

Nuove acquisizioni sui meccanismi di assorbimento intestinale del colesterolo

**LETIZIA BOCCHI,
SEBASTIANO CALANDRA**

Dipartimento di Scienze Biomediche,
Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

Introduzione

La molecola di colesterolo è protagonista di molte e diverse funzioni vitali: in primo luogo è una componente essenziale delle membrane cellulari, di cui modula fluidità e permeabilità. In secondo luogo il colesterolo è precursore degli ormoni steroidei, della vitamina D e dei sali biliari.

Inoltre riveste ruoli importanti nello sviluppo e funzionamento del sistema nervoso e dell'osso, nella trasduzione del segnale, nella regolazione della trascrizione genica, nello sviluppo delle cellule germinali, nella fecondazione e nel differenziamento.

D'altra parte è noto che elevati livelli plasmatici di colesterolo costituiscono un importante fattore di rischio per le malattie cardiovascolari e pertanto, le concentrazioni di questa molecola nell'organismo non devono superare valori limite.

Le cellule di gran parte degli organi e dei tessuti sono in grado di far fronte al fabbisogno di

colesterolo per la formazione delle membrane attraverso la sintesi endogena.

Tuttavia, molti tipi cellulari hanno acquisito sofisticati meccanismi per internalizzare ed utilizzare il colesterolo contenuto nelle lipoproteine plasmatiche e meccanismi per eliminare dalla cellula colesterolo in eccesso. Questi sistemi, complessivamente, garantiscono il mantenimento di un'omeostasi cellulare del colesterolo.

A livello dell'intero organismo invece, l'omeostasi del colesterolo viene mantenuta se la sintesi endogena e l'assorbimento intestinale sono in equilibrio con l'escrezione fecale di colesterolo. Per mantenere questo equilibrio si sono selezionati nel corso dell'evoluzione più di 100 geni che intervengono nella sintesi, nel trasporto e nel metabolismo del colesterolo. La sintesi endogena non rappresenta quindi l'unica fonte di colesterolo per l'organismo, ma esso viene anche assorbito dalla dieta a livello intestinale. L'assorbimento intestinale è un processo, composto di più fasi, durante il quale gli enterociti della mucosa intestinale catturano una parte del colesterolo che si viene a trovare quotidianamente nel lume intestinale, pari a circa 1.200-1.500 mg. Di questi, 300-500 mg circa provengono dalla dieta, 800-1200 mg dalla bile e circa 300 mg dalla desquamazione delle cellule della mucosa intestinale. In media un individuo adulto assorbe il 30-50% circa del colesterolo che entra nell'intestino tenue quotidianamente.

Il colesterolo assorbito viene in parte utilizzato dagli enterociti per il metabolismo cellulare, mentre la maggior parte viene incorporato in lipoproteine e raggiunge il fegato; quest'ultimo deve provvedere alla gestione delle diverse centinaia di mg di colesterolo di origine intestinale ogni giorno.

Oltre al colesterolo, con la dieta immettiamo nell'intestino anche una certa quantità di steroli vegetali (200-400 mg/die), i quali però vengono scarsamente assorbiti, come dimostrato dalla loro concentrazione plasmatica che, a seconda del tipo di sterolo, è da 5.000 a 20.000 volte inferiore a quella del colesterolo.

Nell'uomo esiste una correlazione altamente significativa tra livelli plasmatici di LDL-C ed efficienza nell'assorbimento intestinale di colesterolo. Il

KEY POINTS

- L'assorbimento intestinale del colesterolo è finemente regolato.
- La proteina NPC1L1 media l'assorbimento del colesterolo.
- Il colesterolo presente nell'intestino è soprattutto di origine epatica (via biliare).

controllo dell'assorbimento intestinale è quindi una prospettiva terapeutica attraente, considerando anche che molti soggetti sottoposti a terapia ipocolesterolemizzante faticano a rientrare nei limiti di LDL-C definiti ottimali.

Per questo motivo il processo di assorbimento del colesterolo e gli attori molecolari in esso implicati sono oggetto di studio e hanno riguadagnato attenzione con la scoperta di farmaci efficaci nell'inibire l'assorbimento, quali l'ezetimibe.

L'assorbimento intestinale di colesterolo viene solitamente suddiviso in tre fasi principali:

- 1) fase endoluminale;
- 2) fase di assunzione ed escrezione da parte degli enterociti;
- 3) fase intracellulare.

La presente rassegna si concentrerà principalmente sulla seconda fase dell'assorbimento, evidenziando in particolare il ruolo del trasportatore NPC1L1, di recente identificazione, e l'azione farmacologica dell'ezetimibe.

1. Fase endoluminale

La fase endoluminale dell'assorbimento comprende l'idrolisi degli esteri del colesterolo grazie a lipasi pancreatiche e la conseguente incorporazione del colesterolo libero in micelle con sali biliari, fosfolipidi, acidi grassi e monogliceridi.

Quest'ultimo processo è fondamentale per la solubilizzazione del colesterolo libero, di per sé scarsamente solubile in ambiente acquoso. Le micelle rappresentano quindi una sorta di "reservoir" concentrato in colesterolo, che diffonde lentamente attraverso la barriera acquosa ("unstirred water layer"), che riveste la membrana con "orletto a spazzola" degli enterociti. La diffusione lenta garantisce che il colesterolo entri poi nella cellula in forma monomericamente.

Fattori importanti che possono condizionare l'assorbimento del colesterolo nella fase endoluminale sono:

1. la disponibilità di lipasi pancreatiche;
2. il tipo di acidi grassi e monogliceridi
3. la disponibilità di sali biliari e fosfolipidi;

4. la presenza di steroli e stanoli vegetali; questi ultimi, se presenti in elevata quantità, possono interferire con la solubilizzazione del colesterolo nelle micelle, riducendone quindi l'assorbimento.

Si è tentato di sfruttare la dipendenza dell'assorbimento dalla disponibilità di sali biliari a scopo terapeutico, per ridurre la quantità di colesterolo assorbita a livello intestinale. Farmaci come resine e sequestranti dei sali biliari, quali la colestiramina, sono stati impiegati a tale scopo; anche gli acidi biliari stessi, soprattutto i più idrofili, sono in grado di ridurre la solubilità del colesterolo e quindi il suo assorbimento. Inoltre la presenza di steroli vegetali nella dieta viene consigliata per contribuire alla diminuzione dei livelli di LDL-C.

Tali approcci contribuiscono alla riduzione nella colesterolemia ma hanno una resa limitata e quindi vengono eventualmente utilizzati in associazione a terapie ipocolesterolemizzanti più incisive (ad esempio con statine).

2. Fase di assunzione ed escrezione da parte degli enterociti

L'assorbimento intestinale netto è il risultato di due contributi opposti rappresentati dalla cattura degli steroli e dalla loro ri-escrezione nel lume intestinale. Il flusso di colesterolo in entrata e in uscita è mediato da trasportatori specifici, rappresentati da NPC1L1, per quanto riguarda l'assunzione, e da ABCG5 e ABCG8 per quanto riguarda l'escrezione.

a) Fase di assunzione da parte degli enterociti

In questa parte verrà descritto il ruolo della proteina NPC1L1 nell'assorbimento a partire dalla sua scoperta, che è stata successiva rispetto all'identificazione e all'impiego in terapia dell'ezetimibe. Pertanto nell'esposizione, si è scelto di ripercorrere con ordine storico il processo che va dall'ezetimibe, all'identificazione del suo bersaglio molecolare.

FINESTRA 1
ACAT: ACYL-COA: CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE

Enzima che trasferisce gruppi acilici al colesterolo libero catalizzando la formazione di esteri del colesterolo. L'enzima agisce a livello del reticolo endoplasmatico dove viene trasportato il colesterolo una volta internalizzato nelle cellule. L'enzima ACAT-2 viene espresso principalmente a livello epatico e intestinale ed è quindi l'isoforma maggiormente coinvolta nell'esterificazione del colesterolo assorbito dall'intestino. Il colesterolo esterificato è poi destinato ad essere incorporato nei chilomicroni e attraverso essi trasportato per via linfatica. Uno degli approcci terapeutici proposti per ridurre l'assorbimento intestinale di colesterolo è stato quello di inibire l'attività di ACAT-2, ma le molecole identificate e i trials clinici non hanno dato i risultati sperati.

Il nuovo farmaco Ezetimibe e la scoperta della proteina NPC1L1

La seconda fase del processo di assorbimento comprende la cattura e l'efflusso di steroli attraverso la membrana plasmatica dell'enterocita. Per lungo tempo si è dibattuto se il colesterolo entrasse nell'enterocita attraverso un meccanismo di diffusione passiva oppure attraverso trasporto facilitato mediato da trasportatore.

Una risposta parziale a tale domanda è giunta con la scoperta dell'ezetimibe, un farmaco individuato durante uno studio volto all'identificazione di inibitori dell'enzima ACAT-2 (*Finestra 1*).

L'ezetimibe, capostipite della classe dei 2-azetidioni, è risultato essere in realtà un potente inibitore dell'assorbimento intestinale di colesterolo, piuttosto che un inibitore di ACAT-2. In vari modelli animali l'ezetimibe riduce l'assorbimento intestinale di colesterolo in maniera dose-dipendente fino ad un 96%, portando ad una contestuale diminuzione del colesterolo totale e di LDL-C nel plasma. In trials clinici sull'uomo è stato dimostrato che la somministrazione di una dose di eze-

timibe pari a 10 mg/die porta ad una riduzione media dell'assorbimento intestinale di colesterolo del 54% rispetto al placebo; a ciò consegue una diminuzione delle LDL plasmatiche del 17-20%. Studi condotti nel ratto con ezetimibe marcata hanno evidenziato che tale composto si associa con la membrana apicale degli enterociti.

La scoperta di una classe di inibitori in grado di bloccare selettivamente l'assorbimento di colesterolo già a basse dosi, e la dimostrazione che essi si associano con la mucosa intestinale in maniera specifica e saturabile, sembra suffragare l'ipotesi dell'esistenza di un trasportatore in grado di mediare l'ingresso di colesterolo nell'enterocita. La scoperta dell'ezetimibe ha quindi avviato una serie di studi volti all'identificazione del suo bersaglio molecolare.

NPC1L1: Identificazione e funzione nel processo di assorbimento intestinale

Nel 2004 è stato identificato un nuovo possibile trasportatore intestinale di colesterolo tramite un approccio misto genomico-bioinformatico.

FINESTRA 2
NPC1: NIEMANN-PICK DISEASE, TYPE C1

Proteina ubiquitaria che risiede negli endosomi/lisosomi tardivi ed è coinvolta nel movimento di lipidi all'interno della cellula. Ha la struttura di un trasportatore con 13 domini transmembrana e 3 larghi loop rivolti verso il lume endosomiale; può essere reclutata o ritenuta a livello endosomiale quando aumenta il contenuto cellulare di colesterolo, indicando che la sua funzione dipende dalla concentrazione intracellulare di colesterolo. Mutazioni nel gene NPC1, codificante per l'omonima proteina, sono causa di una rara malattia autosomica recessiva definita appunto Malattia di Niemann-Pick di tipo C. Tale patologia è caratterizzata clinicamente da importanti disturbi neurologici progressivi e biochimicamente dall'accumulo di lipidi a livello endosomiale e lisosomiale (colesterolo, sfingolipidi, gangliosidi,) nel sistema nervoso e nel fegato. La malattia di Niemann Pick tipo C è quindi una patologia da accumulo dovuta al blocco del traffico di lipidi all'interno della cellula. L'accumulo di lipidi risulta tossico soprattutto per le cellule neuronali e ciò spiega le manifestazioni principalmente neurologiche di tale patologia.

In particolare sono state analizzate numerose sequenze geniche ottenute originariamente da tessuto intestinale di ratto, alla ricerca di proteine contenenti le caratteristiche principali condivise dai trasportatori di colesterolo, ossia la presenza di domini transmembrana e di domini di interazione con il colesterolo, quali i cosiddetti “domini di sensibilità agli steroli” (spiegato in seguito), comuni a diverse proteine coinvolte nel metabolismo del colesterolo.

La proteina candidata è risultata essere NPC1L1 (NPC1-Like-1), così denominata per un’identità aminoacidica del 42% con la proteina NPC1 (Niemann-Pick C1). La proteina NPC1 è coinvolta nel movimento intracellulare del colesterolo ed altri lipidi dagli endosomi/lisosomi agli altri compartimenti cellulari. Mutazioni di questa proteina sono causa della grave patologia da accumulo intracellulare di colesterolo denominata Malattia di Niemann-Pick tipo C (*Finestra 2*).

NPC1L1 è altamente espressa a livello intestinale nel topo e nel ratto; nell’uomo essa è espressa sia a livello intestinale che a livello epatico. Nell’intestino del ratto, NPC1L1 risulta essere espressa secondo un gradiente decrescente lungo l’asse gastro-colico, con localizzazione massima a livello dell’intestino prossimale, ove avviene il massimo assorbimento di colesterolo, e minima a livello dell’ileo, dove l’assorbimento di colesterolo è pressoché nullo.

Il ruolo assorbitivo di NPC1L1 in vivo è stato dimostrato tramite la creazione di modelli murini con inattivazione specifica di NPC1L1 (topi NPC1L1^{-/-}).

Dopo somministrazione orale di colesterolo radiomarcato, l’assorbimento intestinale di colesterolo era diminuito del 70% nei topi NPC1L1^{-/-} rispetto ai topi di controllo. Somministrando agli animali di controllo ezetimibe si otteneva una riduzione nell’assorbimento intestinale di colesterolo di livello paragonabile (70% circa) a quella ottenuta con inattivazione di NPC1L1.

L’ezetimibe non aveva invece efficacia nell’inibire l’assorbimento nell’animale NPC1L1^{-/-}. È quindi possibile affermare che NPC1L1 riveste un ruolo fondamentale nella via di assorbimento del colesterolo sensibile all’ezetimibe.

Utilizzando un saggio di legame con ezetimibe radiomarcata è stato dimostrato che essa non è in grado di legarsi alle membrane degli enterociti di topi NPC1L1^{-/-} mentre si associa alle membrane di animali normali o di cellule in coltura esprimenti NPC1L1. Tale evidenza indiretta sembra indicare che NPC1L1 è il bersaglio molecolare dell’ezetimibe e che avvenga una specifica interazione tra ezetimibe e NPC1L1.

Esistono però anche elementi discordanti con quest’ultima ipotesi, derivanti da esperimenti in vitro condotti su vescicole rivestite da porzioni di membrana apicale degli enterociti, nella quale non sembra essere stata dimostrata la presenza di NPC1L1. Tale evidenza condurrebbe ad una riformulazione del ruolo di NPC1L1, la quale potrebbe essere una proteina delle membrane intracellulari, coinvolta nel trasporto intracellulare del colesterolo, dopo la sua internalizzazione nell’enterocita. In tal caso resterebbe aperta la questione dell’esistenza di altre proteine di membrana coinvolte nell’assunzione di colesterolo nell’enterocita; in base ad evidenze sperimentali sono state proposte alcune molecole candidate (SR-BI, CD36, Aminopeptidasi N) ma al momento non ci sono dimostrazioni convincenti del loro ruolo come trasportatori di colesterolo.

NPC1L1: funzione a livello epatico

Come già accennato in precedenza, NPC1L1 è espressa solo a livello intestinale nel topo e nel ratto, ma nell’uomo viene altamente espressa anche a livello epatico. Il ruolo di NPC1L1 nel fegato era per lo più sconosciuto fino a quando studi molto recenti hanno chiarito in parte la sua funzione. Le prime osservazioni hanno dimostrato che NPC1L1 in epatociti di scimmia si localizza a livello della membrana canalicolare e che l’espressione di NPC1L1 umana in cellule di epatoma facilita l’ingresso di colesterolo libero dal mezzo di coltura.

Successivamente sono stati creati topi transgenici in cui è stata indotta una sovraespressione della proteina NPC1L1 umana esclusivamente a livello epatico. Esperimenti di immunofluorescenza hanno rivelato che negli epatociti dell’animale transgenico, così come in quelli umani, NPC1L1 si localizza sempre a livello del polo canalicolare. Inoltre

a livello di parametri biochimici il topo transgenico per NPC1L1 presenta una drastica riduzione nella concentrazione di colesterolo nella bile, associata ad un aumento nella concentrazione di colesterolo plasmatico.

Dal momento che NPC1L1 è un trasportatore di steroli, la sua funzione a livello canalicolare potrebbe essere quella di catturare il colesterolo della bile e re-internalizzarlo negli epatociti. Il trattamento dell'animale transgenico con ezetimibe ha riportato il suo fenotipo biochimico alla normalità annullando sia la riduzione del colesterolo biliare sia l'aumento di quello plasmatico, dimostrando quindi che l'ezetimibe è efficace anche nell'inibire NPC1L1 epatica.

L'azione dell'ezetimibe sarebbe quindi duplice poiché favorirebbe la secrezione biliare del colesterolo, inibendone il riassorbimento canalicolare, da un lato, e bloccando l'assorbimento intestinale dall'altro.

L'ipotesi sulla funzione di NPC1L1 nel fegato è che tale trasportatore protegga l'organismo da un'eccessiva perdita di colesterolo con la bile. In particolare la presenza di NPC1L1 sulla membrana canalicolare può modulare l'escrezione di colesterolo nella bile, controbilanciando l'azione opposta dei trasportatori ABCG5/G8

anch'essi presenti a questo livello (come spiegato in seguito).

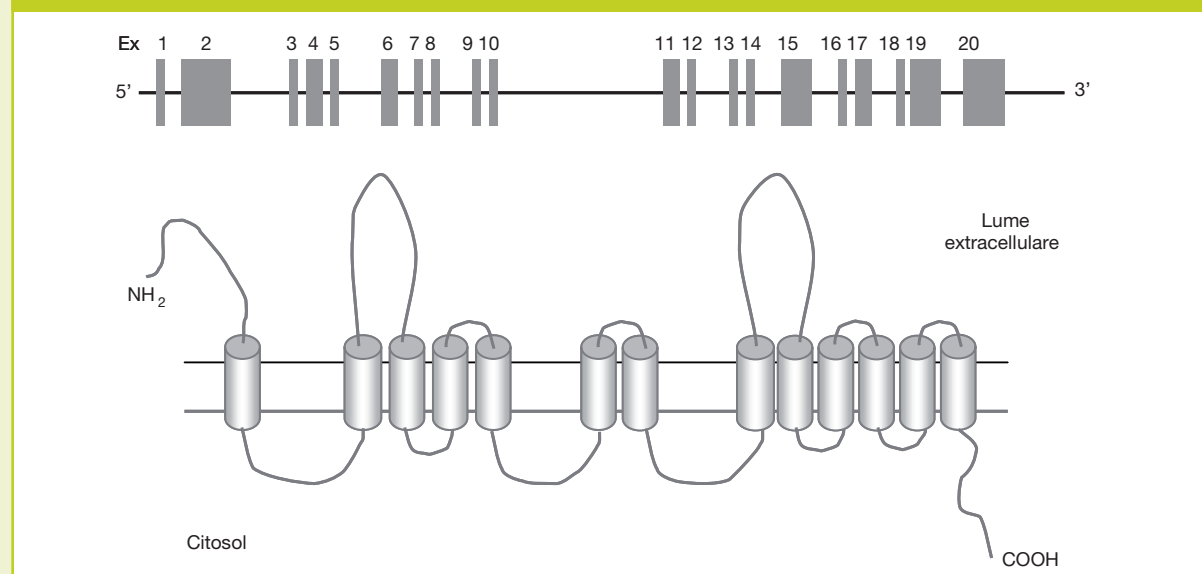
È verosimile che l'esistenza di meccanismi opposti e complementari che mediano il flusso di colesterolo in entrata (NPC1L1) e in uscita (ABCG5/ABCG8) nelle stesse regioni della membrana plasmatica, serva a regolare finemente e in maniera dinamica, il contenuto di colesterolo di membrana.

Gene e proteina NPC1L1

Il gene codificante per NPC1L1 è localizzato sul cromosoma 7 e codifica per una proteina di 1332 aminoacidi. La struttura della proteina NPC1L1 è stata ipotizzata basandosi sulla sua elevata omologia con NPC1; essa sarebbe costituita da 13 domini transmembrana, tre larghe anse extracellulari esposte nel versante luminale ed una coda citoplasmatica (Figura 1). Come già precedentemente accennato, le eliche transmembrana 3-7 hanno elevata omologia con i domini sterolo-sensibili di altre proteine implicate nel metabolismo del colesterolo e finemente regolate dai livelli intracellulari di colesterolo.

Il meccanismo d'azione di NPC1L1 è ancora ampiamente discusso: non è chiaro se esso possa mediare direttamente l'ingresso di colesterolo oppure se l'assorbimento di colesterolo sia modu-

Figura 1 Struttura di gene e proteina NPC1L1.



FINESTRA 3 VARIANTI DI SEQUENZA

Ogni modificazione nucleotidica che insorge in una sequenza di DNA (all'interno o all'esterno di geni) rappresenta una "variante di sequenza" o "mutazione". L'effetto di una mutazione può essere estremamente variabile a seconda del numero di nucleotidi coinvolti, della loro posizione, del tipo di cambiamento. La variazione può essere determinata da sostituzione nucleotidica di un nucleotide oppure da delezione/inserzione di uno o più nucleotidi. L'effetto di una sostituzione nucleotidica può essere estremamente variabile a causa della degenerazione del codice genetico (più codoni codificanti per lo stesso aminoacido), infatti si parla di:

- **sostituzione conservativa** se la variante non determina il cambiamento dell'aminoacido, codificato dal codone mutato;
- **sostituzione non conservativa** se a livello della proteina l'aminoacido coinvolto non viene mantenuto. Sostituzioni non conservative sono sia le **mutazioni nonsense** (sostituzione di un codone codificante un aminoacido con codone di stop) sia le **mutazioni missenso** (sostituzione del codone codificante un aminoacido con codone codificante un altro aminoacido).

Una variante di sequenza può o meno avere conseguenze funzionali sulla proteina interessata. Numerose varianti di sequenza, infatti, vengono definite **polimorfismi** (o **SNP**, single nucleotide polymorphism) poiché sono frequenti nella popolazione generale ed è verosimile che non determinino significative alterazioni nel fenotipo, dal momento che non sembrano soggette a pressione selettiva. Le **varianti rare** invece è più probabile che abbiano un impatto a livello della funzione della proteina, sia in positivo (aumentandone la funzione) sia in negativo (sopprimendone la funzione). Esistono comunque numerose eccezioni a tali definizioni quale ad esempio la presenza di popolazioni in cui sono frequenti varianti classificate come rare in altre popolazioni.

Solitamente viene definito polimorfismo qualsiasi variante con frequenza nella popolazione generale superiore o uguale all'1%.

lato dal movimento degli sfingolipidi di membrana.

Quest'ultima ipotesi deriva dalla somiglianza di NPC1L1 con NPC1, proteina coinvolta nel traffico intracellulare degli sfingolipidi, dall'osservazione che la sfingomielinina è in grado di inibire l'assorbimento intestinale di colesterolo e dal fatto che cellule NPC1L1^{-/-} hanno accumuli intracellulari di colesterolo e sfingolipidi a livello di strutture vescicolari.

Regolazione dell'espressione di NPC1L1

Non è ancora chiaro come sia regolata l'espressione di NPC1L1 a livello intestinale ed epatico e quali siano nel dettaglio i fattori coinvolti.

La proteina NPC1L1 contiene un dominio (eliche transmembrana 3-7) che ha elevata omologia con una regione presente in altre proteine che rivestono un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo del colesterolo, quali HMG-CoA reduttasi, SCAP, NPC1.

Tale dominio viene definito "regione di sensibilità agli steroli" in quanto sarebbe in grado di "sentire" i livelli intracellulari di colesterolo in base ai quali verrà poi condizionata l'espressione e la funzione della proteina.

Identificazione di varianti del gene NPC1L1 e loro effetto su assorbimento e LDL-C

L'assorbimento di colesterolo varia considerevolmente da individuo a individuo sia per differenze genetiche in qualsiasi delle proteine coinvolte nel processo di assorbimento, sia per differenze legate al contributo e alla composizione dei grassi nella dieta. È possibile quantificare l'assorbimento intestinale in relazione alla sintesi

FINESTRA 4 RAPPORTO CAMPESTEROLO/ LATOSTEROLO (Ca/La)

Il campesterolo è uno sterolo vegetale la cui presenza nell'organismo deriva esclusivamente dall'assorbimento con la dieta. Il latosterolo, invece, è un intermedio della biosintesi del colesterolo; la sua concentrazione nel plasma è quindi correlata con i livelli di sintesi endogena.

Il rapporto tra campesterolo e latosterolo è utilizzato come parametro per misurare l'assorbimento rispetto alla sintesi endogena di colesterolo. In particolare un alto rapporto Ca/La indica un elevato tasso di assorbimento. Al contrario un basso rapporto Ca/La indica un ridotto tasso di assorbimento, che necessiterà quindi di essere controbilanciato da una più elevata sintesi endogena, ai fini dell'omeostasi del colesterolo dell'intero organismo.

endogena di colesterolo affidandosi ad un parametro definito come rapporto tra campesterolo e latosterolo (*Finestra 3*).

Uno studio di popolazione ha indagato la presenza di varianti di sequenza del gene NPC1L1 in soggetti con i maggiori e i minori livelli di assorbimento intestinale di colesterolo, definiti in base al rapporto campesterolo/latosterolo (Ca/La).

Gli individui con il più alto rapporto Ca/La sono definiti iper-assorbitori mentre quelli con rapporto più basso ipo-assorbitori.

Lo studio in questione ha identificato la prevalenza nel gene NPC1L1 di varianti rare (frequenza nella popolazione generale <1%), non conservative (*Finestra 4*) nel gruppo degli ipo-assorbitori, specialmente nei soggetti Afro-Americani. La presenza di tali varianti correla significativamente anche con livelli di LDL-C, che risultano inferiori nel plasma dei portatori di queste varianti. Ciò concorda con l'ipotesi che NPC1L1 mutato sia meno funzionante; pertanto i portatori avranno un minore tasso di assorbimento intestinale di colesterolo.

La conferma di tale ipotesi si avrà solo quando sarà disponibile un saggio funzionale per testare le varianti di NPC1L1.

La risposta all'ezetimibe (così come quella alle statine) è variabile da individuo ad individuo e ciò dipende dal livello di assorbimento di colesterolo dall'intestino. I processi di assorbimento e sintesi endogena del colesterolo sono altamente interdipendenti per cui soggetti ipo-assorbitori avranno presumibilmente alti livelli di sintesi endogena e saranno quindi molto sensibili alle statine ma poco all'ezetimibe.

Al contrario gli iper-assorbitori avranno una buona risposta all'ezetimibe ma una minore risposta alle statine. Il gene NPC1L1 è stato sequenziato in soggetti che presentavano ridotta risposta all'ezetimibe e sono state identificate due mutazioni non-conservative potenzialmente responsabili dell'insensibilità all'ezetimibe.

L'identificazione di varianti genetiche di NPC1L1 nell'uomo che correlano con i livelli di assorbimento intestinale di colesterolo e di LDL-C nel plasma costituiscono l'inequivocabile

dimostrazione del ruolo chiave di tale proteina nel mediare l'ingresso intestinale di colesterolo, anche se il suo funzionamento nel dettaglio necessita di ulteriori chiarimenti.

L'esempio dell'ezetimibe ed NPC1L1 suggerisce come l'identificazione di un farmaco possa portare a ritroso alla scoperta di una nuova via fisiologica e degli attori molecolari in essa coinvolti.

Ezetimibe e statine

I processi di assorbimento intestinale e sintesi endogena del colesterolo sono fortemente interdipendenti, come precedentemente accennato, poiché i meccanismi di regolazione che l'organismo attua tendono a mantenere inalterata l'omeostasi del colesterolo; è verosimile ipotizzare dunque che una riduzione dell'assorbimento intestinale sia accompagnata da un aumento della sintesi endogena e viceversa. In topi NPC1L1^{-/-} utilizzati per studiare la funzione di NPC1L1 è stato osservato che la diminuzione nell'assorbimento intestinale di steroli dovuta all'assenza di NPC1L1 era accompagnata ad un aumento di 3,5 volte dell'espressione dell'HMG-CoA sintasi, enzima fondamentale nella sintesi endogena di colesterolo e iperespresso in caso di deplezione di colesterolo.

A conferma di ciò fin dai primi trials clinici sull'uomo è stato osservato che l'inibizione nell'assorbimento di colesterolo, operata dall'ezetimibe, era accompagnata da un marcato aumento della sintesi endogena del colesterolo stesso, suggerendo la necessità di combinare l'azione dell'ezetimibe con quella delle statine per ottenere un effetto ipocolesterolemizzante additivo.

b) Fase di efflusso di colesterolo dall'enterocita

Il processo di escrezione di colesterolo e di steroli vegetali dall'enterocita, denominato "efflusso", è mediato da trasportatori appartenenti alla super-famiglia dei trasportatori ABC, proteine di membrana che mediano un trasporto attivo accompagnato dall'idrolisi di ATP. In particolare nell'efflusso di steroli a livello intestinale sono implicati due molecole proteiche: ABCG5 e ABCG8, entrambi "trasportatori incompleti"

(“half-transporters”) che necessitano di formare un eterodimero tra loro per essere funzionali. L’efflusso di steroli verso il lume rappresenta un meccanismo di salvaguardia dall’eccesso di colesterolo e steroli vegetali.

I trasportatori ABCG5-ABCG8: funzione a livello intestinale

I due trasportatori ABCG5 ed ABCG8 appartengono alla superfamiglia dei trasportatori ABC. Essi sono membri della sotto-famiglia G dei trasportatori ABC in quanto contengono un singolo dominio ATP magnesio-dipendente all’estremità NH₂ terminale e sei segmenti transmembrana. I geni codificanti ABCG5 ed ABCG8 si trovano sul cromosoma 2 (2p21) a brevissima distanza l’uno dall’altro (Figura 2).

L’espressione dei geni ABCG5 ed ABCG8 è sotto il controllo del contenuto intracellulare di colesterolo e/o di derivati ossidati del colesterolo (ossisteroli).

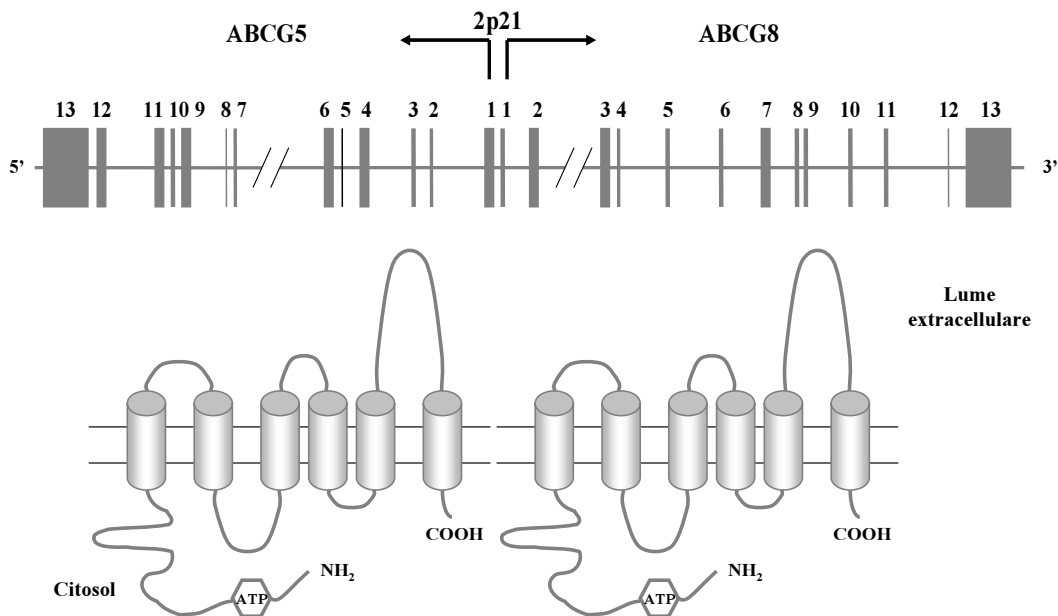
Questi composti rappresentano ligandi/attivatori per un fattore di trascrizione denominato LXR (Liver X- Receptor, *Finestra 5*) il quale, formando un dimero con un altro fattore di trascrizione

denominato RXR (recettore per l’acido retinoico), attiva la trascrizione dei geni ABCG5 e ABCG8. Nei topi, la somministrazione di una dieta ad elevato contenuto di colesterolo aumenta l’espressione di ABCG5 e ABCG8; ciò è dovuto appunto alla attivazione del fattore trascrizionale LXR. In condizioni fisiologiche i due trasportatori ABCG5 e ABCG8 agiscono di concerto formando un eterodimero che si localizza sulla porzione apicale della membrana degli enterociti.

La funzione fisiologica dell’eterodimero ABCG5-ABCG8 è quella di promuovere l’efflusso di colesterolo e di steroli vegetali sia nell’intestino che nel fegato.

La loro azione spiega in parte perchè il processo di assorbimento intestinale è selettivo dato che, mentre il colesterolo della dieta viene assorbito in maniera significativa, gli steroli vegetali hanno invece un livello di assorbimento molto ridotto. Tali trasportatori sono deputati quindi alla ri-escrezione degli steroli vegetali e dell’eventuale colesterolo in eccesso assorbiti dal lume intestinale. ABCG5 e ABCG8 agiscono in modo non uniforme nei confronti di colesterolo e steroli vegetali.

Figura 2 Struttura di geni e proteine dei trasportatori ABCG5-ABCG8.



FINESTRA 5: RAPPORTO CAMPESTEROLO/ LATOSTEROLO (Ca/La)

Il campesterolo è uno sterolo vegetale la cui presenza nell'organismo deriva esclusivamente dall'assorbimento con la dieta. Il latosterolo, invece, è un intermedio della biosintesi del colesterolo; la sua concentrazione nel plasma è quindi correlata con i livelli di sintesi endogena.

Il rapporto tra campesterolo e latosterolo è utilizzato come parametro per misurare l'assorbimento rispetto alla sintesi endogena di colesterolo. In particolare un alto rapporto Ca/La indica un elevato tasso di assorbimento. Al contrario un basso rapporto Ca/La indica un ridotto tasso di assorbimento, che necessiterà quindi di essere controbalanciato da una più elevata sintesi endogena, ai fini dell'omeostasi del colesterolo dell'intero organismo.

Mutazioni in ABCG5 o ABCG8 sono la causa di una rara malattia recessiva denominata sitosterolemia, caratterizzata da un abnorme assorbimento intestinale di steroli vegetali e di colesterolo che determina un aumento dei livelli plasmatici di questi steroli e predispone ad aterosclerosi prematura. Analoghe alterazioni metaboliche si verificano in topi con inattivazione dei geni ABCG5 ed ABCG8 (G5/G8^{-/-}).

Inoltre sono stati individuati una serie di polimorfismi dei geni codificanti per ABCG5 e ABCG8 in grado di influenzare la concentrazione plasmatica di steroli. In particolare una sostituzione aminoacidica (Aspartato 19 Istidina, D19H) a carico della proteina ABCG8 ne altera la funzione, probabilmente rendendola maggiormente attiva; gli individui portatori di tale polimorfismo, infatti, hanno una minore concentrazione di sitosterolo, colesterolo totale e LDL-C nel plasma. Pertanto tale polimorfismo correla in negativo con i marcatori dell'assorbimento intestinale di colesterolo e in positivo con i marcatori della sintesi endogena di colesterolo. Un altro polimorfismo sempre in ABCG8 che porta alla sostituzione del glutammato 640 in glutamina (E640Q) è stato messo in relazione con un aumento nelle concentrazioni di colesterolo nel plasma. Inoltre è possibile speculare sul fatto che, essendo ABCG5 e ABCG8 funzionali in forma di eterodimero, polimorfismi pre-

senti sui due geni contemporaneamente potrebbero "interagire" influenzando la funzionalità del complesso, mentre la presenza di ciascuno di essi singolarmente potrebbe non determinare alterazioni significative.

I trasportatori ABCG5-ABCG8: funzione a livello epatico

I trasportatori ABCG5 e ABCG8 sono espressi sulla membrana apicale dell'enterocita così come a livello del polo biliare dell'epatocita; essi sono quindi coinvolti, da un lato, come sistema di "difesa" nei confronti del colesterolo e degli steroli vegetali presenti negli alimenti, riducendo il loro assorbimento e quindi ingresso nell'organismo, dall'altro mediano la secrezione biliare del colesterolo, una delle principali vie attraverso cui il colesterolo endogeno è eliminato dall'organismo, evitando quindi l'eccessivo accumulo di colesterolo intraepatico. Come già precedentemente spiegato, l'azione dell'eterodimero ABCG5-G8 a livello canalicolare, sulla membrana dell'epatocita, controbilancia l'azione del trasportatore NPC1L1 contribuendo inoltre a regolare il contenuto di colesterolo nella membrana stessa.

Lo stesso polimorfismo D19H in ABCG8, di cui si è discusso in precedenza, è stato recentemente messo in relazione con la predisposizione alla formazione di calcoli biliari, in quanto è risultato frequente in individui affetti da calcolosi biliare. L'ipotesi è che tale polimorfismo risulti in un aumento di funzione di ABCG8 che così determinerebbe una ipersaturazione di colesterolo nella bile, promuovendo quindi la formazione di calcoli biliari.

3. Fase intracellulare e formazione delle lipoproteine

Durante la fase intracellulare il colesterolo assorbito con la dieta viene trasportato all'interno degli enterociti dove viene assemblato nelle lipoproteine. È opinione diffusa che il colesterolo assorbito dalla dieta entri nell'organismo esclusivamente come parte dei chilomicroni; di recente è stato invece dimostrato che gli enterociti assemblano non solo chilomicroni ma anche lipoproteine ad

alta densità (HDL). Esistono quindi meccanismi multipli di assemblaggio e secrezione delle lipoproteine intestinali, che possono essere grossolanamente suddivisi in: vie dipendenti da ApoB (chilomicroni) e vie indipendenti da ApoB (HDL). Tali vie sono tra loro complementari e probabilmente agiscono di concerto per assicurare un efficiente trasporto dei lipidi assorbiti.

a) Formazione e secrezione dei chilomicroni (via dipendente da apoB)

Il colesterolo e gli steroli vegetali che entrano nell'enterocita e non vengono ri-escreti mediante ABCG5/G8, vengono trasportati al reticolo endoplasmatico (RE). Nel reticolo il colesterolo viene esterificato per azione dell'enzima ACAT-2 (*Finestra 1*) e successivamente incorporato, insieme ad una quota di colesterolo non esterificato, nei chilomicroni. L'assemblaggio dei chilomicroni prevede il trasferimento di colesterolo esterificato e trigliceridi all'apolipoproteina B48; tale trasferimento avviene attraverso la proteina MTP ("microsomal triglyceride transfer protein").

I chilomicroni nascenti vengono poi trasportati al Golgi, in un processo di trasferimento in cui sono coinvolte vescicole, gemmate dalla membrana del RE, ed un complesso multi-proteico, risiedente sulla membrana del RE. Tale complesso è composto dalle cosiddette proteine COPII a cui appartengono Sar1 e vari membri della famiglia di proteine Sec.

Una volta nel Golgi, i chilomicroni vanno incontro ad una prima fase di maturazione, arricchendosi di trigliceridi, e da qui, grazie a strutture vescicolari, raggiungono le fossette rivestite di clatrina sulla membrana plasmatica. Le vescicole si fondono con la membrana baso-laterale da cui avviene l'esocitosi dei chilomicroni nel circolo linfatico.

Mutazioni a carico del gene apoB che impediscono la formazione di apo-B48 sono causa di ipobetalipoproteinemia familiare, una condizione in cui si verifica un difetto di formazione dei chilomicroni, che si traduce in ridotto assorbimento intestinale di lipidi.

Mutazioni a carico del gene codificante per MTP,

che riducono la sua espressione o la sua funzione, determinano abetalipoproteinemia, una condizione caratterizzata dall'assenza di lipoproteine contenenti ApoB nel plasma. I sintomi ad essa associati includono: steatorrea, steatosi epatica, retinite pigmentosa, progressiva degenerazione spinocerebellare, malassorbimento dei lipidi.

Difetti di Sar1 invece (codificata dal gene SARA2) sono associati alla malattia da ritenzione dei chilomicroni, una patologia caratterizzata da: assenza di ApoB48, ridotti livelli di colesterolo plasmatico e da malassorbimento intestinale dei lipidi. I lipidi internalizzati dagli enterociti, infatti, non vengono assemblati e secreti nella circolazione sotto forma di chilomicroni, accumulandosi all'interno degli enterociti stessi.

Al fine di modulare l'assorbimento intestinale di colesterolo sono stati proposti approcci terapeutici che interferissero con le molecole coinvolte nella fase intracellulare. In particolare, sono stati ricercati degli inibitori dell'enzima ACAT-2, ma le molecole identificate non si sono rivelati specifiche ed efficaci. Sono stati invece recentemente sviluppati inibitori dell'MTP, approccio che trova il suo razionale dall'osservazione del fenotipo dei soggetti con abetalipoproteinemia. Tali inibitori si sono rivelati efficaci nel determinare una riduzione di colesterolo totale e LDL-C, ottenuto per ridotta produzione di ApoB, ma hanno dato effetti avversi importanti, quali aumento delle transaminasi e steatosi epatica, che di fatto impediscono il loro impiego in terapia.

b) Formazione delle HDL intestinali (via indipendente da ApoB)

Il trasportatore ABCA1 è stato identificato nel 1999, quando si è scoperto che mutazioni del gene codificante questa proteina sono la causa della malattia di Tangier, una rara malattia recessiva caratterizzata da grave deficit di HDL nel plasma. Il trasportatore ABCA1 è un trasportatore ABC di tipo completo (full transporter), che è presente nella membrana plasmatica di quasi tutti i tipi cellulari, ove funziona facilitando l'efflusso di fosfolipidi e colesterolo dallo strato esterno della membrana plasmatica, ad un accettore extracellulare rappresentato dall'apolipoproteina A-I povera in

lipidi. È costituito da due porzioni di 6 domini transmembrana ciascuna, due domini di legame per l'ATP, due larghe anse extracellulari che interagiscono tra loro mediante un ponte disolfuro (*Figura 3*). L'espressione del gene ABCA1 è controllata dal contenuto intracellulare di colesterolo, attraverso l'attivazione del fattore trascrizionale LXR (*Finestra 5*), come avviene nel caso dei geni ABCG5 e ABCG8.

Il difetto completo di questo trasportatore si traduce in un accumulo intracellulare di colesterolo e nella mancata lipidizzazione dell'apo A-I, a cui consegue un accelerato catabolismo di questa apolipoproteina, che è causa dei ridotti livelli plasmatici di HDL.

L'efflusso di colesterolo mediato da ABCA1 consente alla cellula di facilitare l'eliminazione di colesterolo e di mantenerne inalterata la concentrazione intracellulare.

Inizialmente si era ipotizzato un coinvolgimento diretto di ABCA1 nella ri-escrezione del colesterolo in eccesso assorbito dal lume ma diversi studi hanno poi smentito tale ipotesi.

Lo studio di pazienti con difetto completo di ABCA1 (malattia di Tangier), di modelli animali quali i polli WHAM (portatori di mutazioni inat-

tivanti spontanee sul gene ABCA1), di cellule polarizzate e di enterociti in vitro, ha dimostrato che ABCA1 a livello intestinale è localizzato sul versante baso-laterale della membrana plasmatica e che non è direttamente coinvolto nell'assunzione di colesterolo dal lume. Il trasportatore ABCA1 sembra invece mediare un trasporto attivo di colesterolo all'esterno dell'enterocita, dal versante baso-laterale. Grazie a tale meccanismo di efflusso si formano lipoproteine ad alta densità (HDL) in cui viene incorporata una parte del colesterolo assorbito dalla dieta.

Recentemente è stato creato un modello murino con inattivazione selettiva di ABCA1 a livello intestinale (ABCA1^{-i/-i}). In tale modello l'assenza di ABCA1 intestinale è associata con una riduzione circa del 30% delle HDL plasmatiche e con una diminuzione del flusso di colesterolo dal lume intestinale al plasma. Il ruolo principale di ABCA1 intestinale sembra essere quello di contribuire in maniera importante al pool sistemico di HDL, che si formano dall'efflusso di colesterolo e fosfolipidi, ABCA1 mediato, all'apoproteina A-I povera in lipidi. Le HDL generate a livello intestinale vengono poi secrete direttamente nel plasma e non nel circolo linfatico.

Figura 3 Rappresentazione schematica del trasportatore ABCA1.

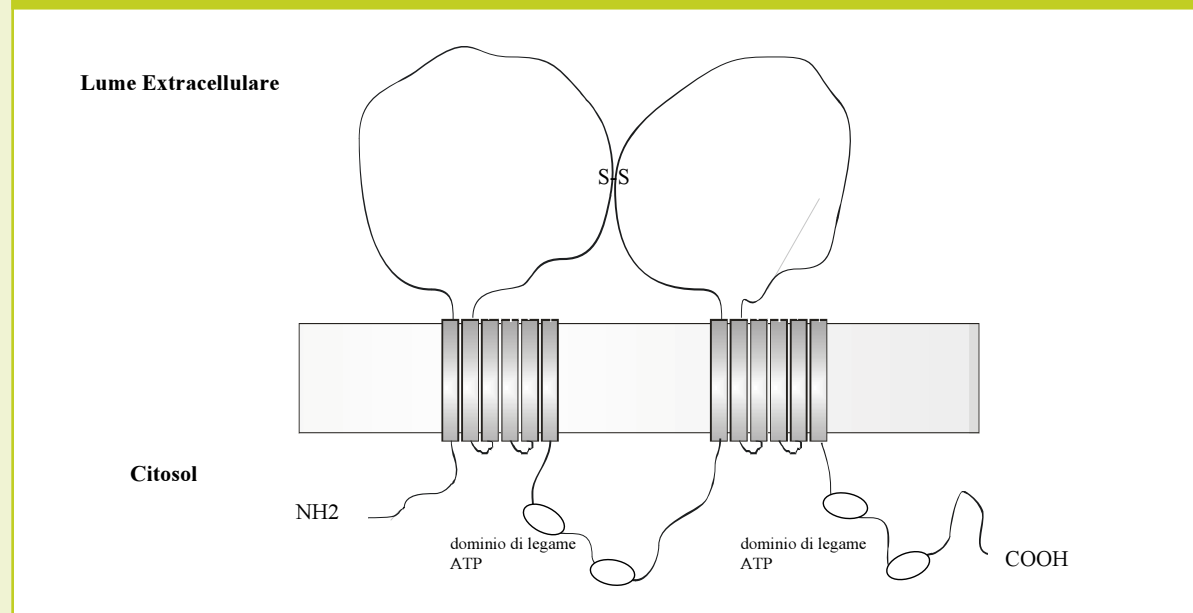
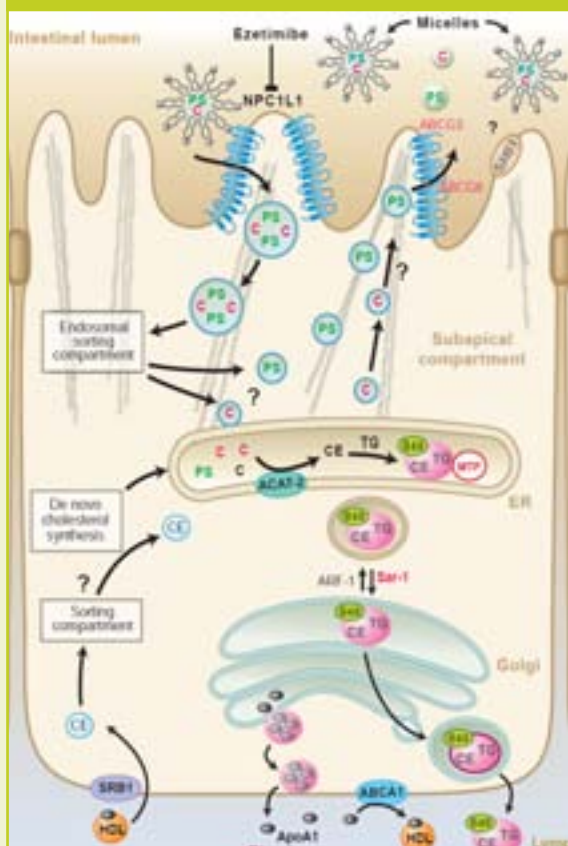


Figura 4 Visione d'insieme dei meccanismi che partecipano all'assorbimento intestinale in un enterocita.



Anche l'apolipoproteina A-I svolge una funzione limitante nella formazione delle HDL intestinali in quanto accettore obbligato di ABCA1; infatti in topi knock out per ApoAI è stata osservato un rallentato assorbimento di colesterolo dovuto ad una diminuzione del trasporto di colesterolo con le HDL. In tempi più lunghi si è visto che le vie di secrezione dipendenti da ApoB compensano per tale ridotta efficienza e pertanto anche l'assorbimento tende a normalizzarsi.

L'intestino quindi, insieme al fegato, assume un ruolo chiave nella biogenesi delle HDL sistemiche, considerando anche che questi due tessuti sono i principali siti di sintesi di ApoA-I, la quale, una volta sintetizzata, può essere direttamente caricata di lipidi grazie ad ABCA1.

Considerando il ruolo antiaterogeno svolto dalle HDL, l'intestino, oltre al fegato, risulta essere di

fatto un organo ateroprotettivo, in quanto contribuisce in maniera importante alla loro formazione e secrezione.

Conclusioni

Da questa breve panoramica emerge la complessità e varietà dei meccanismi implicati nell'assorbimento intestinale del colesterolo, e la sua caratteristica di essere un processo "multistep", (a stadi multipli), che solo a livello dell'enterocita richiede la regolazione da parte di numerosi geni (Figura 4). Ciò implica anche che le molecole regolatrici sono tutte potenziali bersagli per nuove opzioni terapeutiche ipocolesterolemizzanti, come ben evidenziato dal caso dell'ezetimibe.

Letture consigliate

- Altmann GW, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004; Vol 303: 1201-1204.
- Berge KE, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000; 290: 1771-1775.
- Berge KE, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *Journal of Lipid Research*. 2002; 43: 486-494.
- Brunham LR, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(4): 1052-1062.
- Buch S, et al. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet*. 2007; Aug; 39(8): 995-999.
- Cohen JC, et al. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2006; 103: 1810-1815.
- Cuchel M, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*. 2007 Jan 11; 356(2): 148-156.
- Davies P and Ioannou A. The role of the Niemann-Pick C1-Like 1 protein in the subcellular transport of multiple lipids and their homeostasis. *Current Opinion in Lipidology*. 2006; 17: 221-226.
- Garcia-Calvo M, et al. The target of ezetimibe is

- Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2005; 102(23): 8132-7.
- Graf GA, et al. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 110: 659-669.
 - Gylling H, et al. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *Journal of Lipid Research*. 2004; 45: 1660-1665.
 - Hubacek JA, et al. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiological Research*. 2004; 53: 395-401.
 - Huff MW, et al. NPC1L1: evolution from pharmacological target to physiological sterol transporter. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2006; 26(11): 2433-2438.
 - Hui DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2005; 16: 183-192.
 - Hussain M, et al. Intestinal lipoprotein assembly. *Current Opinion in Lipidology*. 2005; 16: 281-285.
 - Klett EL and Patel SB. Will the real cholesterol transporter please stand up. *Science*. 2004; 303: 1149-1150.
 - Knöpfel M, et al. Multiple plasma membrane receptors but not NPC1L1 mediate high-affinity, ezetimibe-sensitive cholesterol uptake into the intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1771: 1140-1147.
 - Lammert F, Wang DQH. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology*. 2005; 129: 718-734.
 - Lee M-H, et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genetics*. 2001; 27: 79-83.
 - Levy E, et al. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Current Opinion in Lipidology*. 2007; 18: 310-318.
 - Mulligan JD, et al. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (15): 13356-13366.
 - Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Current Opinion in Lipidology*. 2002; 13: 379-381.
 - Pisciotta L, et al. Effect of ezetimibe coadministered with statins in genotype-confirmed heterozygous FH patients. *Atherosclerosis*. 2006 Nov 29. In press.
 - Sudhop T, et al. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005; 105: 333-341.
 - Tarugi P., et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: An ENID review. *Atherosclerosis* 2007 Jun 12. In press.
 - Temel RE, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117(7): 1968-1978.
 - van Heek M, et al. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 129: 1748-1754.
 - von Bergmann K, et al. Cholesterol and Plant Sterol Absorption: Recent Insights. *The American Journal of Cardiology*. 2005; Vol 96: 11D-14D.
 - Wang J, et al. Compound heterozygosity for two non-synonymous polymorphisms in NPC1L1 in a non-responder to ezetimibe. *Clinical Genetics*. 2005; 67: 175-177.
 - Weggemans RM, et al. ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans. *Clinical Genetics*. 2002; 62: 226-229.
 - Yu L, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 6616-6624.
 - Yu L, et al. Disruption of the ABCG5 and ABCG8 in mice reveals the crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2002; 99: 16237-16242.