-(1-7)

Anche se le proprietà di questo recettore – che non è stato ancora clonato – non sono allo stato attuale ben definite, numerosi dati suggeriscono la sua esistenza, per spiegare il comportamento non “classico” (non AT1 – o AT2 – dipendente) dell'Ang-(1-7), (Vauquelin e coll. 2002).

Già negli anni '90, Santos (Santos e coll. 1994), e Tallant (Tallant e coll. 1997), in colture di cellule endoteliali bovine e di coronarie di cane, avevano evidenziato un sito di legame specifico per questa Angiotensina, insensibile al Losartan ed al PD 123319, ma che poteva essere antagonizzato da un analogo dell'Ang-(1-7) - la [D-Ala 7] - Ang-(1-7) (A799), ottenuto sostituendo la prolina in posizione 7 con la D-alanina.

Questo antagonista, che interrompe il legame della J<sup>125</sup>-Ang-(1-7) con le membrane delle cellule endoteliali (Santos e coll. 2000), agisce sia a livello centrale che periferico, non interferisce con l'effetto pressorio, miotropo e dipsogenico dell'Angiotensina II, né con il suo legame con le membrane della midollare del surrene (ricche di recettori AT1 e AT2); invece blocca sia la vasodilatazione dell'arteriola afferente del coniglio, prodotta dall'Ang-(1-7) (Ren e coll. 2002), sia l'aumento pressorio che essa produce dopo somministrazione nella RVLM (Fontes e coll. 1997).

Nei ratti SHR ed in quelli TGR (mRen2-27), esso innalza anche i livelli pressori, riduce la liberazione di prostaciclina e di NO prodotta dall'epta-peptide e si oppone alla riduzione dei livelli di TXA2 (Vauquelin e coll. 2002).

Nonostante questi risultati, l'esistenza di un recettore specifico per l'Ang-(1-7) non è stata facile da accertare, anche perché quello che dovrebbe essere il suo antagonista specifico – la [D-Ala7]-Ang-(1-7) – è in grado anche di comportarsi da agonista, cioè può anche stimolare la sintesi di fosfatidilcolina prodotta dall'Ang-(1-7) nel rene (Gironacci e coll. 2000; Ferrario e coll. 2004) oppure, alla stessa maniera di quest'ultima, può ridurre la liberazione del PAI-1 o del TPA nelle cellule endoteliali della vena ombelicale dell'uomo (Yoshida e coll. 2002).

Inoltre, a rendere più difficili queste ricerche è stato dimostrato che la liberazione di NO e di cGMP, prodotta dall'Ang-(1-7) nelle cellule endotelia-